



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Departamento de Histología

Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular.

TESIS DOCTORAL

Miguel Ángel Martín Piedra

Licenciado en Odontología
Máster en Ingeniería Tisular

Granada, 2014

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miguel Ángel Martín Piedra
D.L.: GR 2046-2014
ISBN: 978-84-9083-231-8

I.S.B.N.: En trámite
D.L.: En trámite



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Departamento de Histología

Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular.

Memoria que presenta el Licenciado en Odontología y Máster en Ingeniería Tisular
Miguel Ángel Martín Piedra
para aspirar al título de Doctor.

Fdo: Miguel Ángel Martín Piedra



Universidad de Granada
Facultad de Medicina
Departamento de Histología

Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular.

Los doctores Antonio Campos Muñoz y, Miguel Alaminos Mingorance, Catedráticos de Universidad e Ingrid Johanna Garzón Bello, Profesora Contratada Doctor, pertenecientes al Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

Certifican:

Que el trabajo de investigación que recoge esta Memoria de Tesis Doctoral, titulada “Evaluación de los perfiles de viabilidad celular de células madre de la pulpa dental y de la gelatina de Wharton como control de calidad para su uso en Ingeniería Tisular”, presentada por el Licenciado en Odontología y Máster en Ingeniería Tisular, D. Miguel Ángel Martín Piedra, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa.

VºBº El director de Tesis

VºBº El director de Tesis

VºBº La directora de Tesis

**Fdo: Dr. Antonio Campos
Muñoz**

*Catedrático de Universidad
Departamento de Histología
Universidad de Granada*

**Fdo: Dr. Miguel Alaminos
Mingorance**

*Catedrático de Universidad
Departamento de Histología
Universidad de Granada*

**Fdo: Dra. Ingrid Johanna
Garzón Bello**

*Profesora Contratada Doctor
Departamento de Histología
Universidad de Granada*

COMPROMISO DE RESPETO DE LOS DERECHOS DE AUTOR

El doctorando D. MIGUEL ÁNGEL MARTÍN PIEDRA y los directores de la tesis D. ANTONIO CAMPOS MUÑOZ, D. MIGUEL ALAMINOS MINGORANCE y Dña. INGRID JOHANNA GARZÓN BELLO garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 1 de septiembre de 2014

Los Directores de la Tesis

El Doctorando

Fdo.: Antonio Campos Muñoz

Fdo.: Miguel Ángel Martín Piedra

Fdo.: Miguel Alaminos Mingorance

Fdo.: Ingrid Johanna Garzón Bello

**A mis padres,
profesores de vida.**

**A mis hermanos,
amigos para la eternidad.**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis Doctoral, las personas de las que más he aprendido a lo largo de este camino, y de las que espero seguir aprendiendo siempre. Un buen amigo me enseñó un día que *“no se hace una Tesis, se hace un Doctor”*. Por ello siento que la relevancia científica de este documento es tan importante como la formación heredada durante el proceso de su realización. Siempre estaré en deuda con ellos por haber compartido conmigo su tiempo, su conocimiento, lo mejor de si mismos, y, sobre todo, por haberme formado técnica, profesional y humanamente.

Gracias al Prof. D. Antonio Campos Muñoz, un hombre del Renacimiento que ejerce en el siglo XXI, con gran maestría, la docencia, la investigación y la dirección de equipos humanos. Él me enseñó el poder y el manejo de la motivación. Siempre me acompañará el relato de Laín Entralgo, que él me transmitió, del niño que tiraba piedras al cielo. Gracias por mostrarme que lo importante no es llegar a la Luna, sino tirar las piedras cada vez más alto.

Gracias al Prof. D. Miguel Alaminos Mingorance, una de las personas más inteligentes que jamás he conocido. De él aprendí que todo se puede aprender y que todo merece la pena ser aprendido. Gracias por tu atención, tus incontables horas de corrección y todo tu conocimiento compartido.

Gracias a la Prof^a. Dña. Ingrid Johanna Garzón Bello, incansable investigadora de fina intuición y eficaz ejecución. Ella me enseñó muchísimas técnicas, ensayos y protocolos, pero por encima de eso, de ella aprendí la importancia de ser tenaz y paciente, a no desistir nunca y que siempre salen mejor las cosas cuando se hacen “con amor”. Gracias por contagiarme, día tras día, de tu tesón, tu perseverancia y tu constancia.

Asimismo, quiero agradecer al resto de profesores y profesoras del Departamento de Histología de la Universidad de Granada, por ayudarme siempre que lo necesité y hacerlo siempre con una sonrisa. En especial, muestro mi agradecimiento a la Prof^a. Dña. María Carmen Sánchez Quevedo. Ella me enseñó que, junto a la motivación, el conocimiento y el tesón que me han brindado mis directores de Tesis, es fundamental un buen ambiente de trabajo lleno de cariño y simpatía. Gracias por todos los consejos durante estos cuatro años, en especial aquellos que recibí a la hora de impartir mis primeras horas de docencia. Igualmente quiero expresar mi gratitud al Prof. Pascual Vicente Crespo Ferrer que, junto a su asesoramiento, siempre me ayudó especialmente en toda la compleja gestión que conlleva el doctorado.

No puedo olvidar a las demás personas que trabajan en el Departamento de Histología, que me acompañan cada día en el laboratorio y que hacen de cada día, un día mejor. Gracias a Ana Celeste, Camilo, Giuseppe, José Manuel, Boris, Miguel, Aníbal, Mario y al Prof. Ismael Rodríguez, entre otros.

Gracias de todo corazón a mis padres y mis hermanos, a quienes dedico esta Tesis Doctoral. Siempre fueron y siempre serán el pilar fundamental donde todo se sostiene. Siempre fueron y siempre serán los principales artífices de lo que alcancé en esta vida. Muchísimas gracias por haberme enseñado tanto. Ellos me enseñaron que una alegría compartida es el doble de alegre, y que una pena compartida es la mitad de triste.

Por último, hago extensibles mis agradecimientos a todas aquellas personas que, aunque no cito expresamente, me han acompañado, me han ayudado, han celebrado conmigo o me han ayudado a levantarme. Gracias a todos. Una parte importante de este documento y una parte importante de mí, también os la debo a vosotros.

Muchas Gracias, con total sinceridad.

“La prueba de todo conocimiento es el experimento. El experimento es el único juez de la verdad científica.”

*Richard Phillips Feynman
Seis piezas fáciles*

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. La Ingeniería Tisular.....	15
1.2. Células madre mesenquimales como sustrato en Ingeniería Tisular.....	18
1.2.1. Las células madre de la pulpa dental (DPSC).	19
1.2.1.1. <i>Propiedades, morfología y localización de las DPSC</i>	21
1.2.1.2. <i>Caracterización de las DPSC</i>	24
1.2.2. Células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJSC).	30
1.3. Ensayos de viabilidad celular.	33
1.3.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular.....	33
1.3.2. Ensayos funcionales.	36
1.3.3. Ensayos con biosensores de fluorescencia.	38
1.3.4. Ensayos morfológicos.	39
1.3.5. Microanálisis por energía dispersiva de rayos X.....	39
1.3.6. Determinación del perfil de expresión génica.	42
1.3.7. Combinación de varios métodos.....	43
2. HIPÓTESIS	46
3. OBJETIVOS	48

4. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	50
4.1 Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp	52
4.2 Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy.....	60
4.3 Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering	73
4.4 Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures.....	86
5. DISCUSIÓN	99
6. CONCLUSIONES	115
7. BIBLIOGRAFÍA	118

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La Ingeniería Tisular.

La Ingeniería Tisular o Ingeniería de Tejidos es un área emergente de la ciencia que aplica los principios de la biología y la ingeniería con el objetivo de comprender las complejas relaciones entre la estructura y la función de los tejidos para, de esta manera, desarrollar sustitutos viables (tejidos artificiales) que nos permitan mejorar, mantener o reemplazar tejidos u órganos dañados (Langer y Vacanti, 1993, Huang *et al.*, 2008, Saber, 2009). El diseño y desarrollo de estos tejidos artificiales mediante técnicas de Ingeniería Tisular debe ser adecuado para que su morfología y su estructura histológica sea lo más mimética posible con los tejidos naturales o nativos. De igual forma, es importante el establecimiento de distintos controles de calidad, tanto de cada uno de los elementos implicados en el desarrollo del sustituto tisular como del sustituto tisular (tejido artificial) una vez desarrollado.

El término “Ingeniería Tisular” fue empleado por primera vez por el Profesor Yuan-Cheng Fung de la Universidad de California (San Diego, USA) cuando lo propuso, en 1987, en la *National Science Foundation* de los Estados Unidos.

Desde finales de los años ochenta, y particularmente en los últimos años, se ha observado un gran interés en las aplicaciones de la Ingeniería Tisular. En este contexto, las técnicas de Ingeniería Tisular han permitido el desarrollo de diversos tejidos humanos como son la piel (Meana *et al.*, 1998, Llames *et al.*, 2004), la córnea (Gonzalez-Andrades *et al.*, 2011, Garzon *et al.*, 2014), la vejiga (Atala *et al.*, 2006, Sloff *et al.*, 2014) o la mucosa oral (Lauer y Schimming, 2001, Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007), entre otros. Para el desarrollo de tejidos artificiales mediante técnicas de Ingeniería Tisular es necesaria la presencia e interrelación estrecha de tres elementos fundamentales: células madre; una matriz extracelular que dirija el crecimiento celular y facilite un microambiente físico, químico y biológico para

optimizar el crecimiento y diferenciación celular; y por último, factores de crecimiento o señales que regulen diferentes procesos y eventos celulares como pueden ser la proliferación celular, la diferenciación o la síntesis de matriz extracelular (Figura 1) (Giannobile, 1996, Bouhadir y Mooney, 1998, Reddi, 1998, Nakashima y Reddi, 2003, Prescott *et al.*, 2008).

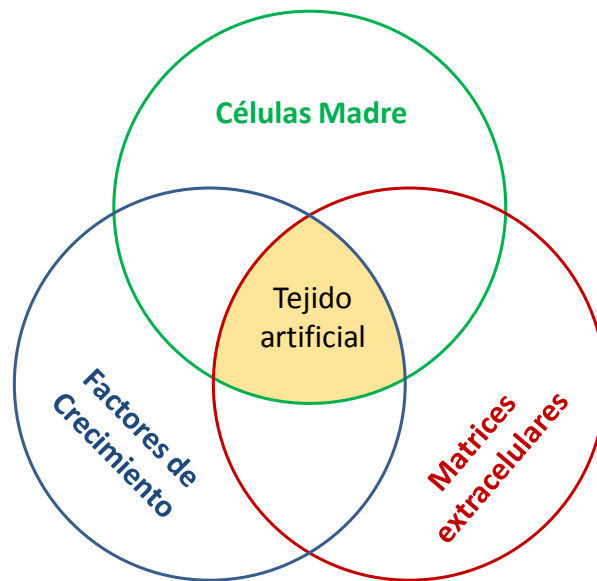


Figura 1. Los elementos fundamentales de la Ingeniería Tisular.

Como anteriormente se ha mencionado, las células madre constituyen uno de los elementos fundamentales en todas las técnicas de la Ingeniería Tisular. La célula es el componente esencial y fundamental de los tejidos que conforman el cuerpo humano y, por tanto, también ha de ser un constituyente básico de aquellos sustitutos tisulares desarrollados mediante Ingeniería Tisular. Las células madre tienen la capacidad de replicarse de forma constante, generando progenitores que son capaces de diferenciarse hacia otras células especializadas de diversos tejidos, permitiendo así la regeneración o reparación de los mismos, o incluso de órganos enteros (Hall y Watt, 1989, Bruder *et al.*, 1997, Rao, 2004, Woods *et al.*, 2009, Calle *et al.*, 2014).

El desarrollo de un tejido u órgano artificial requiere la utilización de células que tengan capacidad para desarrollar una serie de funciones características de dicho tejido u órgano. Asimismo, es fundamental conocer cómo dichas características pueden variar como consecuencia de los protocolos empleados en Ingeniería Tisular (cultivo, aislamiento, expansión...)

Por este motivo, es fundamental el perfecto conocimiento de todas las técnicas relacionadas con el procesamiento de dichas células, no sólo su aislamiento y diferenciación, sino también su criopreservación y el estudio de la viabilidad y conservación de sus propiedades tras los numerosos procedimientos llevados a cabo en el laboratorio, para que puedan ser utilizadas en un futuro en protocolos de Ingeniería Tisular. En otras palabras, es fundamental la utilización de una población celular adecuada en la que se haya demostrado previamente que ninguna de sus propiedades se encuentran comprometidas, ya que de ello dependerá la calidad y, por consiguiente, la efectividad del producto (tejido artificial) una vez implantado en el huésped correspondiente, sea de origen animal o humano.

En este sentido, la elección de la fuente celular, así como la elección de las condiciones que se van a emplear en el desarrollo de dichos tejidos artificiales, constituye un control de calidad importante y necesario de los sustitutos generados mediante Ingeniería Tisular.

1.2. Células madre mesenquimales como sustrato en Ingeniería Tisular.

En Ingeniería Tisular se pueden emplear distintos tipos de células. Desde células embrionarias (ES), caracterizadas por una gran capacidad de proliferación, autorrenovación y diferenciación o pluripotencia (Lu *et al.*, 2014, Toh y Cao, 2014) hasta células progenitoras o terminales de aquellos tejidos que queramos regenerar o reparar (Hilz *et al.*, 2014, Peng *et al.*, 2014) que, por lo general, presentan menor capacidad proliferativa probablemente asociada a que su estado de diferenciación es más avanzado. Sin embargo, los problemas éticos y legales en torno a la utilización de células embrionarias, el escaso conocimiento sobre la regulación de los procesos de diferenciación, la posibilidad de rechazo inmunológico asociado al uso alogénico, así como la generación de tumores asociada a la utilización de células embrionarias en modelos experimentales (Blum y Benvenisty, 2008) ha generado la búsqueda de nuevas fuentes celulares que no presenten estos efectos adversos.

En este sentido, numerosas investigaciones en el área de la Ingeniería Tisular han utilizado **células madre mesenquimales** (MSC). Las células madre mesenquimales son un grupo heterogéneo de células madre multipotentes o pluripotentes que derivan de la capa germinal mesodérmica, presentan gran capacidad proliferativa y de autorrenovación y son responsables del desarrollo de los tejidos conectivos, de las células musculares esqueléticas y de las células del sistema vascular (Salem y Thiernemann, 2010). Sin embargo, cabe destacar que estudios recientes han puesto de relieve la gran plasticidad y potencialidad de las MSC mediante técnicas de transdiferenciación (Kanafi *et al.*, 2013, Kanafi *et al.*, 2014).

El primer nicho donde se describió la presencia de estas células fue la médula ósea (Bianco y Gheron Robey, 2000, Deans y Moseley, 2000). A partir de ese momento,

se ha descrito la presencia de MSC en una gran variedad de tejidos adultos, entre los cuales se encuentra el tejido adiposo, la gelatina de Wharton del cordón umbilical, la pulpa dental, el músculo o el sistema vascular, entre otras localizaciones (Tuan *et al.*, 2003).

La presente Tesis Doctoral se centra en la elección y utilización de células madre mesenquimales que presenten unas características y un *status* funcional óptimo para su aplicación en protocolos de Ingeniería Tisular. Ello constituirá un factor crítico en cuanto a la calidad y efectividad de los tejidos artificiales a desarrollar. Más concretamente, las publicaciones científicas que se presentan estudian una población de MSC de origen dental (procedentes de la pulpa dental humana) y una población de MSC de origen no dental (procedentes de la gelatina de Wharton del cordón umbilical).

1.2.1. Las células madre de la pulpa dental (DPSC).

El diente es uno de los órganos más importantes presentes en la cavidad oral, participando en funciones importantes del aparato estomatognático como son la masticación, la fonación o la deglución. Existen diferentes morfologías dentarias en función a las necesidades fisiológicas. Sin embargo, la estructura y ultraestructura dentaria es siempre la misma, con diferencias menores.

Histológicamente, el diente está constituido por diversos tejidos duros (mineralizados), como son el esmalte, la dentina o el cemento. Estos tejidos mineralizados envuelven y protegen a la pulpa dental, un tejido conjuntivo laxo mucoso en el que se encuentra la mayoría de las células dentarias y que es el

responsable de la vitalidad del diente como órgano, de su inervación e irrigación, así como la formación de la dentina (Figura 2) (Gomez de Ferraris y Campos, 1999).

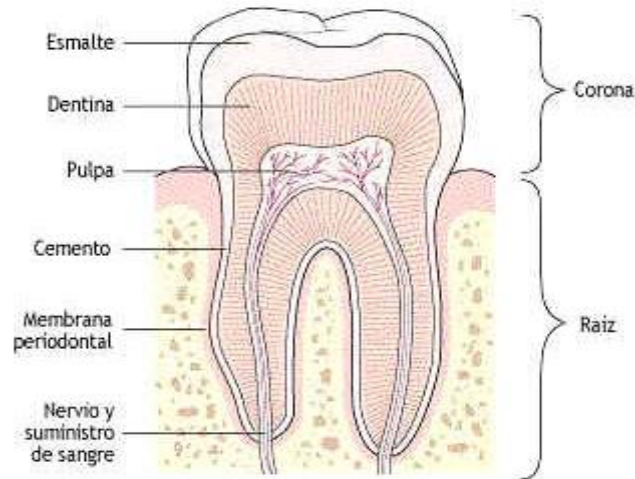


Figura 2. Estructura histológica de un diente.

En el interior de la pulpa dental se encuentran diferentes tipos de células: desde los odontoblastos, que son células con un alto grado de diferenciación y propiedades fisiológicas para la producción constante de la dentina; hasta células que se encuentran en cualquier tejido conjuntivo, como son fibroblastos, células endoteliales, nerviosas, inmunitarias, etc. (Gomez de Ferraris y Campos, 1999).

Además de todas las células ya diferenciadas, es obvio pensar que también se pueden localizar células madre/progenitoras en el interior de la pulpa dental. La existencia de células madre se ha descrito en prácticamente todos los tejidos humanos (Gimble y Guilak, 2003) y, entre ellos, también en los tejidos dentarios y peridentarios (Tabla 1).

En los tejidos dentarios y peridentarios podemos encontrar cuatro tipos de células: células madre en el interior de la pulpa de dientes permanentes (*dental pulp stem*

cells, DPSC a partir de ahora) (Gronthos *et al.*, 2000), células madre en el interior de la pulpa de dientes temporales exfoliados (*stem cells of human exfoliated deciduous teeth*, SHED a partir de ahora) (Miura *et al.*, 2003), células madre en la papila apical de dientes permanentes (*stem cells from apical papillae*, SCAP a partir de ahora) (Sonoyama *et al.*, 2008), y células madre en el ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells*, PDLSC a partir de ahora) (Seo *et al.*, 2004). La presente Tesis Doctoral se centra en las células de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC), así como en las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJSC), que trataremos con posterioridad.

Tejidos Dentales	Tejidos Periodontales
Pulpa de dientes permanentes (DPSC)	Ligamento periodontal (PDLSC)
Pulpa de dientes temporales exfoliados (SHED)	
Papila apical de dientes permanentes inmaduros (SCAP)	

Tabla 1. Tipos de células madre de origen dentario.

1.2.1.1. Propiedades, morfología y localización de las DPSC.

Las células madre de la pulpa dental de dientes permanentes (DPSC), objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, fueron descritas por primera vez por Gronthos y col. en el año 2000 (Gronthos *et al.*, 2000). Dichas investigaciones reportaron el aislamiento y caracterización de una población celular clonogénica de la pulpa dental y con una alta tasa de proliferación, incluso mayor que las células mesenquimales obtenidas de la médula ósea. Igualmente, en estos estudios se establecieron

métodos para aislar las células madre de pulpa dental (DPSC) tras extraer la pulpa de la cámara pulpar y la posterior digestión de la matriz extracelular de este tejido conjuntivo. Las células madre de la pulpa dental (DPSC) son precursores de varios tipos de las células que se encuentran en la pulpa. Además, son células capaces de desarrollar tejidos mineralizados *in vitro* e *in vivo*, así como también se ha descrito su multipotencialidad, al diferenciarse en adipocitos y precursores neurales (Gronthos *et al.*, 2002).

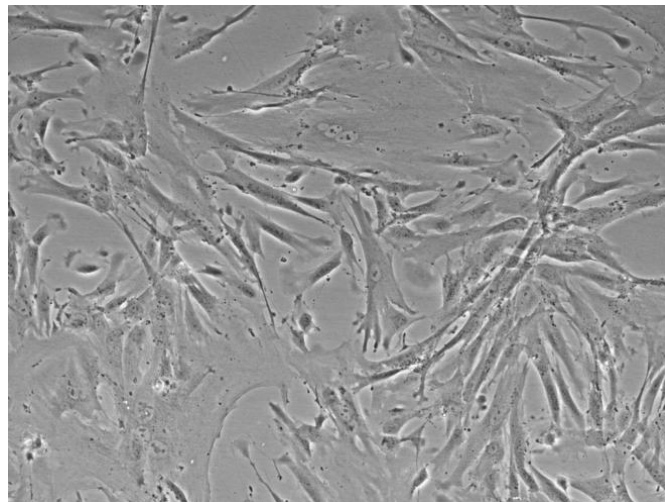


Figura 3. Microfotografía de DPSC en cultivo. Se observa la morfología elongada típica de fibroblastos, con un núcleo ovalado y central.

Según los primeros estudios de Gronthos y colaboradores (Gronthos *et al.*, 2000, Gronthos *et al.*, 2002, Perry *et al.*, 2008) las células madre de la pulpa dental (DPSC) se consideran células madre mesenquimales, por su similitud con las células mesenquimales de la médula ósea. Morfológicamente, son células similares a los fibroblastos: de citoplasma alargado, un núcleo redondeado y grande (Figura 3 y 4). En el citoplasma se ha descrito poca cantidad de retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi o polirribosomas, lo que indica que el aparato celular de síntesis proteica está poco desarrollado.

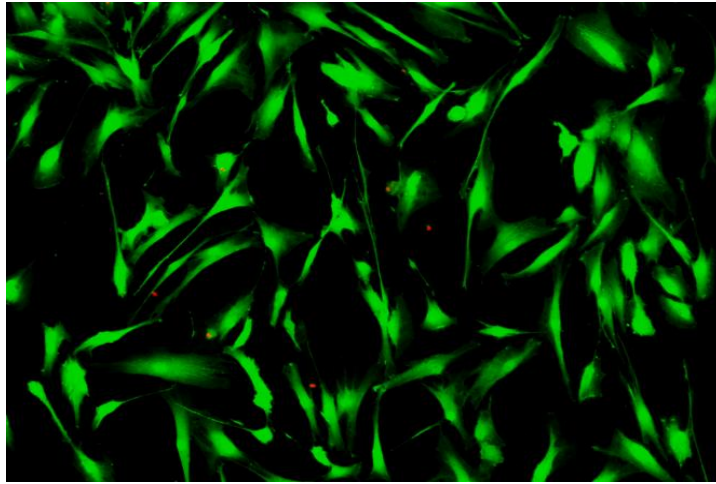


Figura 4. Microfotografía de células madre de la pulpa dental humana (hDPSC).

Se han descrito varios nichos pulpares en los que se localizan las células madre de la pulpa dental (DPSC). Fundamentalmente son la capa sub-odontoblástica, las zonas perivasculares y las zonas centrales del estroma. Cuando la pulpa dental se somete a un traumatismo o agresión, se produce la muerte de parte de la capa celular odontoblástica. Esta agresión estimula una cascada de eventos celulares que, aunque todavía son poco conocidos, conducen a la liberación de una serie de señales en el interior de la matriz dentinaria. Estas señales inducen un aumento en la capacidad proliferativa de las DPSC y la diferenciación hacia odontoblastos, regenerando así el daño producido. Existen algunos estudios que monitorizan la proliferación y la diferenciación celular tras producir una agresión sobre la pulpa, mediante tallado dentinario, con el objeto de localizar los nichos de las DPSC. En este sentido, se ha descrito un nicho perivascular al comprobarse que, tras un traumatismo pulpar, existe una mayor proliferación celular en dichas zonas (Tecles *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando se analiza la actividad de las señales de comunicación intercelular que dirigen la diferenciación de una célula madre hacia un tipo u otro (ligandos y receptores *Notch*) tras la agresión pulpar, surgen otros nichos

adicionales como son la capa sub-odontoblástica o el estroma pulpar (Lovschall *et al.*, 2005) (Figura 5).

1.2.1.2. Caracterización de las DPSC.

Diversos estudios han usado MSC de origen no dental, como las BMSC (células madre mesenquimales de la médula ósea) para compararlas con las DPSC aisladas con el fin de conocer más detalladamente las características de estas (Gronthos *et al.*, 2000, Shi *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos reflejan gran similitud entre ambos tipos celulares (Karaoz *et al.*, 2011), considerándose ambas precursoras de osteoblastos, además de condroblastos, adipocitos y otras células (Pittenger *et al.*, 1999).

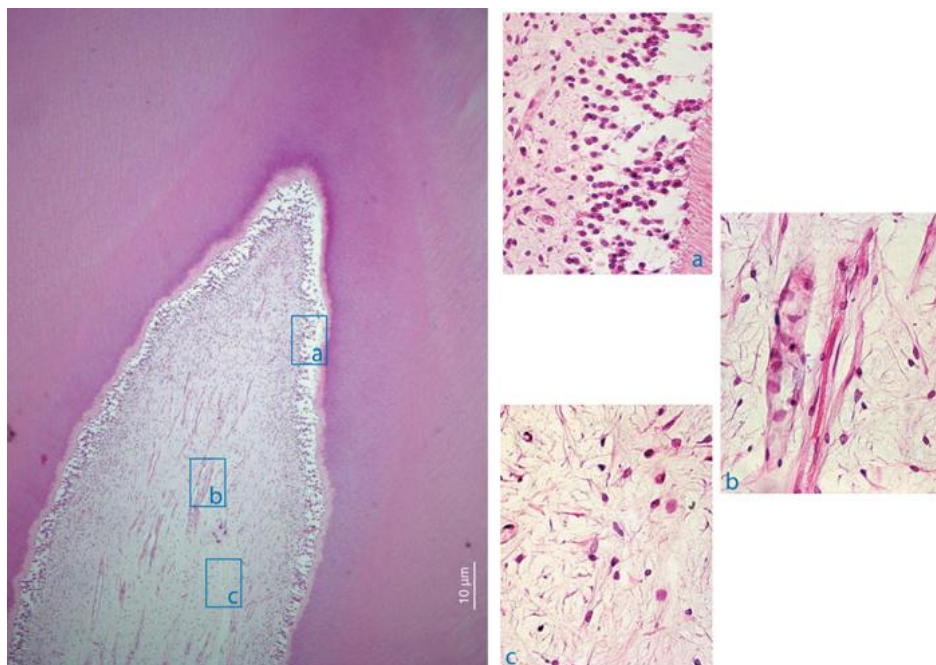


Figura 5. Microfotografía tras tinción inmunohistoquímica de receptores *Notch*. Las DPSC se localizan en varios nichos dentro de la pulpa dental: (a) capa sub-odontoblástica, (b) zonas perivasculares y (c) regiones centrales de estroma.

Las DPSC y las BMSC comparten algunos marcadores de superficie como son CD44, CD90, CD105, CD106, CD146, 3G5 ó Stro-1, así como algunos marcadores de expresión negativa como CD45 (Shi *et al.*, 2005, Dominici *et al.*, 2006). Algunos de estos marcadores son propios de progenitores y células endoteliales activadas y otros son comunes a casi todas las células madre. Además, tanto los osteoblastos como los odontoblastos son células responsables de la síntesis de la matriz extracelular de un tejido mineralizado como el tejido óseo o la dentina, respectivamente. Esto explica que ambos precursores, DPSC y BMSC, expresen de forma similar fibronectina, colágeno tipo I, fosfatasa alcalina, proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1), osteonectina, osteocalcina o sialoproteína ósea (BSP) (Kuo *et al.*, 1992, Shiba *et al.*, 1998, Buurma *et al.*, 1999, Gronthos *et al.*, 2000). Sin embargo, las DPSC también expresan productos exclusivos de la matriz dentinaria, como son la sialoproteína dentinaria (DSP) y la fosfoproteína dentinaria (DPP), que están relacionados con el proceso de la dentinogénesis (Feng *et al.*, 1998). Otra de las diferencias importantes entre ambas células es una mayor tasa de proliferación y crecimiento de las DPSC, hasta el 30%, posiblemente asociado a una mayor expresión de Cdk-6 y IGF (Shi *et al.*, 2001). Aunque ambas poblaciones celulares son muy similares en cuanto a sus marcadores de superficie, las DPSC expresan marcadores como citoqueratinas 18 y 19 (CK18 y CK19) o Tenascina C (TNC) que son negativos en cultivos de BMSC. Estos hallazgos sugieren que, si bien el potencial condrogénico, osteogénico o adipogénico de las DPSC es muy similar al de las BMSC, las DPSC presentan un mayor potencial neurogénico, posiblemente asociado al origen que estas células tienen en la cresta neural (Huang *et al.*, 2008). La expresión de citoqueratinas también aporta a las DPSC un potencial especialmente favorable, en relación con las BMSC, hacia la diferenciación epitelial (Karaoz *et al.*, 2011).

Otro de los hechos que asemeja a los precursores odontoblásticos y osteoblásticos proviene de estudios que emplean modelos animales para trasplantar estas células y observar su potencial *in vivo*. Takeda y col. (Takeda *et al.*, 2008) demostraron el potencial de las DPSC para producir y secretar un tejido similar a la dentina *in vivo*. Por otra parte, las células madre de la pulpa dental (DPSC) son capaces de dar lugar a un tejido similar al óseo (Graziano *et al.*, 2008). A este respecto, algunos autores han descrito la formación de nódulos calcificados de tejido similar al óseo en condiciones *in vitro* (Gronthos *et al.*, 2000). Es más, cuando esos nódulos óseos producidos por DPSC *in vitro*, se trasplantaron en animales, se observó que estos fueron remodelados *in vivo*, generando hueso cortical. De la misma forma, se describió la diferenciación de las células madre de la pulpa dental (DPSC) a osteocitos y células endoteliales e incluso la formación de tejido mineralizado con vasos, constituyéndose así el tejido óseo maduro (Laino *et al.*, 2005, Laino *et al.*, 2006). De cualquier forma, estos hallazgos reflejan la capacidad de estas células para diferenciarse, adquiriendo la propiedad de sintetizar, secretar y calcificar una matriz extracelular orgánica, ya sea de naturaleza dentinaria u ósea, haciendo de estas células candidatas especiales para su uso en Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular.

Sin embargo, la vitalidad de la pulpa no sólo depende de la capacidad de formación de nueva dentina como protección frente a agresiones externas y la preservación de la capa odontoblástica, responsable de dicha función. La vitalidad de este tejido también depende de un buen aporte sanguíneo y, en este sentido, es fundamental el proceso de angiogénesis que ocurre tras la agresión pulpar, de forma paralela a la regeneración odontoblástica. El hecho de que las DPSC expresen en su superficie marcadores como CD106 (propio de células endoteliales activadas) o CD146 (propio de precursores endoteliales) (Shi *et al.*, 2005), junto al hecho de que una parte

importante de estas células se localicen en las regiones perivasculares (Tecles *et al.*, 2005) y la presencia de factores de crecimiento angiogénicos en la matriz dentinaria (Roberts-Clark y Smith, 2000), hacen sospechar que sean estas mismas células las que participen en los procesos de formación de nuevos vasos sanguíneos (Shi y Gronthos, 2003).

Además de su potencial adipogénico, osteogénico (Seong *et al.*, 2010, Ito *et al.*, 2011) y condrogénico (Rizk y Rabie, 2013) previamente mencionado, las células madre de la pulpa dental (DPSC) no sólo son capaces de diferenciarse en odontoblastos o células endoteliales. En este sentido, las DPSC también presentan la capacidad de diferenciarse a células miogénicas e incluso a precursores neurales (Yang *et al.*, 2007), asegurándose, por tanto, la multipotencialidad y plasticidad de estas células. Además, recientemente se ha conseguido diferenciar las DPSC a células más complejas como son las células cardíacas (Armiñán *et al.*, 2009), a células capaces de producir insulina (Kanafi *et al.*, 2013) y a células nerviosas capaces de secretar dopamina (Kanafi *et al.*, 2014). En este sentido, aún se requiere un gran esfuerzo investigador acerca de si realmente es posible constituir diferentes tejidos de naturaleza mesenquimal para su posterior utilización. En el caso del tejido óseo, sí está demostrada ya la posibilidad de formación de tejido óseo funcional a partir de las DPSC (Laino *et al.*, 2005), lo que ofrece un panorama prometedor en procedimientos que requieran injertos óseos, no sólo en el macizo craneofacial sino en todo el organismo. Especialmente es en estos casos cuando parece interesante estudiar la utilidad de los dientes como una fuente de células madre mesenquimales.

Las células madre mesenquimales en general y, más concretamente, las DPSC, al igual que las células madre de la gelatina de Wharton (WJSC), presentan baja expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad, como HLA-DR

(Karaoz *et al.*, 2011), lo cual convierte a estas en células inmunoprivilegiadas que pueden ser usadas de forma alogénica sin riesgo de desencadenar rechazo inmunológico. Además, estas células poseen capacidad para inhibir algunas células inmunitarias, tanto mediante un contacto directo célula a célula, como de forma indirecta mediante la liberación de moléculas como PGE2, TGF- β , NO,IDO o HGF, que modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias (Li *et al.*, 2014). Algunos de los mecanismos inmunomoduladores son la inhibición de linfocitos T y NK, la inhibición en la maduración de células dendríticas o la activación de linfocitos T reguladores mediante IL-10 (Keating, 2012). Estas propiedades inmunomodulatorias propias de las células madre mesenquimales constituyen otra de las características importantes en la aplicación de estas a terapias de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa. En este sentido, investigaciones previas han usado estas células en pacientes post-trasplantados de riñón, en combinación con fármacos inmunosupresores, observándose que la aplicación de células madre mesenquimales redujo la incidencia de rechazo agudo e infecciones oportunistas, así como mejoró la funcionalidad del riñón trasplantado (Tan *et al.*, 2012).

En este contexto, las células madre de la pulpa dental (DPSC) podrían constituir una fuente potencial para su utilización en protocolos de Ingeniería Tisular, si bien es necesario un importante esfuerzo investigador para determinar si se trata de una fuente de células viables, es decir, que se trata de una fuente de células que permite su manejo en protocolos de Ingeniería Tisular sin que sus propiedades se vean comprometidas y, por tanto, de una alternativa novedosa en el área de la Medicina Regenerativa.

Por otra parte, los dientes son órganos que, salvo agresión irreversible, se mantienen vitales durante toda la vida y, con ellos, las células madre de su interior.

Por ello, es un reservorio del que podemos disponer en cualquier momento de la vida, que se constituye como fuente constante de células. Además, en el consultorio dental son frecuentes las situaciones en que se prescribe la extracción de un diente con la pulpa sana, principalmente la exodoncia preventiva de terceros molares y la exodoncia de premolares por motivos ortodónticos. Este tipo de situaciones, sobre todo la exodoncia de premolares con fines ortodónticos, casi siempre suelen darse en adultos jóvenes, siendo esto de especial interés ya que, actualmente, sabemos que el potencial de regeneración a partir de células madre disminuye con la edad, como consecuencia inherente al envejecimiento. De hecho, se ha visto una disminución del número de células sub-odontoblásticas, uno de los nichos de DPSC, conforme aumenta la edad (Murray *et al.*, 2002a, Murray *et al.*, 2002b).

En este sentido, este material biológico, que de otra forma sería desechado, se puede utilizar para aislar, e incluso conservar mediante criopreservación, sus células madre, para su posterior uso. Sin embargo, la viabilidad de las células madre de la pulpa dental (DPSC) no ha sido materia de estudio en la actualidad y sería necesario profundizar en este tema para analizar si es factible la utilización de dientes sanos como fuente de células y determinar sus perfiles de viabilidad para su posterior utilización en las diferentes técnicas de Ingeniería Tisular.

1.2.2. Células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJSC).

Actualmente, las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (*human Wharton's jelly stem cells* - hWJSC) son consideradas como otra fuente prometedora de células madre multipotenciales o incluso pluripotenciales para su uso en Ingeniería Tisular. Las hWJSC son células adultas con un origen perinatal, lo cual explica la gran potencialidad observada (Taghizadeh *et al.*, 2011). A este respecto, la utilización de células madre de cordón umbilical preservadas en bancos de tejidos puede contribuir a la generación de tejidos artificiales sin necesidad de utilizar células procedentes del propio paciente. Las células madre de la gelatina de Wharton presentan características propias de las células madre mesenquimales, siendo capaces de sintetizar citoquinas de igual manera que las células madre mesenquimales adultas (Lu *et al.*, 2006). Por otra parte, las células madre de la gelatina de Wharton son capaces de sintetizar factor estimulante de granulocitos-macrófagos (GM-CSF y G-CSF), a diferencia de otras células madre mesenquimales adultas. Otra de las características importantes de las células madre de la gelatina de Wharton, es su gran facilidad de obtención, lo cual contrasta con la mayor dificultad para obtener células progenitoras hematopoyéticas de la sangre del cordón umbilical. Tal es así, que el éxito de la extracción de las células madre de la gelatina de Wharton ronda el 100%, siendo del 63% en el caso de las células hematopoyéticas.

Las hWJSC, al igual que las DPSC anteriormente mencionadas, representan una fuente única, con escasos problemas éticos y de fácil acceso, las cuales son capaces de expresar marcadores de indiferenciación como Oct4, Nanog y Sox2. Una vez aisladas estas células en el momento del nacimiento, se consideran células

en un estado de mayor indiferenciación que las células madre obtenidas de otros tejidos adultos, como la médula ósea o el tejido adiposo; de ahí su denominación perinatal. Una prueba del estado primitivo de diferenciación de estas células es su alta capacidad de proliferación *in vitro*, a diferencia de otras fuentes de células madre adultas que tienden a mostrar senescencia mucho antes que las células madre de la gelatina de Wharton cuando se mantienen en cultivo. Esto podría ser explicado por la alta actividad telomerasa que poseen las células madre de la gelatina de Wharton. Múltiples estudios realizados con células madre de la gelatina de Wharton, demuestran que estas células poseen un cariotipo estable, a lo largo de múltiples pases, no pierden su capacidad de adhesión, de inhibición por contacto y su dependencia al suero, a diferencia de las células tumorales, motivo por el cual estas células se plantean como una fuente fiable de células para su uso en terapias de Medicina Regenerativa (Lund *et al.*, 2007). Otro de los motivos por los cuales la utilización de las células madre de la gelatina de Wharton en Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa es de gran utilidad, es su baja expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I (HLA-ABC) (Sarugaser *et al.*, 2005, Lu *et al.*, 2006, Lupatov *et al.*, 2006, Wu *et al.*, 2007) y ausencia de expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (Conconi *et al.*, 2006, Weiss *et al.*, 2008), de forma similar a como ocurre con las DPSC. Por tanto, no deberían desencadenar una respuesta inmune una vez implantadas en un huésped de forma alogénica y, por consiguiente, constituyen excelentes candidatos para su uso en Ingeniería Tisular y Terapia Regenerativa.

Además, las células madre de la gelatina de Wharton, han sido previamente diferenciadas con éxito hacia numerosas estirpes celulares, incluyendo la estirpe osteogénica, adipogénica y condrogénica (Karahuseyinoglu *et al.*, 2007), cardiomiocitos, músculo esquelético (Troyer y Weiss, 2008) y tejido nervioso (Ma *et*

al., 2005). Además, recientemente, nuestro grupo de investigación demostró que las hWJSC son capaces de diferenciarse hacia células del endotelio vascular utilizando factores de crecimiento y de diferenciación epitelial (Alaminos *et al.*, 2010). Incluso, estudios desarrollados por nuestro grupo de investigación, sugieren que estas células podrían tener capacidad de diferenciación hacia tejidos de la estirpe ectodérmica como los epitelios de la piel, la mucosa oral (Garzon *et al.*, 2009, Garzon *et al.*, 2013) o la córnea (Garzon *et al.*, 2014). Todo ello sugiere que las células madre de la gelatina de Wharton presentan un gran potencial de diferenciación, no sólo hacia estirpes típicamente mesenquimales, sino también, hacia otros tipos celulares, quedando patente así su carácter pluripotente, tal y como ocurría con las DPSC.

Resulta evidente que para el desarrollo y buen funcionamiento de los tejidos creados mediante Ingeniería Tisular es fundamental trabajar con el tipo de células madre mesenquimales más idóneo en relación con el tejido que se desea elaborar. Pero además, resulta necesario que dichas células presenten una alta viabilidad, es decir, que constituyan una fuente adecuada de células con elevados niveles de proliferación y actividad celular para su uso terapéutico. La evaluación de los perfiles de viabilidad celular constituye, en sí mismo, un control de calidad del sustrato celular a utilizar para el desarrollo de cualquier órgano o tejido artificial y, por tanto, un control de calidad de dichos órganos o tejidos artificiales.

1.3. Ensayos de viabilidad celular.

La determinación de los patrones de viabilidad celular de las células madre de la pulpa dental (DPSC) proporcionará valiosa información sobre la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular determinada. Así pues, la determinación de la viabilidad celular es un marcador predictivo para un buen funcionamiento de los futuros tejidos que se elaboren a partir de las MSC, ya sean de origen dental (DPSC) o de origen no dental (hWJSC). Dicho de otra forma, no se podrá garantizar la funcionalidad de un tejido artificial si previamente no se garantiza la viabilidad de las células empleadas para tal fin (Montalvo, 2008). Son varios los métodos que se pueden utilizar en el laboratorio para estudiar la viabilidad y funcionalidad celular, entre los cuales podemos destacar: evaluación de la integridad de la membrana celular, ensayos funcionales, ensayos de viabilidad a través de biosensores de fluorescencia, ensayos morfológicos, microanálisis por energía dispersiva de rayos X y técnicas de determinación de la expresión génica mediante *microarrays*.

1.3.1. Evaluación de la integridad de la membrana celular.

Si una célula está muerta o en vías de morir, la función y estructura de la membrana celular se encontrará alterada. Esta alteración permitirá la incorporación al medio intracelular de moléculas hasta ese momento no permitidas o bien, el rechazo de moléculas que previamente se incorporaban a la célula. De acuerdo con estas propiedades, se han desarrollado diferentes test con el objeto de evaluar la integridad de la membrana plasmática. Se distinguen tres tipos de ensayos: los métodos que emplean sustancias colorantes o fluorescentes, los métodos basados en tinciones catiónicas, y los basados en la liberación de determinadas sustancias al

medio extracelular. Los más usados son los que se basan en colorantes o moléculas fluorescentes.

Entre los métodos basados en colorantes y moléculas fluorescentes se distinguen ensayos de exclusión y de inclusión. En los ensayos de exclusión, si la membrana celular está íntegra, el colorante o la sustancia fluorescente no es capaz de atravesarla o bien esta es expulsada —excluída— por las bombas existentes en la membrana celular; por el contrario, si la membrana está dañada, el colorante o sustancia fluorescente atravesará sin dificultad la misma y permanecerá en el interior celular. Los resultados obtenidos podrán analizarse mediante técnicas de microscopía, por citometría de flujo, o también mediante ELISA.

Entre los colorantes orgánicos más utilizados para los ensayos de exclusión están: *azul tripán* (Hoskins *et al.*, 1956, Phillips, 1973), *eosina* (Hoskins *et al.*, 1956), *rojo Congo* (Geschickter, 1930) y *eritrosina B* (Phillips y Terryberry, 1957, Bhuyan *et al.*, 1976), siendo el azul tripán el colorante que más se ha utilizado hasta el momento. Con el método de viabilidad del azul tripán, si la membrana plasmática está dañada, la célula se tiñe de púrpura-violeta, mientras que las células no dañadas aparecen translúcidas al microscopio.

Por otro lado, entre los compuestos con fluorescencia nos encontramos con el *ioduro de propidio* o el *bromuro de etidio* (Edidin, 1970, Krishan, 1975, Hamilton *et al.*, 1980). El ioduro de propidio es impermeable a membranas celulares intactas, pero cuando la célula está muerta o en proceso de muerte, penetra sin dificultad y se une a los ácidos nucleicos, por lo que se intercala con el ADN o ARN, observándose rojo fluorescente por técnicas de citometría de flujo o microscopía de fluorescencia (Bank, 1987).

En los ensayos de inclusión se utilizan otras moléculas como el *diacetato de fluoresceína* (Rotman y Papermaster, 1966, Mohr y Trounson, 1980) o la *calceína* (Papadopoulos *et al.*, 1994). Cuando la célula está viva, estas moléculas atraviesan la membrana plasmática y son hidrolizadas por esterasas intracelulares dando lugar a fluorescencia en el interior de la célula. Las células no dañadas retienen una enorme fluorescencia, mientras que las células dañadas son incapaces para hacerlo y la señal es muy débil bajo el microscopio de fluorescencia.

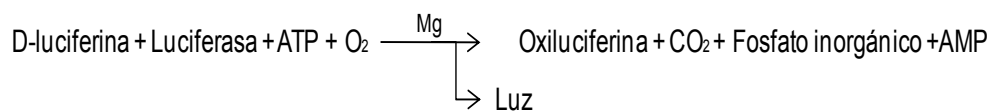
También existen tinciones fluorescentes catiónicas que pueden medir los cambios del potencial de membrana de las células mediante microfluorimetría. Estas tinciones son permeables a la membrana y se unen muy poco a ella. El *éster de rodamina*, el cual no es tóxico para la célula, cuando penetra en ella es enormemente fluorescente. Si la célula está dañada, el éster de rodamina no puede penetrar en la célula y la fluorescencia es extracelular. De cualquier manera, se produce un contraste de fluorescencia intracelular y extracelular que es cuantificable (Ehrenberg *et al.*, 1988).

Además, también se puede determinar la integridad de la membrana plasmática mediante la determinación de moléculas intracelulares en el medio extracelular. Entre las moléculas más utilizadas encontramos enzimas citosólicas, generalmente la *lactato deshidrogenasa* (LDH) (Legrand *et al.*, 1992) o ácidos nucleicos, como es el ADN, cuya presencia en altos niveles en el exterior celular es indicativo de una viabilidad celular baja (Coco-Martin *et al.*, 1992, da Costa *et al.*, 1999, Posadas *et al.*, 2007, Park *et al.*, 2008). También podemos medir la liberación de cromo radiactivo (Cr^{51}) que se une de manera no covalente a los aminoácidos básicos de las proteínas intracelulares cuando estas se liberan al medio extracelular (Rinaldi *et al.*).

1.3.2. Ensayos funcionales.

Este tipo de métodos tratan de evaluar los componentes metabólicos que son necesarios para la correcta fisiología celular, bajo la premisa de que el daño celular produciría una pérdida en la capacidad para mantener y producir la energía necesaria para el correcto funcionamiento metabólico y para la proliferación celular. Así, se pueden medir los niveles totales de adenosín trifosfato (ATP), o bien la tasa de ADN intracelular o la síntesis de proteínas.

La cuantificación de los niveles de ATP se puede realizar de varias formas. Una de ellas es mediante una reacción de bioluminiscencia. Para ello, es necesario añadir D-luciferina-luciferasa, de tal manera que la luciferasa utiliza la energía química contenida en la molécula de ATP para producir la descarboxilación oxidativa de la luciferina a oxiluciferina, dando como resultado la producción de luz que es medida a través de un luminómetro sensible. La luz producida es directamente proporcional a la cantidad de ATP presente. La cuantificación de la luz producida se corresponde directamente con el número de células viables (Sevin *et al.*, 1988, Sevin *et al.*, 1993). La reacción es la siguiente:



También podemos cuantificar la cantidad de ATP atendiendo a la actividad de las enzimas que participan en su formación. Uno de los ensayos más utilizados es la prueba de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (*MTT*). Este compuesto, de color amarillento, es capaz de reducirse y adquirir color morado cuando se transforma en formazán por acción de las enzimas intramitocondriales de

las células vivas. Por este motivo, la adición de *MTT* al medio de cultivo y la posterior cuantificación colorimétrica del producto resultante nos puede dar una idea bastante fiable del número de células vivas y muertas que existen en el cultivo celular (Mosmann, 1983, Twentyman y Luscombe, 1987, Burton, 2005, Wang *et al.*, 2006). En contraste con el *MTT*, cuya reducción resulta en la formación de cristales de *formazán* insolubles en agua (Figura 6), existe una segunda generación de sales de tetrazolio que dan lugar a compuestos de *formazán* solubles en agua, eliminándose así la necesidad de una solubilización posterior (Takenouchi y Munekata, 1995). Entre estas nuevas sales encontramos el sodio 5-(2,4-disulfofenil)-2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-tetrazolio (*WST-1*), el sodio 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio (*XTT*) o el 5-[3-(carboximetoxi) fenil]-3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (*MTS*). De estas últimas, el *WST-1* parece ser la más estable, siendo posible almacenarla durante semanas sin que sufra una degradación significativa (Berridge *et al.*, 2005).

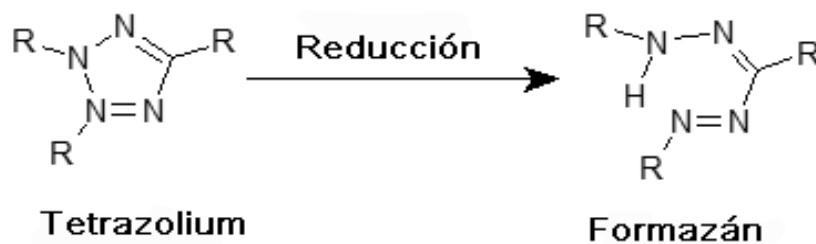


Figura 6. Reducción de las sales de tetrazolio.

Por otra parte, la síntesis del nuevo ADN puede ser medida al incorporar timidina marcada radioactivamente con tritio (^3H). La timidina marcada radiactivamente se introduce en el medio de cultivo, para que se incorpore al ADN durante la replicación. El nivel de proliferación se evalúa en función del nivel de radiactividad

alcanzado por las células en cultivo. Por tanto, estima el número de células que están proliferando (Patau y Swift, 1953, Allison y Ridolpho, 1980, Puleo *et al.*, 1991).

Como se ha mencionado con anterioridad, la detección de algunas proteínas nos permite conocer el *status* funcional en el que se encuentra una determinada población celular. La detección de PCNA o Ki67 está relacionada con la capacidad proliferativa celular. De igual forma, podemos detectar la expresión de marcadores relacionados con los procesos de senescencia celular, como es hTERT y de apoptosis, como proteínas de la familia de las caspasas o de la familia Bcl.

1.3.3. Ensayos con biosensores de fluorescencia.

Los biosensores son proteínas marcadas con fluorescencia que miden reacciones químicas específicas, las cuales pueden ocurrir tanto dentro de la célula como en su superficie. Este tipo de pruebas permite conocer la viabilidad celular de manera rápida.

Cuando el biosensor se encuentra dentro de una célula viva, el componente proteico del biosensor puede activarse. La activación proteica sucede cuando la proteína sufre una interacción química con la célula. Estas interacciones químicas entre el componente proteico del biosensor y la célula pueden consistir en la unión o liberación de la proteína del biosensor con un ligando, en la participación de la proteína en el montaje y desmontaje de estructuras macromoleculares, en la interacción de la proteína con membranas u orgánulos, o en la participación del componente proteico del biosensor en la conversión catalítica de sustratos de productos metabólicos o macromoléculas.

De una manera u otra, una vez activada la proteína del biosensor, la molécula fluorescente, unida a este componente proteico del biosensor, traduce los cambios ambientales en señales fluorescentes en la proximidad del lugar (Gerstein *et al.*, 1994, Giuliano *et al.*, 1995, Giuliano y Taylor, 1998).

1.3.4. Ensayos morfológicos.

Determinados cambios morfológicos en la célula pueden estar relacionados con su viabilidad (Emilson *et al.*, 1978, Debbage *et al.*, 1998). Los cambios de volumen irreversibles son un indicador de muerte celular debido a la pérdida de proteínas o iones intracelulares, o debido a una alteración de la permeabilidad para el sodio o el potasio (Allen, 1988).

1.3.5. Microanálisis por energía dispersiva de rayos X.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X o microscopía electrónica analítica es una técnica que permite determinar la composición elemental de una muestra en el microscopio electrónico (Warley, 1997), de tal manera que permite correlacionar la información sobre la ultraestructura de la célula con su contenido elemental, y además permite el análisis simultáneo de todos los cationes y aniones con número atómico inferior o igual a 11 ($Z \leq 11$) (Warley, 1990, Warley *et al.*, 1994, Rodríguez-Morata *et al.*, 2008).

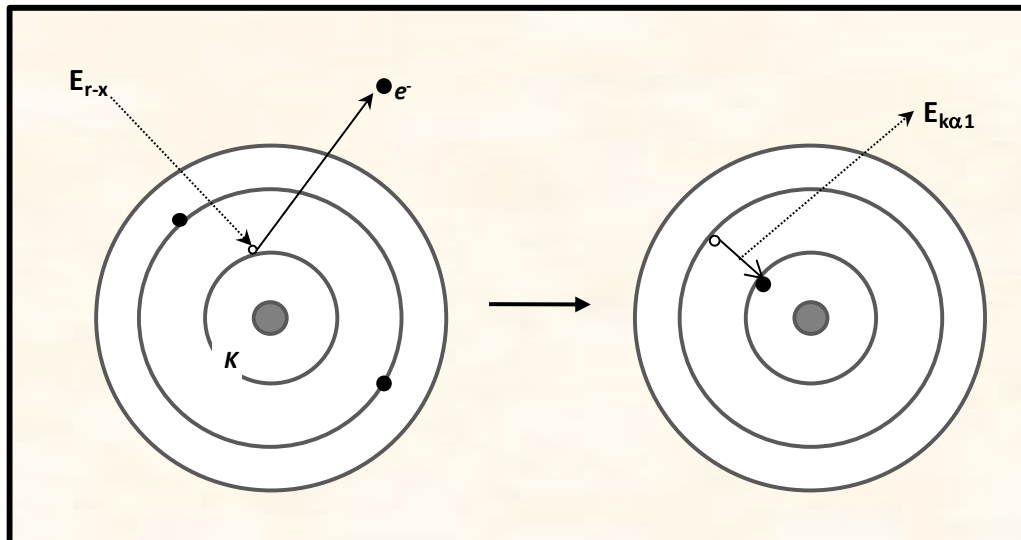


Figura 7. Proceso de ionización de un átomo (E_{r-x} = Energía de rayos X, $E_{k\alpha,1}$ = Energía emitida de rayos X, K = número de orbital).

Cuando un haz de electrones incide sobre los átomos de una muestra, se libera una energía característica que puede detectarse en forma de un espectro de emisión.

Este desprendimiento de energía es igual a la diferencia de energía de los niveles entre los que se produce el salto electrónico y se libera en forma de radiación electromagnética correspondiente a la región de rayos X (Figura 7). Al ser las energías de los distintos niveles electrónicos características para cada tipo de átomo, la radiación X emitida será característica para cada elemento y dependerá del número atómico del elemento.

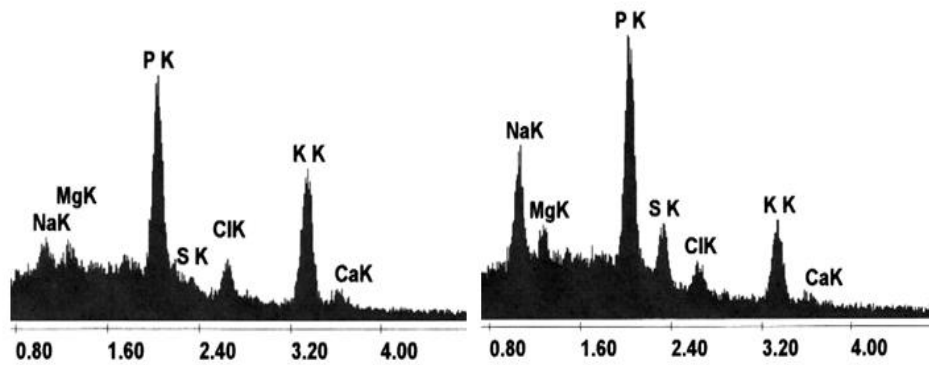


Figura 8. Se muestran dos espectros microanalíticos correspondientes a células del tercer subcultivo del endotelio corneal de un conejo. Cada uno de los picos corresponde a la emisión de energía dispersada por electrones localizados en los orbitales *k* del sodio (NaK), magnesio (MgK), fósforo (PK), azufre (SK), cloro (ClK), potasio (KK) y calcio (CaK) (Alaminos *et al.*, 2007b).

Cada célula analizada posee un determinado *perfil iónico* (Figura 8). En los espectros obtenidos del perfil iónico se pueden observar elementos como fósforo (P), azufre (S), magnesio (Mg), cloro (Cl), calcio (Ca), sodio (Na) y potasio (K). Algunos de los iones determinados por microanálisis juegan un papel crucial en la viabilidad celular, de tal manera que cambios en la concentración de estos iones en una célula pueden correlacionarse con procesos de muerte celular por necrosis o apoptosis (Hongpaisan y Roomans, 1999, Roomans, 2002b). En este contexto, algunos autores han identificado patrones iónicos que son enormemente específicos para las células normales, células en apoptosis y células en necrosis (Sanchez-Quevedo *et al.*, 1989, Roomans, 2002a, Roomans, 2002b, Alaminos *et al.*, 2007, Fernandez-Segura y Warley, 2008). Uno de los indicadores microanalíticos más fiables para monitorizar la viabilidad celular es la ratio entre la concentración intracelular de potasio (K) y sodio (Na) (Warley *et al.*, 1994, Roomans, 2001, Salido *et al.*, 2004).

1.3.6. Determinación del perfil de expresión génica.

El *microarray* o *micromatriz multigénica* es una técnica que permite la evaluación simultánea de un gran número de genes o incluso de un genoma completo en un único experimento (Gress *et al.*, 1992). Recientemente, esta técnica se ha convertido en una nueva herramienta para estudiar algunas propiedades específicas de las células susceptibles de ser utilizadas en Terapia Celular y en Ingeniería Tisular (Schena *et al.*, 1995, Gill, 2003, Jaluria *et al.*, 2007, Jaluria *et al.*, 2008). Por ejemplo, una de las propiedades celulares que se puede evaluar con el *microarray* podría ser la viabilidad celular mediante la identificación de genes relacionados con la mortalidad celular (por ejemplo, genes de apoptosis y anti-apoptosis) (Wong *et al.*, 2006) y, de esta manera, se podría realizar una selección de las células, escogiendo las que tienen un mayor grado de viabilidad. Entre los genes de importancia en términos de viabilidad celular encontramos algunos como BCL2L2, TNFAIP8, BNIP3L y FASTKD2, los cuales están implicados en un complejo equilibrio que regula la entrada de la célula en un proceso de muerte celular por apoptosis.

Existen varios tipos de *microarray*. Entre ellos, los más utilizados y conocidos son los microarrays de expresión génica (Bowtell, 1999). Esta técnica se basa en la detección de ARN mensajeros específicos que están presentes en una muestra biológica en un momento dado. Lo que se pretende realizar es un análisis de la expresión génica de una célula en un momento determinado (Schena, 1996). Para ello, se extrae y purifica el ARN total de dicha muestra mediante métodos enzimáticos y bioquímicos. Posteriormente, el ARN purificado se marca con un pigmento fluorescente (FITC, Cy3 o Cy5), digoxigenina o biotina (Shalon *et al.*, 1996, Lockhart y Winzeler, 2000) para después hibridarlo mediante chips sintetizados previamente que consisten en una matriz de vidrio sobre la que se han depositado,

en lugares previamente conocidos, secuencias génicas que ayudarán a identificar secuencias específicas en la muestra objeto de estudio (Lockhart y Winzeler, 2000).

Además de los *microarrays* de expresión génica, también se han desarrollado los microarrays de ADN, que permiten evaluar el número de copias de cada gen existente en cada célula, así como la presencia de deleciones, mutaciones o ganancias génicas (Wiltgen y Tilz, 2007, Bier *et al.*, 2008). Por ello, este tipo de *microarray* permite realizar un análisis completo del genoma de la célula (genotipificación). Por último, los microarrays de proteínas nos permiten detectar la expresión de proteínas sintetizadas por una célula (Tao *et al.*, 2007).

1.3.7. Combinación de varios métodos.

Debido a la gran variedad de técnicas y ensayos que hay disponibles para la evaluación de la viabilidad celular y al diferente fundamento biológico de cada una de ellas, resulta difícil establecer un método estándar que sea capaz de aportar información fiable sobre el estado biológico de una población celular.

En este sentido, la aplicación de varios métodos de forma combinada nos permitirá obtener información más precisa, fiable y compleja que la que se obtiene usando un único método. Además, la combinación de técnicas con distinto fundamento biológico aporta información sobre la viabilidad celular a distintos niveles. Por ejemplo, la combinación de técnicas de integridad de membrana con técnicas funcionales evalúa el posible compromiso de las funciones celulares tanto a nivel de la membrana como a nivel metabólico intracelular.

Además, la combinación de varios ensayos permite aumentar la sensibilidad y especificidad de los datos una vez que se analizan en conjunto. Incluso, la utilización

de múltiples ensayos permite confirmar los hallazgos obtenidos mediante un método individual, tal y como refiere Stoddart (Stoddart, 2011).

Por todo ello, en las publicaciones que se agrupan en esta Tesis Doctoral, se utiliza un enfoque combinatorio de varias técnicas para evaluar la viabilidad celular. Los datos obtenidos de los diferentes ensayos se pueden normalizar siguiendo la fórmula $Z = (X - \mu)/\sigma$ para poder analizarlos en conjunto, obteniendo un nuevo parámetro global denominado “*Average Cell Viability Levels*” (ACVL)

El estudio de perfiles de viabilidad celular ha sido uno de los principales objetivos de la Ingeniería Tisular en los últimos años, especialmente debido al hecho de que las células en cultivo tienden a experimentar senescencia y a perder viabilidad con los sucesivos pases celulares. Para tal fin, se busca establecer un control de calidad que garantice la capacidad proliferativa y regenerativa de las células utilizadas para la fabricación de tejidos artificiales mediante técnicas de Ingeniería Tisular.

En este contexto, las células endoteliales del cordón umbilical (Rodríguez-Morata et al., 2008), las células endoteliales de la córnea (Alaminos et al., 2007), los fibroblastos de la mucosa oral (Sanchez-Quevedo et al., 2007) o los fibrocondrocitos de la articulación temporo-mandibular humana (Garzon et al., 2012a) han sido recientemente estudiadas y se han determinado sus perfiles de viabilidad de forma exitosa.

Sin embargo, aún no se conocen con detalle los perfiles de viabilidad de otras células que ofrecen posibilidades prometedoras en el área de la Ingeniería Tisular, como son las células madre de la pulpa dental (DPSC) o las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical (WJSC).

Las publicaciones científicas incluidas en esta Tesis Doctoral tratan de evaluar los perfiles de viabilidad celular de estas dos fuentes celulares en cultivo para establecer un control de calidad de las células con las que desarrollar sustitutos artificiales mediante Ingeniería Tisular y, por tanto, un control de calidad de dichos sustitutos desarrollados.

2. HIPÓTESIS

La expansión y el subcultivo secuencial en diferentes tipos de células madre ha puesto de relieve diferencias importantes en lo que se refiere a la viabilidad celular de los diferentes subcultivos. Ello indica que la viabilidad celular de las células madre no es constante, sino que depende del procesamiento, del tiempo, del número de veces que sean subcultivadas, así como del tipo de célula objeto de estudio. La selección de las poblaciones celulares más viables para su utilización en los protocolos de Ingeniería Tisular resulta crítica para el éxito terapéutico.

El conjunto de artículos que comprende esta Tesis Doctoral, pretende evaluar los perfiles de viabilidad celular de dos poblaciones de células madre mesenquimales (MSC) cuyo uso como fuente celular alternativa en Ingeniería Tisular está cada día más extendido: una población de MSC de origen dental, como son las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC), y una población de origen no dental, como son las células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (hWJSC).

Aunque la naturaleza pluripotencial de estas MSC permite prever un alto nivel de viabilidad celular, y aunque ambas poseen características citológicas estructurales y funcionales semejantes, el procesamiento, el tiempo y el número de subcultivos pudieran incidir en el perfil de viabilidad de ambos tipos celulares y determinar, por tanto, patrones de utilización diferentes en los protocolos de Ingeniería Tisular.

3. OBJETIVOS

Las publicaciones agrupadas en esta Tesis Doctoral tienen por objeto el cumplimiento de los siguientes objetivos:

- Aislar y caracterizar células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) y células madre de la gelatina de Wharton humana (hWJSC) para su eventual utilización en protocolos de Ingeniería Tisular.
- Desarrollar un método combinado (ACVL) para la evaluación de la viabilidad de células mesenquimales de origen dental (hDPSC) y no dental (hWJSC) basado en métodos de exclusión de colorantes vitales, ensayos funcionales, técnicas mixtas y microscopía microanalítica por energía dispersiva de rayos X, y evaluar el perfil de viabilidad de ambos tipos celulares a lo largo de distintos subcultivos.
- Identificar y seleccionar el subcultivo celular más adecuado de células madre mesenquimales de origen dental (hDPSC) de acuerdo con el índice ACVL, para su utilización como fuente celular en protocolos de Ingeniería Tisular.
- Identificar y seleccionar el subcultivo celular más adecuado de células madre mesenquimales de origen no dental (hWJSC) de acuerdo con el índice ACVL, para su utilización como fuente celular en protocolos de Ingeniería Tisular.
- Identificar los subcultivos celulares de hDPSC y hWJSC en los que la viabilidad celular no es adecuada para su uso en protocolos de Ingeniería Tisular.

4. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Relación de publicaciones científicas que se agrupan en esta Tesis Doctoral

1. Martin-Piedra MA, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M. Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp. *Actualidad Medica*. 2012. Indexada en Latindex.
2. Garzon I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, García-Honduvilla N, Bujan J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012. Índice de Impacto JCR (2013): 4.254; Cuartil 1.
3. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira ACX, Alfonso-Rodríguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013. Índice de Impacto JCR (2013): 3.100; Cuartil 2.
4. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodríguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014. Índice de Impacto JCR (2013): 3.100; Cuartil 2.

4.1 Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M. Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp. Actualidad Medica. 2012. Indexada en Latindex.

006

ORIGINAL · INVESTIGACIÓN BÁSICA Y CLÍNICA

Actual. Med. (2012) Vol. 97/2012/nº786 · Mayo / Agosto 2012 · Pág.006 - 012

Evaluación de la viabilidad celular y patrones apoptóticos en células madre aisladas de la pulpa dental humana

EVALUATION OF CELL VIABILITY AND APOPTOTIC PATTERNS IN STEM CELLS ISOLATED FROM HUMAN DENTAL PULP

Martín Piedra M. A., Garzón I., Sánchez Quevedo M. C., Alaminos M.

Grupo de Ingeniería Tisular. Departamento de Histología. Facultad de Medicina, Universidad de Granada

Resumen

Introducción: El desarrollo de sustitutos biológicos mediante Ingeniería Tisular requiere de la utilización de una fuente de células madre que, además de ser capaz de autorenovarse y diferenciarse, mantengan una funcionalidad y viabilidad óptima justo en el momento de su uso. El estudio de la viabilidad celular constituye un importante control de calidad, especialmente en aquellas poblaciones celulares con un alto potencial para su utilización en Ingeniería Tisular, como son las células madre de la pulpa dental (DPSC). El objetivo de este trabajo es la evaluación de la viabilidad durante los tres primeros subcultivos de células madre de la pulpa dental humana (hDPSC).

Material y métodos: Se obtuvieron 3 subcultivos consecutivos de hDPSC de terceros molares humanos sanos (N = 3) mediante un proceso de digestión enzimática. La concentración intracelular de los iones sodio (Na), potasio (K), y cloro (Cl) fue determinada mediante microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA). El porcentaje de células en apoptosis (fragmentación de DNA) fue determinado mediante el ensayo de fluorescencia TUNEL en el primer y tercer subcultivo.

Resultados: En el segundo subcultivo se detectó un descenso significativo del potasio ($p = 0,011$) indicando un descenso en la viabilidad celular. En el tercer subcultivo, los niveles de cloro y sodio aumentaron de forma significativa ($p = 0,010$ y $p = 0,002$), generando un perfil iónico compatible con células en estado apoptótico. La fluorescencia a partir del ensayo TUNEL reveló $2,76 \pm 1,80$ % de células apoptóticas en el tercer subcultivo, mientras que en el primer subcultivo, dicha proporción fue de $0,55 \pm 0,27$ %.

Discusión: Las hDPSC se encuentran de forma nativa en la pulpa dental y estas condiciones nativas se pueden alterar cuando pasan a las condiciones de un medio de cultivo in vitro. Estas alteraciones pueden ser la respuesta a un proceso de adaptación. Dicha adaptación, junto con el estrés adicional generado por el tratamiento enzimático realizado para digerir la matriz extracelular, tiene como consecuencia una pérdida transitoria y leve de la viabilidad producida por un mecanismo de apoptosis. En resumen, los 3 primeros subcultivos de hDPSC deberán ser descartados para su uso en ingeniería tisular, por ser células en un estado de apoptosis activa.

Palabras clave: Células madre de la pulpa dental, microanálisis por energía dispersiva de rayos X, viabilidad celular, ingeniería tisular.

Abstract

Introduction: The development of biological substitutes by Tissue Engineering needs the use of a stem cell source able not only to self-replicate and differentiate, but also to maintain optimal functionality and cell viability when used. The evaluation of cell viability is considered an important quality control, especially in cell lineages with high capabilities for being used in tissue engineering, as dental pulp stem cells (DPSC). The aim of this research is to evaluate the cell viability through three human dental pulp stem cells (hDPSC) subcultures.

Correspondencia: Miguel Ángel Martín Piedra
Dpto. de Histología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada
Avda. Madrid, 11. 18071 Granada, España
Email: mmartin@ugr.es

Evaluación de la viabilidad celular

007

Materials and methodology: Three consecutive hDPSC subcultures were obtained from human sound third molars (N = 3) by enzymatic digestion. Intracellular ionic concentration of sodium (Na), potassium (K) and chlorine (Cl) was determined by electron probe X-ray microanalysis (EPXMA). Apoptotic cells percentage (DNA fragmentation) was determined by TUNEL fluorescence assay at first and third subculture.

Results: A significant decrease of potassium was detected at second subculture ($p = 0,011$), suggesting a loss of cell viability. At third subculture, chlorine and sodium statistically increased ($p = 0,010$ y $p = 0,002$), inducing an apoptotic-like ionic profile. Fluorescence from TUNEL assay revealed $2,76 \pm 1,80$ % of apoptotic cells at third subculture, while that ratio was $0,55 \pm 0,27$ % at first subculture.

Discussion: hDPSC are natively stored in the dental pulp and these native conditions may be altered by the *in vitro* cell culture conditions. In this regard, these alterations could be in response to an adaptative process. This adaptative process, besides cell stress as a consequence of an enzymatic treatment for the extracellular matrix digestion, produces a mild and temporary loss of cell viability by apoptosis. In summary, the first, second and third subculture of hDPSC should be discarded for the use in tissue engineering as they are apoptotic.

Key words: Dental pulp stem cells, electron probe X-ray microanalysis, cell viability, tissue engineering.

1. Introducción

Las técnicas de Ingeniería Tisular tienen como objetivo el desarrollo de sustitutos biológicos que puedan restaurar, mantener, o incluso mejorar la función de los tejidos naturales (1-2). Para la producción de dichos tejidos artificiales, se requiere la utilización de células madre; una matriz extracelular tridimensional que permita su crecimiento, proliferación y diferenciación; y también determinados factores de crecimiento inductores(3).

Las células madre son un elemento clave en las terapias de Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular. Las células madre son aquellas que tienen la capacidad de replicarse continuamente así como producir células progenitoras que puedan diferenciarse hacia otros tipos de células (4). En este sentido, se han identificado células madre en prácticamente todos los tejidos adultos (5). Sin embargo, existe la necesidad de buscar nuevas fuentes de células madre cuya obtención sea fácil, poco invasiva y sea factible incluso en individuos de edades avanzadas.

Uno de los nichos recientemente descritos para la obtención de células madre que pueden ser factibles en las aplicaciones de los protocolos de Ingeniería Tisular son los dientes. En el interior de los dientes se localiza un tejido conjuntivo laxo denominado "pulpa dental" responsable de la irrigación e inervación del diente, así como la reparación

de algunos tejidos duros como consecuencia de agresiones externas. Formando parte de la pulpa dental se ha descrito una población de células madre que reciben el nombre de *Dental Pulp Stem Cells* (DPSC), las cuales son células indiferenciadas con muchas similitudes con las células madre mesenquimales obtenidas de la médula ósea (6-7). Ambos tipos de células comparten características propias de células madre mesenquimales como la expresión positiva de CD44, CD90, CD105, CD146, y Stro-1, o la expresión negativa de CD45 (8-9), así como la capacidad de diferenciarse hacia células óseas, cartilaginosas, adiposas, miogénicas y progenitores neurales (10) y de producir tejidos mineralizados tanto *in vitro* como *in vivo*(11-13).

Estudios recientes han demostrado que las células en cultivo tienden a sufrir un proceso de adaptación a las nuevas condiciones ambientales (*in vitro*), así como a entrar en senescencia y perder viabilidad cuando se subcultivan de forma secuencial (14-15). La viabilidad de las células madre de la pulpa humana (hDPSC) ha sido poco estudiada hasta la actualidad. No se ha identificado adecuadamente en qué subcultivo estas células presentan un momento óptimo para su utilización en protocolos de Ingeniería Tisular.

En este sentido, existen una gran variedad de ensayos de viabilidad celular, cada uno de los cuales aporta una información diferente según su fundamento biológico.

008

Miguel Ángel Martín Piedra

Uno de los métodos más interesantes diseñados para evaluar la viabilidad celular es la microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA), la cual no sólo permite una determinación precisa de la viabilidad celular en un momento dado, sino que además puede identificar los mecanismos que conducen a la muerte celular a partir de la cuantificación de los iones que participan de forma importante en la fisiología celular (14-21). La EPXMA, así, nos permite detectar la apoptosis en un estado muy precoz mientras que otras técnicas, como el ensayo de fluorescencia TUNEL (*transferase dUTP Nick end labeling*) son capaces de detectar la apoptosis ya instaurada. En el caso del ensayo TUNEL, la detección de oligonucleótidos, resultados de la fragmentación de ADN, es indicativo de la presencia de apoptosis celular. El objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad de las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) durante los tres primeros subcultivos, mediante microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA) y el ensayo de fluorescencia TUNEL (*transferase dUTP Nick end labeling*).

2. Materiales y métodos

La obtención de células de la pulpa dental se realizó a partir de dientes humanos de adultos jóvenes (18-30 años) extraídos por motivos odontológicos en la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada y siempre bajo la prescripción de un profesional facultativo. Los dientes seleccionados fueron terceros molares maxilares (N = 3) libres de caries y enfermedad periodontal. Una vez realizada la exodoncia, los dientes fueron almacenados en medio de transporte e inmediatamente transportados al laboratorio de Ingeniería Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

Obtención de primocultivos de DPSC

El protocolo utilizado para obtener las hDPSC ya ha sido descrito con anterioridad (7). Los dientes se lavaron con suero salino tamponado con fosfato (Sigma-Aldrich Company, Ltd, UK) y posteriormente se usó una hoja de bisturí estéril para eliminar

cualquier resto de tejido blando sobre la superficie del diente. Se realizó un corte transversal en el diente a nivel de la unión amelo-cementaria con un disco de diamante a baja velocidad e irrigación continua con suero salino tamponado con fosfato. Una vez separada la corona de la raíz dental, se accedió a la cámara pulpar. La pulpa dental fue cuidadosamente retirada usando una lima K-30 de endodoncia (Denstply/Maillefer, Ballaigues, Switzerland) para separar el tejido laxo de las paredes dentinarias. La pulpa extraída se sometió a un proceso de digestión enzimática con una solución de 3 mg/mL de colagenasa tipo I durante 6 horas a 37° C y 5% CO₂. Una vez digerida la matriz extracelular de la pulpa, la solución de colagenasa se centrifugó durante 10 min (1.000 rpm) para obtener un pellet que posteriormente se resuspendió en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de una solución antibiótica que contiene 10.000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomycin y 25 µg/mL de anfotericina B (todos son productos comercializados por Sigma-Aldrich Company, Ltd, UK), obteniéndose así los cultivos primarios.

Obtención de subcultivos

Los cultivos primarios de hDPSC se mantuvieron en condiciones de cultivo celular (37° C y 5% CO₂) cambiando el medio cada 3 días hasta que alcanzaron un estado de confluencia. Para obtener el siguiente subcultivo, las células fueron disociadas mediante un proceso de tripsinización previamente descrito (14). Se utilizó una solución de 0,5 g/L de tripsina bovina y 0,2 g/L de ácido etilendiaminotetraacético (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steimheim, Alemania) durante 4 minutos a 37° C y 5% CO₂. La inactivación de la tripsina se consiguió mediante medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (SBF).

Microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA)

Las hDPSC confluentes se subcultivaron sobre rejillas de oro recubiertas con Pioloform (polivinil butiral) (Ted Pella, Inc., Redding, CA) con una densidad de 5 x 10³ células en cada

Evaluación de la viabilidad celular

009

rejilla, y cultivadas en DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de una solución antibiótica. Tras 24 horas, las rejillas cultivadas con células se lavaron durante 5 segundos en agua destilada fría, y posteriormente secadas y criofijadas mediante inmersión en nitrógeno líquido (22). Las rejillas cultivadas con células criofijadas, fueron deshidratadas durante 24 horas con un E5300 Polaron freezer-drier y posteriormente recubiertas con carbón al vacío antes de ser microanalizadas.

El EPXMA se realizó con la ayuda de un microscopio electrónico de barrido Philips XL30 equipado con un detector para microanálisis EDAX DX-4 y un detector de electrones retrodispersados. Las condiciones analíticas fueron: tilt angle 00, take-off angle 61,348 y una distancia a la muestra de 10 mm. El voltaje de aceleración fue 10 kV. Todos los espectros microanalíticos se realizaron en "spot mode" a 10.000X (equivalente a un punto de 50 nm de diámetro) durante 200 segundos, con un promedio de 500 cuentas por segundo. Todas las determinaciones se realizaron en el área central del núcleo celular. Para determinar el contenido total de los iones potasio (K), cloro (Cl) y sodio (Na) se utilizó el método de la ratio pico/fondo (23-25) tomando como referencia un estándar compuesto por 20% de dextrano y sales inorgánicas en cantidades conocidas(26).

El contenido iónico total es el promedio de la determinación iónica en 50 hDPSC cultivadas de 3 pulpas dentales diferentes, para cada uno de los subcultivos incluidos en este estudio.

Ensayo Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

El ensayo TUNEL se realizó para detectar la fragmentación de DNA mediante el marcado del extremo terminal de oligonucleótidos con un fluorocromo. Las hDPSC fueron cultivadas en portaobjetos tipo Chambers con una concentración de 1×10^4 células por pocillo con DMEM suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1% de antibióticos hasta que se alcanzó la confluencia. En este momento las células fueron lavadas con solución tampón fosfato y fijadas en etanol 70% durante 5

minutos. El ensayo TUNEL se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche, Manheim, Alemania) y los núcleos fueron contrastados con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vectashield mounting médium with DAPI, Vector Laboratoires, Burlingame, California). Las fotografías se realizaron con un microscopio óptico de fluorescencia (Nikon Eclipse 90-i, Nikon Instruments Inc, NY, USA) a 465 nm para la fluoresceína (TUNEL) y 360 nm para el DAPI.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo y un análisis inferencial mediante el test de Wilcoxon usando el software informático SPSS 15 (SPSS Inc, Chicago, USA). El nivel de significación estadística se determinó con $p \leq 0.05$.

3. Resultados

La utilización de los protocolos previamente descritos permitió obtener de manera eficiente 3 subcultivos de células madre de la pulpa dental humana (hDPSC). Las células cultivadas presentaron un citoplasma elongado y fusiforme con un núcleo elíptico y central (Fig. 1).

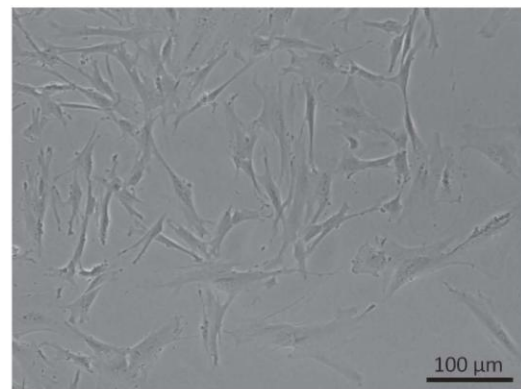


Figura 1: Microfotografía de hDPSC en cultivo tras una semana (10X). Las células cultivadas presentaron un citoplasma elongado y fusiforme con un núcleo elíptico y central.

La concentración intracelular de iones como sodio (Na), potasio (K) o cloro (Cl), determinada mediante EPXMA, mostró cambios entre los diferentes subcultivos (Tabla 1). El sodio intracelular se mantuvo constante durante los

dos primeros subcultivos, mientras que en el tercer subcultivo aumentó de forma significativa hasta $77,19 \pm 35,35$ mmol/Kg ($p = 0,010$).

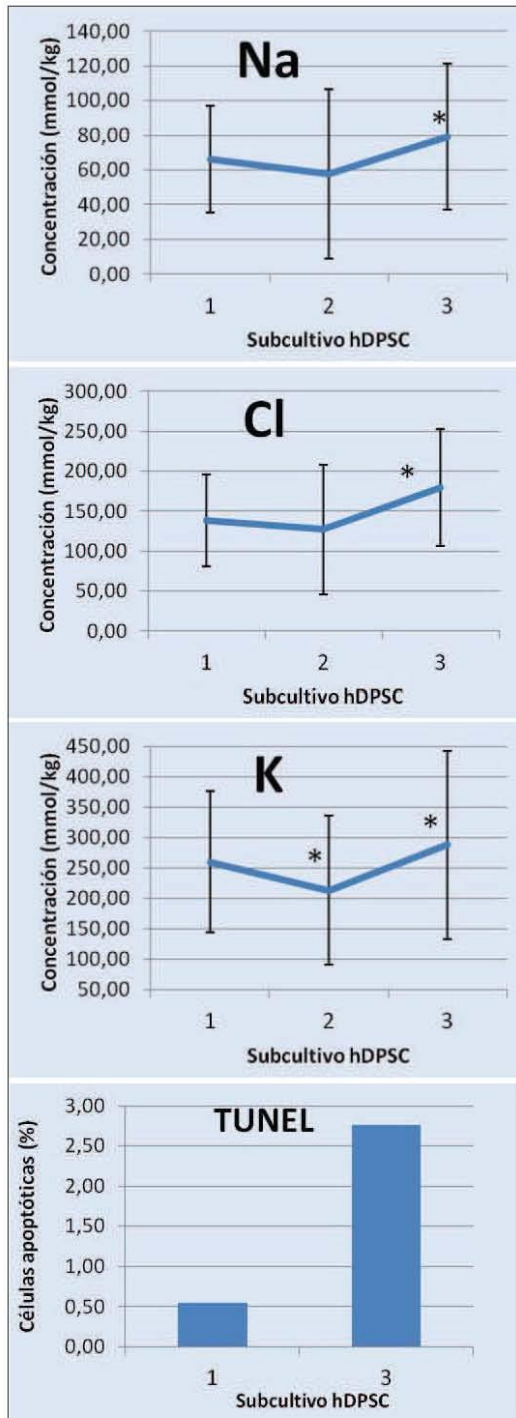


Figura 2. Concentración intracelular de los iones sodio (Na), cloro (Cl) y potasio (K). Porcentaje de células en apoptosis detectadas mediante el ensayo *Transferase dUTP Nick-End-Labeling* (TUNEL).

La determinación intracelular de cloro se incrementó significativamente en el último subcultivo, alcanzado valores de $126,73 \pm 80,59$ mmol/Kg ($p = 0,010$). El ion potasio disminuyó su concentración a $212,74 \pm 122,20$ mmol/Kg ($p = 0,011$) en el segundo subcultivo. En el tercer subcultivo, la concentración intracelular de potasio aumentó de forma significativa hasta $281,46 \pm 96,68$ mmol/Kg ($p = 0,002$) (Fig. 2)

El ensayo de TUNEL (*Transferase dUTP Nick End Labeling*) mostró una mayor proporción de células en apoptosis en el tercer subcultivo ($2,76 \pm 1,80$ %) en relación al primer subcultivo de hDPSC ($0,55 \pm 0,27$ %) (Fig. 3).

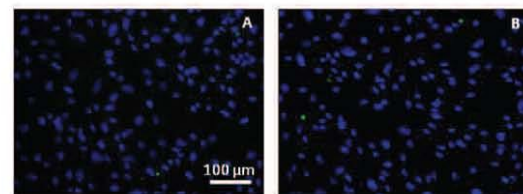


Figura 3. Microfotografías de hDPSC (10X) marcadas mediante el ensayo *Transferase dUTP Nick-End-Labeling* (TUNEL). En verde, el núcleo de las células en apoptosis (fragmentación de DNA). En azul, el núcleo de células viables (DAPI).

Subcultivo		EPXMA			TUNEL
		Na (mmol/kg)	K (mmol/kg)	Cl (mmol/kg)	(% apoptosis)
1	Media	66,49	259,51	138,11	0,55
	Desviación	30,76	116,07	57,20	0,27
2	Media	57,83	212,74	126,93	-
	Desviación	48,97	122,20	80,59	-
3	Media	79,19	287,46	179,45	2,76
	Desviación	42,19	154,85	72,87	1,80

Tabla 1: Resultados de la cuantificación de la concentración intracelular de iones sodio (Na), cloro (Cl), y potasio (K) y del porcentaje de células apoptóticas en subcultivos de hDPSC.

4. Discusión

El desarrollo de tejidos artificiales mediante Ingeniería Tisular requiere de la utilización de una fuente de células madre que, además de presentar la capacidad de proliferación, auto-renovación y multipotencialidad, tengan un estado funcional compatible con la realización de dichas funciones en el preciso momento de

Evaluación de la viabilidad celular

011

su utilización; esto es, que se empleen células en un momento de viabilidad óptimo, tratando de descartar aquellos subcultivos celulares en los que las células muestran signos de senescencia o de muerte celular.

La evaluación de la viabilidad de una población celular sirve, por tanto, como un procedimiento de control de calidad para establecer el momento óptimo de utilización de dichas células para el desarrollo de sustitutos biológicos. Entre las técnicas que clásicamente se han utilizado para evaluar la viabilidad celular se encuentra el test de exclusión con azul tripán, ya que se trata de un ensayo rápido, sencillo y que no requiere de mucho instrumental técnico. Sin embargo, este tipo de métodos son poco sensibles ya que basan su resultado en la integridad de la membrana plasmática, detectando la muerte celular sólo en estadios avanzados en los que se produce la disrupción de dicha membrana(14, 27)

El desarrollo de nuevas técnicas, basadas en diferentes aspectos de la biología celular ha permitido la monitorización de la viabilidad celular de una forma mucho más sensible y precisa, lo que permite una detección más fiable de cualquier cambio que pueda surgir en una determinada población celular durante diferentes subcultivos consecutivos.

El objetivo de este trabajo es evaluar, mediante ensayos de viabilidad de alta sensibilidad, la adaptación de las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC) de un ambiente *in vivo* a un ambiente *in vitro* (*ex vivo*), mediante la monitorización de su viabilidad celular durante los 3 primeros pases utilizando una técnica altamente sensible como el microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA). Los resultados muestran una disminución significativa de la concentración intracelular de potasio en el segundo pase ($p = 0,011$), acompañada de una disminución en los niveles del ion cloro, mientras que el sodio se mantuvo estable. Este perfil iónico es típico de una población celular en un estado pre-apoptótico (21, 26, 28) en el cual, el potasio y el cloro inicialmente disminuyen su concentración, como consecuencia de la contracción pre-apoptótica, seguido de un incremento significativo posterior de cloro ($p = 0,010$) y de sodio ($p = 0,010$), tal y como reflejan los resultados obtenidos en este estudio. El aumento de células apoptóticas detectadas mediante el ensayo TUNEL (*transferase dUTP*

nick end labeling) en el tercer pase confirma el estado pre-apoptótico de las hDPSC en el segundo pase, y el establecimiento de dicha apoptosis (fragmentación de DNA) en el tercer pase.

Estos resultados están en concordancia con otros trabajos previos realizados mediante EPXMA sobre diferentes poblaciones celulares adultas y diferenciadas (14, 17), e incluso sobre células madre mesenquimales como las células madre de la gelatina de Wharton (15). Estudios recientes han relacionado este perfil iónico microanalítico con la expresión de algunos genes pro-apoptóticos como BNIP3L o FASTKD2(15).

Esta disminución de la viabilidad celular durante los primeros pases, mediada por un mecanismo de apoptosis, puede ser consecuencia del proceso de adaptación celular a las condiciones de cultivo celular (*in vitro*). Además, el método de aislamiento y obtención del primocultivo celular requiere de una digestión enzimática que, además de eliminar la matriz extracelular, podría afectar a la funcionalidad de la membrana plasmática durante los primeros pases, generando un perfil iónico intracelular muy similar al obtenido en este estudio(29-30).

Este estudio se ha realizado sobre los tres primeros subcultivos de hDPSC con el objetivo de evaluar la viabilidad de estas células durante la adaptación a un medio de cultivo *in vitro*. Sería conveniente la realización de estudios similares en siguientes subcultivos con la finalidad de establecer una curva de viabilidad más completa en el tiempo, así como determinar el subcultivo en el que la tasa de apoptosis sea mínima y la viabilidad celular sea óptima.

En resumen, la identificación de la curva de viabilidad celular establece un importante control de calidad, ya que nos permitirá detectar aquellos subcultivos que tengan una mayor funcionalidad como los más apropiados para su uso en Ingeniería Tisular y Terapia Celular. De la misma manera, esta metodología nos permitirá descartar la utilización para estos fines de aquellos pases con menor viabilidad o en proceso de muerte celular. En este sentido, los tres primeros subcultivos de hDPSC deberán ser descartados para su uso en Ingeniería Tisular, por ser células en un estado de apoptosis activa.

012

Miguel Ángel Martín Piedra

Referencias

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
2. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008;36(6):379-86.
3. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998;16(3):247-52.
4. Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev* 2004;13(5):452-5.
5. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003;5(5):362-9.
6. Gronthos S, Brahmi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002;81(8):531-5.
7. Gronthos S, Mankani M, Brahmi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625-30.
8. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 2011;136(4):455-73.
9. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005;8(3):191-9.
10. Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med* 2007;1(2):128-35.
11. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008;4(1):21-6.
12. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, 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(8):1394-402.
13. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006;206(3):693-701.
14. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JJ, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* 2007;211(3):692-8.
15. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Camiel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy. *Tissue Eng Part C Methods* 2012.
16. Fernandez-Segura E, Warley A. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol* 2008;88:19-43.
17. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Hondurilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* 2008;22(3):440-8.
18. Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* 2002;3:1-8.
19. Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* 1994;18(9):915-6.
20. Warley A, Stephen J, Hockaday A, Appleton TC. X-ray microanalysis of HeLa S3 Cells. I. Instrumental calibration and analysis of randomly growing cultures. *J Cell Sci* 1983;60:217-29.
21. Zierold K, Hentschel H, Wehner F, Wessing A. Electron probe X-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cryofixation. *Scanning Microscop Suppl* 1994;8:117-26; discussion 26-7.
22. Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol* 1985;248(1 Pt 1):C154-64.
23. Boekestein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J Microsc* 1984;134:327-34.
24. Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* 1997;21(10):665-9.
25. Statham PJ, Pawley JB. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microscopy* 1978;1:469.
26. Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* 1990;157(Pt 2):135-47.
27. Rodriguez IA, Lopez-Gonzalez G, Rodriguez MA, Campos-Sanchez F, Alaminos M. Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical X-ray microanalysis. *J Adhes Dent* 2011;13(4):375-81.
28. Zierold K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;144(1):70-6.
29. Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol* 1999;276(3 Pt 1):G591-8.
30. Van Landuyt KB, Jones EA, McGonagle D, Luyten FP, Lories RJ. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther* 2010;12(1):R15.

4.2 Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy.

Garzon I, Pérez-Köhler B, Garrido-Gómez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, García-Honduvilla N, Bujan J, Campos A, Alaminos M. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012. Índice de Impacto JCR (2013): 4.254; Cuartil 1.

TISSUE ENGINEERING: Part C
Volume 18, Number 6, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tec.2011.0508

Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy

Ingrid Garzón, D.D.S., Ph.D.,¹ Barbara Pérez-Köhler, B.Sc.,² Juan Garrido-Gómez, M.D., Ph.D.,³
Victor Carriel, M.D., Ph.D.,¹ Renato Nieto-Aguilar, D.D.S., Ph.D.,¹ Miguel Angel Martín-Piedra, D.D.S.,¹
Natalio García-Honduvilla, B.Sc., Ph.D.,² Julia Buján, B.Sc., M.D., Ph.D.,²
Antonio Campos, M.D., Ph.D.,¹ and Miguel Alaminos, M.D., Ph.D., B.Sc., Ph.D.¹

Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells (HWJSCs) are gaining attention as a possible clinical source of mesenchymal stem cells for cell therapy and tissue engineering due to their high accessibility, expansion potential, and plasticity. We employed a combination of highly sensitive techniques to determine the average cell viability levels and proliferation capabilities of 10 consecutive cell passages of cultured HWJSCs and then used RNA microarrays to identify genes associated with changes in cell viability levels. We found an initial decrease in cell viability from the first to the third cell passage followed by an increase until the sixth passage and a final decrease from the sixth to tenth cell passages. The highest cell viability levels corresponded to the fifth and sixth passages. The intracellular ionic contents of potassium, sodium, and chlorine suggest that the lower cell viability levels at passages 2, 3, and 8–10 may be associated with apoptotic cell death. In fact, gene expression analysis revealed that the average cell viability was significantly associated with genes with a function in apoptotic cell death, especially pro-apoptotic *FASTKD2*, *BNIP3L* genes and anti-apoptotic *TNFAIP8* and *BCL2L2* genes. This correlation with both pro-apoptotic and anti-apoptotic genes suggests that there may be a complex live-death equilibrium in cultured HWJSCs kept in culture for multiple cell passages. In this study, the highest cell viability levels corresponded to the fifth and sixth HWJSC passages, suggesting that these passages should be preferentially employed in cell therapy or tissue engineering protocols using this cell type.

Introduction

THE UMBILICAL CORD is a major source of nonembryonic stem cells with high proliferation and differentiation capabilities.^{1–3} Among these, mesenchymal stem cells (MSCs) can be isolated for culture from umbilical cord blood⁴ or from Wharton's jelly. Human Wharton's jelly stem cells (HWJSCs) are considered to have an elevated differentiation potential⁵ and telomerase activity⁶ and a low expression of class I and II major histocompatibility complex antigens,^{7,3} making them excellent candidate cells for the generation of artificial tissues by tissue engineering and for use in cell therapy protocols.

Various *in vivo* studies have examined the usefulness of HWJSC to treat different diseases,^{5,8} but the results have been controversial. One possibility is that the stem cells used in some of these studies did not have adequate cell viability levels, which are not usually measured by authors using highly sensitive methods. Only viable cells are suitable for clinical or research utilization, and the effectiveness of most cell therapy and tissue engineering protocols is strongly de-

pendent on the availability of an adequate source of viable and functional cells.^{9,10} One of the key factors in the viability of cultured cells is the cell passage at which they are clinically utilized; thus, some cell cultures established from newborn tissues tend to show a slow proliferation rate beyond the fifth passage.¹¹ However, the cell viability of HWJSCs kept in culture has not been determined to date, and sequential changes that may take place in consecutive cell passages are poorly understood.

Various methods have been used to determine the viability of different cultured cell types. They include techniques that determine permeability alterations in the cell membrane by using trypan blue or other vital dyes,¹² but these are not sufficiently accurate to detect and predict early cell damage, only identifying cell alterations once they have become irreversible. One of the most sensitive and accurate viability assays uses electron-probe X-ray microanalysis to quantify the intracellular contents of the major cell elements, especially potassium (K), sodium (Na), and chlorine (Cl).^{13–16} This highly sensitive technique also allows the simultaneous

¹Department of Histology (Tissue Engineering Group), University of Granada, Granada, Spain.

²Department of Medical Specialities, Networking Research Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), University of Alcalá, Madrid, Spain.

³Division of Traumatology, University Hospital San Cecilio, Granada, Spain.

WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

409

analysis of the intracellular ionic concentrations and ultrastructure of the cells.^{15,17,18} The use of this method has permitted accurate measurement of the intracellular ionic composition of several cell types, including U937,¹⁹ MCF7²⁰ and K562¹⁸ cell lines, and primary cell cultures of human oral mucosa keratinocytes,²¹ umbilical cord endothelial cells,¹⁰ and rabbit cornea endothelial cells.⁹

The recent development of microarray techniques that quantify the expression levels of thousands of genes in a single experiment allows cell viability to be evaluated from a genetic standpoint. Specific cell properties, including toxic stress response and cell viability, can be quantified by using microarrays to measure gene expression levels.²²⁻²⁶

With this background, the aim of this study was to identify the most viable subcultures of HWJSC for use in cell therapy and tissue engineering by means of classical and highly sensitive methods.

Materials and Methods

Isolation and culture of HWJSC

Human umbilical cords were obtained from full-term newborns delivered by cesarean section ($n=10$). After delivery, the umbilical cords were handled under sterile conditions in a tissue bank. Arteries and veins were surgically removed to prevent red blood cell contamination, and small explants of Wharton's jelly were obtained. These explants were then digested in type I collagenase (Gibco BRL Life Technologies) and trypsin 0.5 g/L-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 0.2 g/L solution (Gibco BRL) for isolation of the stromal cells. Once isolated, HWJSCs were cultured in 75 cm² culture flasks in Amniomax[™] culture medium (Gibco BRL) as previously described.¹ Cell cultures were maintained at 37°C in a humidified incubator with a 5% CO₂ atmosphere. The culture medium was changed once every 3 days, and cell growth was monitored every 12 h by ocular inspection using a phase-contrast light microscope. Once the cells reached subconfluence (42,000 ± 13,500 cells per cm²), cell cultures were trypsinized using trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution at 37°C for 8 min. The number of days between consecutive passages depended on the time taken by the cells to reach subconfluence (mean 5.8 ± 2.6 days between passages), plating subcultured cells in new flasks at a density of 13,333 cells per cm² (1,000,000 cells per flask of 75 cm² of surface). We used identical conditions (culture plates, culture medium, and cell incubator) for all subcultures. The cells were kept in culture for ten consecutive passages (P1 to P10).

Ethical approval for this experimental protocol was granted by the Institutional Ethical and Research Review Board. Parents or guardians of all newborns provided written consent for their inclusion in this study.

Cell proliferation analysis

First, cell proliferation was assessed by means of a highly sensitive Real-Time Cell Analyzer (RTCA; XCELLigence, Roche Applied Science). This analyzer uses sensor electrodes that measure the electronic impedance of cultured cells, yielding the Cell Index (unit-less parameter) to measure the relative change in electrical impedance and represent the cell status. The Cell Index is calculated by dividing the imped-

ance change by a background value and is dependent on the number of cultured cells, because the impedance increases with more cells on the electrodes. In our assays, 30,000 HWJSCs per cm² were cultured on 96-well plates with attached microelectrodes and analyzed for 100 h. All determinations were carried out using duplicates. Data were analyzed using XCELLigence software.

Cell proliferation and viability were then measured by using the water-soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) colorimetric assay on 10 consecutive cell passages of HWJSC (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche Diagnostics). WST-1 is a tetrazolium dye containing an electron coupling reagent that is cleaved by the mitochondrial dehydrogenase enzyme to a formazan dye. The reaction directly correlates with the number of metabolically active proliferating cells and can serve as a marker of cell viability and cell proliferation. For this analysis, 20,000 cells were seeded per well in a 96-well plate with 100 µL of culture medium. After 24 h, the medium was replaced with fresh medium containing 1/10 volume of cell proliferation reagent WST-1 and incubated for 4 h at 37°C before the absorbance at 450 nm was quantified in a spectrophotometer. Cells incubated for 15 min in 1% triton-X were used as controls. The data presented are from five separate experiments.

Cell viability analysis

The percentage of live and dead cells in each cell passage was determined by means of the trypan blue dye exclusion test. Briefly, each subconfluent cell culture was trypsinized with trypsin 0.5 g/L-EDTA 0.2 g/L solution for 8 min at 37°C, and the detached cells were harvested by centrifugation and resuspended in 1 mL of culture medium. Then, 100 µL of the cell suspension were mixed with 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich ref. T8154) and incubated for 5 min. at room temperature. Finally, we quantified the number of white and blue cells by using a Neubauer chamber in a Nikon Eclipse 90i light microscope to count a minimum of 200 cells per cell passage, enabling calculation of the percentage of live and dead cells. All cell counts were done in quadruplicate, and median values and means (with standard deviations) were calculated for each cell passage.

For the LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assay in each cell passage, 10,000 HWJSCs were cultured on chamber slides (Lab-Tek Chamber Slides, Nunc) and allowed to attach to the bottom for 24 h. Then, cells were washed twice with PBS and stained with the LIVE/DEAD[®] assay reagents (calcein/AM and ethidium homodimer-1; Invitrogen) following the protocols supplied by Invitrogen. Finally, the number of live (green) and dead (red) cells was determined by using a fluorescence microscope. These experiments were carried out in quadruplicate, and the mean percentage of live cells was calculated for each cell passage.

For electron-probe X-ray microanalysis, subconfluent HWJSCs were subcultured using trypsin-EDTA on plated gold grids coated with a thin layer of Pioloform (polyvinyl butyral) (Ted Pella, Inc.) following previously published methods.^{9,21,27} Cells were seeded at a density of 5000 cells per grid and cultured in Amniomax medium. After 24 h of culture on the Pioloform-coated gold grids, support grids containing the HWJSCs were washed in ice-cold distilled water for 5 s to remove the extracellular medium. After

washing, excess water was drained from the surface, and the grids were immediately plunge-frozen in liquid nitrogen.¹⁸ After cryofixation, the grids were placed in a precooled aluminum specimen holder at liquid nitrogen temperature and freeze dried at increasing temperatures for 24 h in an E5300 Polaron freezer-drier apparatus equipped with a vacuum rotatory pump system. Freeze-dried gold grids were carbon coated in a high-vacuum coating system and micro-analyzed within 6 h. Electron probe X-ray microanalysis of the specimens was performed with a Philips XL30 scanning electron microscope (SEM) equipped with an EDAX DX-4 microanalytical system and a solid-state backscattered electron (BSE) detector. The samples were examined by SEM with a combination of secondary electron and BSE imaging modes. For X-ray microanalysis, the analytical conditions were tilt angle 08, take-off angle 61.348, and working distance 10 mm. The acceleration voltage was 10 kV. All spectra were collected in the spot mode at 10,000 \times (equivalent to 50 nm spot diameter) for 200 s live time, and the number of counts per second recorded by the detector was around 500. All determinations were performed on the central area of the cell nucleus. To determine total ion content, we used the peak-to-local-background ratio method²⁸ with reference to standards composed of 20% dextran containing known amounts of inorganic salts.²⁹ In this study, we analyzed the ionic content of 25 HWJSCs corresponding to each cell passage (P1 to P10) using cells from four different umbilical cords. Controls were human fibroblasts isolated from oral mucosa biopsies (highly viable cells) and the same cells treated with 10 mM HEMA, a known inductor of cell apoptosis³⁰ (cells with low viability levels).

Flow cytometry

To evaluate the expression of key MSC markers on the different HWJSC cultures used in this study, cells corresponding to passages P1, P3, P6, and P9 were analyzed using anti-CD90-Allophycocyanin conjugated (CD90-APC) and anti-CD45-Phycoerythrin conjugated (CD45-PE) antibodies (R & D Systems, Inc.). Samples containing 0.5×10^6 cells were placed in flow cytometry tubes, washed with 2 mL of staining buffer (R & D Systems, Inc.), and Fc receptors were then blocked by incubating the cells for 5 min with 2 mL of PBS 1 \times containing 0.1% BSA and 0.1% FBS. Next, cells were stained with the antibodies and isotype controls in different tubes and incubated for 45 min at 4°C in darkness. Cells were washed with 2 mL of staining buffer, and samples were immediately acquired on an FACS CALIBUR Flow Cytometer.

Multilineage cell differentiation analysis

The multilineage differentiation potential of isolated HWJSCs was confirmed by subculturing primary HWJSC cultures on chamber slides and inducing differentiation to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages by using specific conditioning media as previously described.³¹ Then, cell differentiation was assessed by cytochemical histological staining, staining samples with 2% Alizarin Red S for 5 min at room temperature to detect the osteoblastic phenotype and identify any signs of mineralization. Chondrogenesis was confirmed by mucopolysaccharide staining using Alcian Blue solution (1% alcian blue 8GX and 3% glacial acetic acid, pH adjusted to 2.5). Adipogenic differ-

entiation was identified by Oil Red O staining (0.7 mg in 100 mL of propylene glycol) for 5 min at 60°C. All these cell differentiation assays were carried out at selected passages (P1, P3, P6 and P9) to ascertain that HWJSCs retain their stem cell nature throughout the ten cell passages.

Microarray analysis

Total RNA was isolated from three different samples corresponding to three different individuals at each HWJSC passage (P1 to P10) by using the Qiagen RNeasy SystemTM. Total RNA was converted into cDNA using a reverse-transcriptase (Superscript II, Life Technologies, Inc.) and T7-oligo(dT) primer. Subsequently, biotinylated cRNA was generated by using a T7 RNA polymerase and biotin-11-uridine-5'-triphosphate (Enzo Diagnostics). Labeled cRNA were chemically fragmented to facilitate the hybridization process and hybridized to Affymetrix Human Genome U133 plus 2.0 oligonucleotide arrays for 6 h at 45°C. Finally, all expression values were normalized using the software provided by Affymetrix to obtain comparable data and to identify present (expressed) and absent (unexpressed) genes at each cell passage. All expression data are publically available at the public functional genomics data repository supporting minimum information about a microarray experiment (MIAME)-compliant data submissions GeneExpressionOmnibus (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30391).

Once expression levels were obtained for all probe sets, all genes with apoptosis-related function were selected by using the information supplied by Affymetrix. In addition, all MSC markers proposed by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy³² were selected and analyzed at each cell passage (CD105, CD73, CD90, CD11B, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79A, and HLADR) along with the cell proliferation markers, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and MKI67.

Statistical analysis

The nonparametric Friedman test was used to evaluate the statistical significance of differences among the 10 cell passages analyzed. Pair-wise comparisons between two successive cell subcultures were carried out using the nonparametric Wilcoxon's test. A Bonferroni-adjusted significance level of ≤ 0.001 was considered for multiple comparisons, because up to 48 statistical comparisons were performed simultaneously using the Wilcoxon's test. The Spearman correlation test was used to establish correlations between distributions corresponding to cell viability and cell proliferation. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 16.00 software package was used for the statistical analysis.

In order to calculate average cell viability levels (ACVLs) for each cell passage, the raw cell viability values determined by trypan blue, WST-1, LIVE/DEAD,[®] and K/Na index were first normalized to z-scores (mean = 0 and standard deviation = 1) using the formula: $Z = (X - \mu) / \sigma$, where μ is the average cell viability obtained for each method, X is the specific cell viability for a particular cell passage, and σ is the standard deviation for each method. Then, mean z-scores values were obtained for each of the 10 cell passages analyzed.

For the microarray analysis, we used the Pearson (r) correlation test to determine the correlation between each probe set and the ACVL for each cell passage. All genes

WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

411

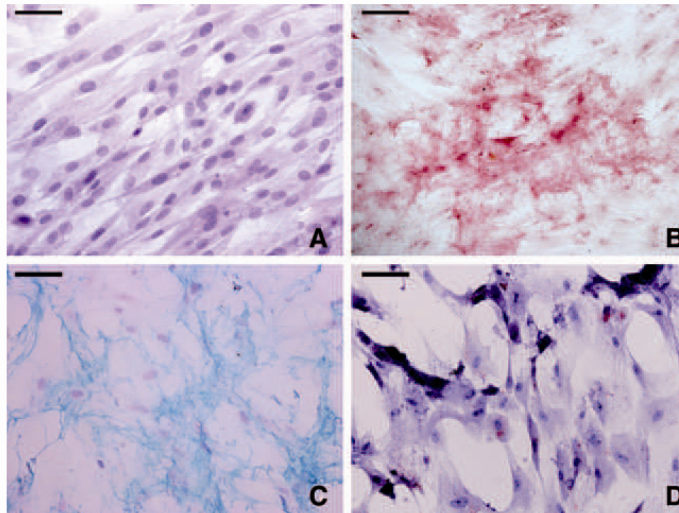


FIG. 1. Multi-lineage differentiation capabilities of the cultured HWJSCs at cell passage P1. **(A)** Undifferentiated control HWJSCs (H&E staining). **(B)** HWJSCs differentiated to the osteogenic cell type showing positive calcium deposits by alizarin red staining. **(C)** Differentiation to the chondrogenic phenotype (alcian blue staining). **(D)** Adipogenic differentiation (oil red O). Scale bars: 50 µm. HWJSCs, Wharton's jelly stem cells. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

with an absolute r correlation coefficient >0.700 were selected as being statistically significant. Gene Ontology (GO) analysis of the selected genes was performed using BiNGO (www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/), a plug-in for the Cytoscape program.³³ The set of selected genes was tested for enrichment of any GO category in comparison to all annotated genes represented in the array. Scores were evaluated based on the hypergeometric distribution and using Bonferroni correction for multiple testing.³⁴ To identify apoptosis-related genes whose expression was significantly associated with the ACVL at the different cell passages, we first selected all probe sets with a role in apoptosis or anti-apoptosis by using the information provided by Affymetrix. These apoptosis-related genes were then analyzed with version 3.09b of the significance analysis of microarrays (SAM) software of Stanford University, using a δ value that permitted a false discovery rate of 0 (i.e., no genes are falsely named). A multiclass analysis of genes associated with the ACVLs was performed. The program is available at www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/.

Results

Culture and characterization of HWJSCs isolated from human umbilical cord

Histological evaluation of HWJSC cultures from human umbilical cord revealed that the cells were adherent and displayed a typical mesenchymal morphology, with spindle and star-shaped cells. Specific conditioning media were used to efficaciously differentiate the isolated HWJSCs in this study to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages, as determined by alizarin red S, alcian blue, and oil red O staining, respectively, at all cell passages analyzed (P1, P3, P6, and P9). Illustrative examples of the multi-lineage differentiation capability of HWJSCs at the first passage are shown in Figure 1. Microarray analysis of specific MSC markers showed high expression of *CD105*, *CD73*, and *CD90* and no expression of *CD11B*, *CD14*, *CD19*, *CD34*, *CD45*, *CD79A*, and *HLADR* at all 10 cell passages (P1 to P10; Table 1). Flow cytometry study confirmed the high expression of *CD90* and the absence of *CD45* expression in HWJSCs corresponding to the first, third, sixth, and ninth cell passages (Fig. 2).

TABLE 1. mRNA EXPRESSION OF RELEVANT MSC MARKERS AS DETERMINED BY MICROARRAY IN WHARTON'S JELLY STEM CELLS AT PASSAGES 1 TO 10 (P1 TO P10)

GENE	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
<i>CD105</i>	143.0 (P)	138.2 (P)	155.2 (P)	176.0 (P)	177.3 (P)	132.1 (P)	150.2 (P)	245.4 (P)	198.5 (P)	243.7 (P)
<i>CD73</i>	598.1 (P)	847.5 (P)	1052.5 (P)	1167.4 (P)	1205.9 (P)	892.3 (P)	1184.5 (P)	1519.1 (P)	1553.1 (P)	1785.2 (P)
<i>CD90</i>	2126.9 (P)	1438.8 (P)	1572.0 (P)	1783.5 (P)	1564.7 (P)	1416.3 (P)	2237.6 (P)	1874.2 (P)	1735.8 (P)	1732.5 (P)
<i>CD11B</i>	8.5 (A)	10.9 (A)	7.0 (A)	9.5 (A)	10.9 (A)	9.9 (A)	12.6 (A)	4.5 (A)	11.6 (A)	16.9 (A)
<i>CD14</i>	23.6 (A)	10.8 (A)	5.3 (A)	7.7 (A)	3.9 (A)	3.6 (A)	1.5 (A)	1.6 (A)	4.7 (A)	5.8 (A)
<i>CD19</i>	5.1 (A)	6.9 (A)	6.9 (A)	6.4 (A)	4.9 (A)	4.7 (A)	7.3 (A)	7.3 (A)	7.0 (A)	3.1 (A)
<i>CD34</i>	12.0 (A)	9.3 (A)	11.0 (A)	9.2 (A)	14.1 (A)	8.6 (A)	9.7 (A)	8.1 (A)	14.6 (A)	24.3 (A)
<i>CD45</i>	3.4 (A)	3.4 (A)	2.5 (A)	2.8 (A)	3.0 (A)	4.4 (A)	2.9 (A)	5.0 (A)	5.3 (A)	3.4 (A)
<i>CD79A</i>	28.5 (A)	33.7 (A)	22.7 (A)	38.2 (A)	29.0 (A)	31.5 (A)	38.2 (A)	23.5 (A)	25.7 (A)	24.2 (A)
<i>HLADR</i>	7.9 (A)	11.2 (A)	8.6 (A)	8.0 (A)	7.5 (A)	8.9 (A)	7.1 (A)	9.2 (A)	7.8 (A)	8.3 (A)

It shows the mean expression of each marker at each cell passage. A, absent gene expression; P, present gene expression (by Affymetrix array).

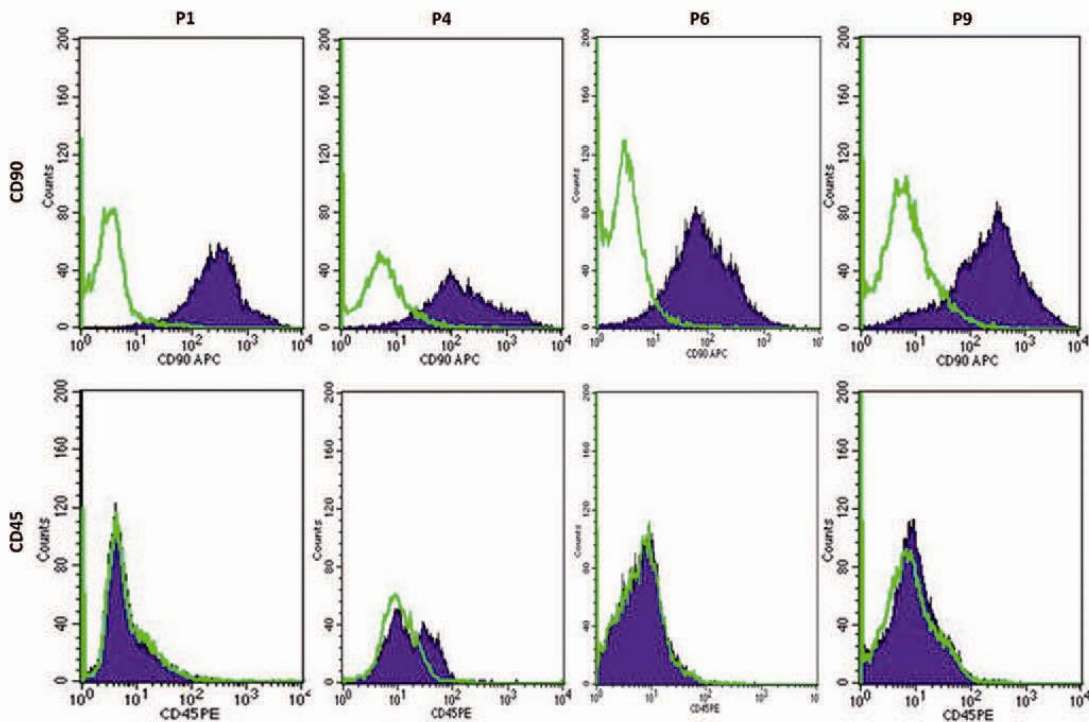
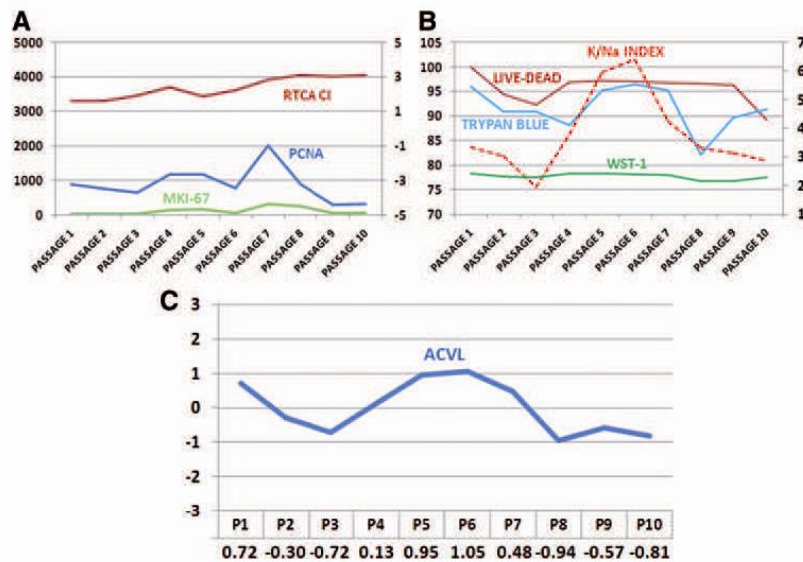


FIG. 2. Flow cytometry analysis of *CD90* (positive MSC marker) and *CD45* (negative MSC marker) in HWJSCs at passages P1, P4, P6, and P9. Cells showing positive expression of each marker are shown in blue; green lines show the expression of cells labeled with the control isotypes. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

FIG. 3. Analysis of cell proliferation and cell viability of 10 successive passages of HWJSC. (A) Cell proliferation as determined by RTCA Real-Time Cell Analysis Cell Index (RTCA CI) and microarray analysis of *PCNA* and *MKI-67*. (B) Cell proliferation as determined by electron-probe X-ray microanalysis (potassium/sodium index), trypan blue exclusion analysis, LIVE/DEAD® Cell Viability Assay, and WST-1. (C) Average cell viability level (ACVL). WST-1, water-soluble tetrazolium salt-1. Color images available online at www.liebertonline.com/tec



WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

Cell proliferation analysis of ten consecutive cell passages of HWJSC

Microarray expression analysis of PCNA and MKI67 genes showed no significant differences from the first to the tenth cell passage (Fig. 3).

Application of highly sensitive RTCA revealed a highly similar Cell Index in all 10 subcultures analyzed (Table 2 and Fig. 3). According to the WST-1 assay results, the HWJSC proliferation index tended to remain stable over the 10 cell passages, with no statistically significant differences among the passages (Table 2 and Fig. 3).

Sequential cell viability analysis of HWJSCs

Trypan blue staining showed that the cell viability of the successive HWJSC subcultures was in general very high, with >82% viable cells at each of the 10 cell passages analyzed (Fig. 3 and Table 2). No significant differences were observed among the different cell passages ($p > 0.001$, Wilcoxon test).

LIVE/DEAD[®] Cell Viability Assay results showed a nonsignificant decrease in the percentage of live cells from the first to the third passage and a nonsignificant increase at the fourth, with the percentage then remaining stable until the ninth passage followed by a decrease to the tenth passage, when the lowest percentage of live cells was found (Fig. 3 and Table 2). Although statistical significance was not reached, there was a tendency for these percentages to correlate with the K/Na index of the cells as determined by electron-probe X-ray microanalysis ($p = 0.0022$ and $r = 0.8428$, Spearman correlation test, for mean K/Na index values vs. mean LIVE/DEAD[®] Cell Viability) and with cell viability and cell proliferation levels as determined by WST-1 assay ($p = 0.0117$ and $r = 0.7538$, Spearman correlation test).

Microanalytical analysis of 10 consecutive HWJSC subcultures showed generally high K/Na ratios for these stem cells, ranging from 1.94 for the third cell passage to 6.40 for the sixth passage (Table 3 and Fig. 4). The Friedman test for multiple samples revealed significant differences ($p < 0.001$) among the 10 cell passages in the intracellular ionic concentration of all elements analyzed (Ca, Na, K, Mg, P, Cl, and S; Table 4). Pairwise comparisons between consecutive cell subcultures (Wilcoxon test) demonstrated a tendency for several elements to increase or decrease their intracellular concentrations with a higher number of passages. Intracellular K concentrations tended to decrease from the first to the third passage, including a statistically significant difference between the second and the third passages, followed by an increase until the seventh passage and then a statistically significant decrease to the eighth passage and a continuing decline to the tenth passage (Tables 3 and 4 and Fig. 4). In contrast, intracellular Na concentrations showed a nonsignificant increase from the first to the second and third passages, a decrease from the third to the fourth passage, and an increase from the fifth to the seventh passage, decreasing thereafter (Tables 3 and 4 and Fig. 4). Intracellular Cl concentrations significantly decreased from the first to the second cell passage and from the sixth to the seventh passage and then significantly increased from the seventh to the eighth passage. Intracellular P concentrations significantly decreased from the first to the second cell passages and from the seventh to the eighth passages. Intracellular Ca

TABLE 2. ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION AND CELL VIABILITY AT SUCCESSIVE HUMAN UMBILICAL CORD WHARTON'S JELLY STEM CELL PASSAGES (P1 TO P10) WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT-1; MITOCHONDRIAL FUNCTION DETERMINED BY WATER-SOLUBLE TETRAZOLIUM SALT-1

Cell passage	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
WST-1	Mean	2.41	2.31	2.29	2.42	2.41	2.37	2.15	2.15	2.28
	Median	2.43	2.37	2.30	2.43	2.41	2.39	2.15	2.23	2.27
	Q1-Q3	2.39 2.44	2.37 2.38	2.26 2.34	2.41 2.43	2.41 2.43	2.31 2.46	2.10 2.21	2.19 2.23	2.25 2.31
RTCA CI	Mean	1.60	1.62	1.94	2.42	1.89	2.86	3.11	3.03	3.11
	Median	1.61	1.56	1.94	2.79	1.94	2.90	3.21	3.16	2.97
	Q1-Q3	1.01 2.21	1.05 2.18	1.30 2.50	1.43 3.22	1.59 2.39	2.50 3.26	2.98 3.30	2.80 3.25	2.71 3.60
Trypan blue	Mean	95.91	90.98	90.91	88.15	95.19	95.14	82.13	89.71	91.30
	Median	96.69	92.64	91.15	90.05	95.14	94.98	82.09	89.78	91.23
	Q1-Q3	94.67 97.57	89.00 94.67	89.87 93.64	82.23 94.28	93.43 96.78	93.26 98.04	79.81 84.42	89.04 90.45	88.18 94.36
LIVE/DEAD [®]	Mean	100	94.43	92.35	96.95	97.17	96.73	96.66	96.22	89.35
	Median	100	96.49	92.31	97.52	96.34	97.39	97.16	96.32	89.25
	Q1-Q3	100 100	93.15 96.88	90.23 95.73	95.10 98.87	95.42 98.99	94.24 100	95.78 99.17	95.41 97.59	96.16 96.48

WST-1, water-soluble tetrazolium salt-1; RTCA CI, real-time cell analyzer cell index; Trypan blue: percentage of live cells in each cell passage by trypan blue exclusion test; LIVE/DEAD[®]: percentage of live cells in each cell passage by calcein/AM and ethidium homodimer-1. Mean and median values and first and third quartiles (Q1-Q3) are shown for each passage and each technique.

TABLE 3. INTRACELLULAR IONIC CONCENTRATIONS OF CALCIUM, CHLORINE, POTASSIUM, MAGNESIUM, SODIUM, PHOSPHOROUS, AND SULFUR, AND POTASSIUM/SODIUM RATIO AT HWJSC PASSAGES (P1 TO P10)

Cell passage	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Ca	Mean	11.85	17.00	14.21	4.74	6.48	5.26	20.69	12.33	14.13
	Median	11.70	16.57	12.18	3.90	6.00	5.20	17.30	12.67	15.35
	Q1-Q3	4.87 14.62	10.72 23.39	6.82 19.49	0.00 8.28	0.03 11.00	0.00 9.26	14.13 23.76	6.70 18.76	8.04 18.76
Cl	Mean	202.55	141.46	137.56	176.37	195.33	74.75	203.15	171.00	181.21
	Median	194.69	129.26	105.33	149.21	158.79	56.65	152.73	170.76	166.77
	Q1-Q3	168.36 241.77	104.53 177.14	90.17 145.22	116.50 178.74	141.23 196.29	174.75 217.04	31.92 100.54	132.38 201.40	153.00 192.70
K	Mean	419.31	385.93	268.31	350.92	412.34	460.99	331.16	272.45	267.69
	Median	411.19	376.33	235.33	378.89	425.55	467.59	331.47	270.45	275.07
	Q1-Q3	362.49 510.66	355.31 405.55	172.27 340.95	292.76 421.96	378.38 459.90	392.74 500.40	431.19 515.27	294.81 351.08	259.43 310.45
Mg	Mean	30.65	23.12	25.49	30.50	32.72	35.49	23.51	24.33	22.82
	Median	31.73	22.74	24.85	29.08	32.79	34.37	24.33	24.85	22.21
	Q1-Q3	23.27 35.43	14.28 31.73	21.15 30.14	26.44 33.32	28.03 34.90	28.56 35.43	29.61 40.19	20.09 27.10	20.23 26.84
Na	Mean	125.56	127.97	138.55	92.84	69.34	108.41	99.99	86.64	93.25
	Median	89.01	94.10	133.09	72.06	54.25	116.98	92.40	79.68	77.99
	Q1-Q3	62.73 193.28	52.56 169.54	93.25 175.48	45.78 95.79	40.69 72.90	59.34 83.92	60.19 142.42	65.06 128.85	68.45 90.07
P	Mean	275.15	220.79	235.51	260.34	277.53	286.99	214.89	224.26	225.99
	Median	283.01	233.88	228.34	255.33	276.09	282.32	285.08	234.23	225.58
	Q1-Q3	242.18 298.92	186.83 268.48	207.59 256.71	236.65 287.85	267.09 294.08	255.33 317.61	265.71 307.92	189.25 236.65	213.29 240.45
S	Mean	50.14	50.05	57.59	54.17	45.19	56.26	66.16	57.55	59.19
	Median	52.27	47.92	58.81	54.99	45.19	56.08	67.25	58.81	57.44
	Q1-Q3	38.66 61.53	35.94 68.61	51.73 65.88	44.65 63.16	34.85 55.54	60.98 76.77	46.28 66.97	59.76 74.60	46.96 66.84
K/Na	3.34	3.02	1.94	3.78	5.95	6.40	4.25	3.31	3.14	2.87

All concentrations are expressed in millimoles of each element per kilogram of cell dry weight. Mean and median values are shown, followed by the first and third quartiles (Q1-Q3). The bottom row corresponds to the K/Na ratio (based on mean K and Na concentrations at each cell passage).

WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

415

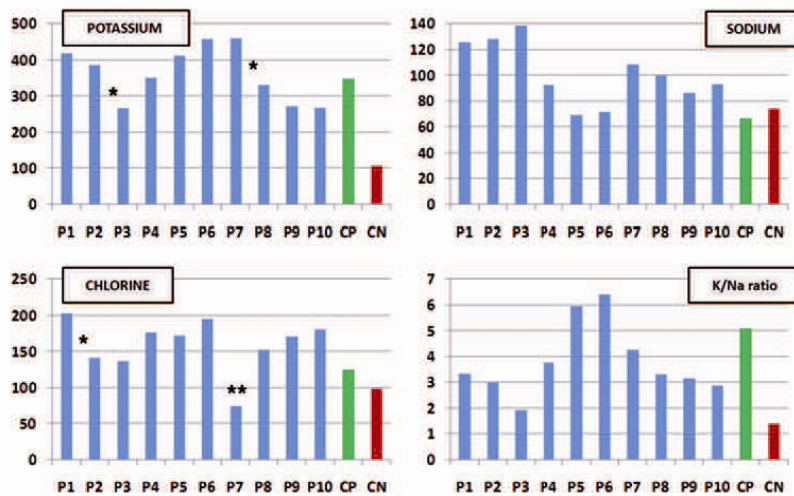


FIG. 4. Histograms representing the mean intracellular concentrations of potassium, sodium, and chlorine and the K/Na ratio for the ten consecutive HWJSC passages (P1 to P10). Statistically significant changes (increases or decreases) are indicated with asterisks. Green bars correspond to the control human fibroblasts, while red bars represent the same cells treated with 10mM HEMA to induce apoptosis. All measures are expressed as millimoles per kilogram of cell dry weight. Color images available online at www.liebertonline.com/tec

significantly decreased from the third to the fourth passage and significantly increased from the seventh to the eighth passage. Intracellular S significantly increased from the fifth to the sixth passage and then significantly decreased from the sixth to the seventh passages, and intracellular Mg significantly increased from the seventh to the eighth passages.

Based on the results of the trypan blue, LIVE/DEAD, WST-1, and electron-probe X-ray microanalysis assays, we calculated the ACVL for each cell passage. As shown in Figure 3, the highest ACVLs corresponded to the sixth and fifth cell passages and the lowest to the eighth and tenth passages.

Identification of genes associated with cell viability at different cell passages

Correlation analysis of all genes in the array revealed a significant positive correlation between ACVL and 630 probe sets and a significant negative correlation between ACVL and 801 probe sets (data available on request). Functional analysis of these genes (Table 5) showed an over-representation of 10 gene functions among the 630 probe sets positively correlated with cell viability, which were all re-

lated to the synthesis and maintenance of cell components and cell structures (Table 5). No gene functions were over-represented among the 801 probe sets negatively correlated with ACVL.

SAM analysis of apoptosis-related genes revealed five probe sets encoding for four different genes whose expression was significantly associated with ACVL (Fig. 5). Two of these genes (*FASTKD2* and *BNIP3L*) have been associated with pro-apoptotic functions, and two (*TNFAIP8* and *BCL2L2*) have been associated with anti-apoptotic functions.

Discussion

MSCs derived from the human umbilical cord are being considered a potential alternative source to bone marrow-derived MSCs for cell therapy.⁴ HWJSCs are more readily accessible and have a greater expansion potential in comparison to bone marrow-derived MSCs,³⁵ which can only be obtained after a painful and invasive procedure. Moreover, it has been suggested that HWJSCs are immune privileged and could, therefore, be tolerated in allogeneic transplantation.³⁶ In this study, HWJSCs were found to fulfill all of the main criteria for the use of human MSCs in cell therapy and tissue

TABLE 4. SIGNIFICANCE (P) VALUES FOR DIFFERENCES IN INTRACELLULAR IONIC CONCENTRATIONS OF CALCIUM, CHLORINE, POTASSIUM, MAGNESIUM, SODIUM, PHOSPHOROUS, AND SULFUR AMONG CONSECUTIVE HWJSC PASSAGES (P1 TO P10)

Cell passages compared	P1-P2	P2-P3	P3-P4	P4-P5	P5-P6	P6-P7	P7-P8	P8-P9	P9-P10	All (Friedman)
Ca	0.101	0.276	0.000 ^a	0.602	0.117	0.248	0.000 ^a	0.012	0.610	0.000 ^a
Cl	0.001 ^a	0.427	0.065	0.242	0.067	0.000 ^a	0.000 ^a	0.139	0.241	0.000 ^a
K	0.211	0.001 ^a	0.030	0.035	0.030	0.696	0.000 ^a	0.284	0.878	0.000 ^a
Mg	0.014	0.174	0.063	0.247	0.964	0.125	0.001 ^a	0.575	0.414	0.000 ^a
Na	0.830	0.545	0.006	0.607	0.192	0.012	0.970	0.386	0.047	0.000 ^a
P	0.000 ^a	0.253	0.062	0.135	0.304	0.840	0.000 ^a	0.386	0.721	0.000 ^a
S	0.788	0.187	0.326	0.022	0.000 ^a	0.000 ^a	0.035	0.169	0.959	0.000 ^a

The nonparametric Wilcoxon test was used for pair-wise comparisons. The nonparametric Friedman test was used for global comparisons.
^aStatistically significant *p*-values.

TABLE 5. CYTOSCAPE-BINGO FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES SHOWING A SIGNIFICANT POSITIVE CORRELATION ($R > 0.7$) WITH AVERAGE CELL VIABILITY LEVELS IN TEN CONSECUTIVE HWJSC PASSAGES, AS DETERMINED BY MICROARRAY

GO-ID	p-value	Corrected p-value	Gene functions
5739	3.13E-08	4.15E-05	Mitochondrion
5622	2.49E-05	1.65E-02	Intracellular
43231	5.26E-05	1.79E-02	Intracellular membrane-bound organelle
43227	5.41E-05	1.79E-02	Membrane-bound organelle
313	9.16E-05	2.02E-02	Organellar ribosome
5761	9.16E-05	2.02E-02	Mitochondrial ribosome
44429	2.19E-04	3.47E-02	Mitochondrial part
314	2.36E-04	3.47E-02	Organellar small ribosomal subunit
5763	2.36E-04	3.47E-02	Mitochondrial small ribosomal subunit
44424	3.68E-04	4.89E-02	Intracellular part

GO-ID, gene ontology reference for each specific term or gene function; p-value: statistical significance of the overrepresentation of each GO term or gene function using a hypergeometric distribution; Corrected p-value: statistical significance of the overrepresentation of each GO term or gene function using a hypergeometric distribution with Bonferroni correction for multiple testing; Gene functions: GO terms identified by Cytoscape-BiNGO with a significant p-value.

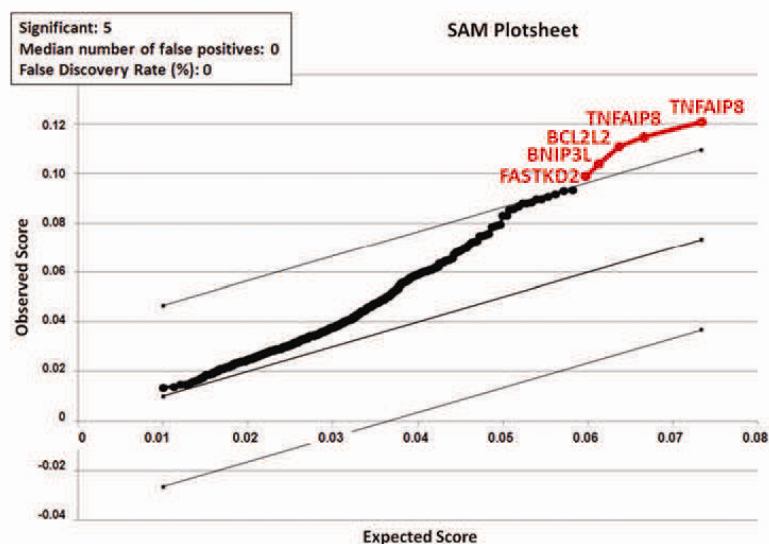
engineering, including good proliferation rate in adherent cell culture; high differentiation capability to osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cell lineages over multiple cell passages; and, as previously reported,¹ the expression of several markers of undifferentiated MSC (*CD105*, *CD103*, and *CD90*) and the nonexpression of *CD45*, among other markers.³² These results confirm that the cultured cells were HWJSCs and indicate that our cultured HWJSCs may be clinically useful at the 10 cell passages analyzed.

A critical factor influencing the clinical outcomes of cell therapy/transplantation procedures and the success of tissue engineering is the viability and proliferative capacity of the cells used.³⁷⁻⁴⁰ However, no fully sensitive and specific method has yet been established that evaluates the cell viability of human MSCs before their application in these contexts. It should also be taken into account that cell cultures tend to age and lose viability after several passages in culture.¹⁰ Thus, evident morphological changes were recently described in corneal endothelial cell cultures from the fourth passage onward, with a trend for cell enlargement, cell growth alterations, and a higher percentage of cell death with increasing passage number.⁴¹ However, no data are available on specific intracellular changes in HWJSCs kept in culture for several passages, and little is known about the influence of sequential subculturing on the cell viability and proliferation capabilities of cultured HWJSCs.

In this study, we used classical (trypan blue exclusion) and novel highly sensitive techniques (electron-probe X-ray microanalysis, calcein AM and ethidium homodimer-1, WST-1, microarray, and RTCA) to determine cell viability and cell proliferation. The highest ACVL was observed at the sixth passage, although high cell viability levels were also found at the first, fifth, and seventh passages. No significant change in proliferative capability was observed at any of the 10 cell passages analyzed. A high correlation was found among the techniques used in this study, contrasting with the poor correlation previously observed between trypan blue and electron-probe X-ray microanalysis results for cell viability levels in corneal endothelial cells⁹ and vascular endothelium.¹⁰ The fact that HWJSCs are more undifferentiated than adult endothelial cells and have a higher stemness potential may account for this closer correlation.

Electron-probe X-ray microanalysis allows both qualitative and quantitative determinations of the ionic elements that play a role in cell viability. This approach permits the accurate determination of cell viability and the identification of mechanisms underlying the cell death found at given cell

FIG. 5. Significance Analysis of Microarrays (SAM) results for all genes with a role in apoptotic cell death using multiclass analysis of genes associated with the average cell viability levels (ACVLs). All differentially expressed probe sets are represented in red color, and their names are shown in the plot. We used a δ value that permitted a false discovery rate of 0. Color images available online at www.liebertonline.com/tec



WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

417

passages.^{13, 15} Although it is clear that most physiological cell functions require a close control of intracellular levels of P, S, Cl, Ca, and other ions, no data have been published on the physiological concentrations of these elements in human native umbilical cords or cultured HWJSCs.

According to the K/Na ratios observed in our study, the highest cell viability levels were at the fifth and sixth passages, which also showed elevated cell proliferation rates. Intracellular concentrations of Na and K are known to be excellent markers of cell viability, and the K/Na ratio is one of the most powerful microanalytical indicators of cell damage.^{14,18,42} Decreased cell viability at the second, third, and seventh passages may be apoptosis related, given the significantly reduced intracellular levels of Cl in these subcultures, whereas the decrease at passages 8, 9, and 10 may be necrosis related, because elevated Cl concentrations were found in the corresponding subcultures. The high Cl concentration at passage 1 may be associated with a necrosis-related increase in mortality, which could result from the cell isolation process and cell adaptation to the culture conditions. A typical pattern of increased Na and depleted K and Cl is well documented in cells undergoing death by apoptosis.¹⁹ Various authors have found an early decrease in K and Cl to be an early predictor of apoptosis, reporting that the decrease in Cl may be the more important of the two and may be used to predict early cell damage.¹⁶ Hence, our findings are compatible with reports on ionic changes in preapoptotic cells and suggest that HWJSCs at the second, third, and seventh passages should not be used for clinical purposes because of the number undergoing cell death in the corresponding subcultures. HWJSCs at the eighth, ninth, and tenth passages also showed low viability levels and may not be suitable for human cell therapy and tissue engineering.

Our analysis of the other major intracellular elements revealed an initial decrease in Mg and P between the first and the second cell passage that was statistically significant for P, followed by a progressive increase in both elements until a significant decrease after the seventh passage. According to previous reports,^{9,43} these findings may be associated with an initial reduction in the intracellular concentration of ATP that would normalize over successive cell passages and then decrease at passages 8, 9, and 10, when cells may be entering senescence. Our observation of a significant increase in intracellular S concentration at the sixth cell passage is consistent with an increase in sulfated glycosaminoglycans at this passage, when the cell viability is higher, confirming the good functional status of HWJSCs in this subculture.⁴⁴ Intracellular Ca levels were initially elevated but normalized after the fourth cell passage, when a significant decrease in Ca coincided with an increase in ACVL; Ca levels significantly increased between the seventh and tenth passages, when there was a decrease in ACVL. These results are consistent with the known increase in intracellular Ca levels in response to cell damage and apoptosis.^{45,46}

We identified some of the genes that may be responsible for the differences that have just been mentioned with regard to cell viability among HWJSC passages. SAM analysis results demonstrated that the ACVL was significantly associated with four genes related to apoptotic activity. Two are apoptosis-inhibitor genes, *BCL2L2* and *TNFAIP8*, and the latter has two different probe sets. *BCL2L2* (GO:0006916: anti-apoptosis and GO:0042981: regulation of apoptosis) is a

member of the BCL-2 apoptotic inhibitor gene family, whose anti-apoptotic effects have been demonstrated in various human cells and tumors.⁴⁷ *TNFAIP8* belongs to the tumor-necrosis-factor gene family, which plays a role in the control of cell viability and cell death (GO:0006916: anti-apoptosis, GO:0006915: apoptosis, GO:0019987: negative regulation of anti-apoptosis and GO:0043027: caspase inhibitor activity), and the protein can be induced by TNF- α and other apoptotic factors.⁴⁸ The significant association of the expression of these anti-apoptotic genes with cell viability may explain some of the cell viability changes found in the first 10 consecutive passages of these cells. The combined action of these genes may be responsible for the high cell viability found at passages 5 and 6. The other two apoptosis-related genes associated with the ACVL were the pro-apoptotic genes *BNIP3L* and *FASTKD2*. The mitochondrial protein *BNIP3L* (GO:0006917: induction of apoptosis and GO:0043066: negative regulation of apoptosis) is known to induce apoptosis and cell growth arrest in transfected cells.⁴⁹ Likewise, *FASTKD2* (GO:0006915: apoptosis) may play a role in the regulation of mitochondrial apoptosis, given that *FASTKD2* knockdown prevented apoptosis of breast cancer cells in an *ex vivo* model of apoptosis.⁵⁰ Taken together, all of the results just mentioned suggest that a complex equilibrium of pro- and anti-apoptotic gene signals may drive cell death and senescence during sequential HWJSC subculture. These results are in agreement with electron-probe X-ray microanalysis findings on the preapoptotic distribution of intracellular elements in these cells.

Interestingly, all gene functions that were overrepresented among the genes positively correlated with ACVL corresponded to the synthesis and turnover of cellular components. It appears that cells with the highest cell viability levels (especially at fifth and sixth passages) activate multiple cell processes associated with protein synthesis, cell growth, and proliferation, although the differences in cell proliferation among the 10 cell passages did not reach statistical significance. The activation of these gene functions in cell passages with high cell viability confirms the good metabolic status of HWJSCs at these passages. It should be taken into account that the cell viability may have been influenced by our study conditions (e.g., trypsin concentration, cell confluence level, etc.), and results may vary under different conditions.

In summary, these results support the utilization of the highly sensitive methods described in this study for the analysis of all cells selected for clinical purposes in order to determine their vital status and ensure an adequate *in vivo* survival rate. In general, our data indicate that the highest cell viability levels correspond to the fifth and sixth HWJSC passages, suggesting that these passages should be preferentially used in cell therapy or tissue engineering protocols.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) from the National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grant FIS 08/615 and by Junta de Andalucía, Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, grant P10-CTS-6060 (proyectos de excelencia). The authors are grateful to Richard Davies for assistance with the English version.

Disclosure Statement

There is no conflict of interest for any of the authors. No competing financial interests exist.

References

- Alaminos, M., Perez-Kohler, B., Garzon, I., Garcia-Honduvilla, N., Romero, B., Campos, A., and Bujan, J. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol* **223**, 640, 2010.
- Weiss, M.L., and Troyer, D.L. Stem cells in the umbilical cord. *Stem Cell Rev* **2**, 155, 2006.
- Wu, K.H., Zhou, B., Lu, S.H., Feng, B., Yang, S.G., Du, W.T., Gu, D.S., Han, Z.C., and Liu, Y. L. *In vitro* and *in vivo* differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* **100**, 608, 2007.
- Chang, Y.S., Oh, W., Choi, S.J., Sung, D.K., Kim, S.Y., Choi, E.Y., Kang, S., Jin, H.J., Yang, Y.S., and Park, W.S. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant* **18**, 869, 2009.
- Can, A., and Karahuseyinoglu, S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* **25**, 2886, 2007.
- Mitchell, S.L., and Niklason, L.E. Requirements for growing tissue-engineered vascular grafts. *Cardiovasc Pathol* **12**, 59, 2003.
- Lund, R.D., Wang, S., Lu, B., Girman, S., Holmes, T., Sauve, Y., Messina, D.J., Harris, I.R., Kihm, A.J., Harmon, A.M., Chin, F.Y., Gosiewska, A., and Mistry, S.K. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem Cells* **25**, 602, 2007.
- Troyer, D.L., and Weiss, M.L. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells* **26**, 591, 2008.
- Alaminos, M., Sanchez-Quevedo, M.C., Muñoz-Avila, J.I., Garcia, J.M., Crespo, P.V., Gonzalez-Andrades, M., and Campos, A. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol* **211**, 692, 2007.
- Rodriguez-Morata, A., Garzon, I., Alaminos, M., Garcia-Honduvilla, N., Sanchez-Quevedo, M.C., Bujan, J., and Campos, A. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg* **22**, 440, 2008.
- Bilic, G., Zeisberger, S.M., Mallik, A.S., Zimmermann, R., and Zisch, A.H. Comparative characterization of cultured human term amnion epithelial and mesenchymal stromal cells for application in cell therapy. *Cell Transplant* **17**, 955, 2008.
- Solomon, M., Wofford, J., Johnson, C., Regan, D., and Creer, M.H. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion* **50**, 820, 2010.
- Roomans, G.M. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater* **3**, 1, 2002.
- Salido, M., Vilches, J., and Roomans, G.M. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int* **28**, 397, 2004.
- Warley, A. Potassium concentration is reduced in cultured rabbit tracheal smooth muscle cells after withdrawal of serum. *Cell Biol Int* **25**, 691, 2001.
- Zierold, K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol* **144**, 70, 1997.
- Vilches, J., Salido, M., Fernandez-Segura, E., and Roomans, G.M. Neuropeptides, apoptosis and ion changes in prostate cancer. Methods of study and recent developments. *Histol Histopathol* **19**, 951, 2004.
- Warley, A., Fernandez-Segura, E., Lopez-Escamez, J.A., and Campos, A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int* **18**, 915, 1994.
- Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J., Cubero, M.A., Warley, A., and Campos, A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res* **253**, 454, 1999.
- Fernandez-Segura, E., Canizares, F.J., Cubero, M.A., Revelles, F., and Campos, A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int* **21**, 665, 1997.
- Sanchez-Quevedo, M.C., Alaminos, M., Capitan, L.M., Moreu, G., Garzon, I., Crespo, P.V., and Campos, A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol* **22**, 631, 2007.
- Gress, T.M., Hoheisel, J.D., Lennon, G.G., Zehetner, G., and Lehrach, H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm Genome* **3**, 609, 1992.
- Iqbal, J., Liu, Z., Deffenbacher, K., and Chan, W.C. Gene expression profiling in lymphoma diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 191, 2009.
- Gill, R.T. Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 484, 2003.
- Jaluria, P., Chu, C., Betenbaugh, M., and Shiloach, J. Cells by design: a mini-review of targeting cell engineering using DNA microarrays. *Mol Biotechnol* **39**, 105, 2008.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467, 1995.
- Alaminos, M., Gonzalez-Andrades, M., Muñoz-Avila, J.I., Garzon, I., Sanchez-Quevedo, M.C., and Campos, A. Volumetric and ionic regulation during the *in vitro* development of a corneal endothelial barrier. *Exp Eye Res* **86**, 758, 2008.
- Boekestein, A., Kuijpers, G.A., Stols, A.L., and Stadhouders, A.M. Elemental analysis of individual rat blood platelets by electron probe X-ray microanalysis using a direct quantification method. *Histochemistry* **82**, 257, 1985.
- Warley, A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc* **157**, 135, 1990.
- Rodriguez, I.A., Fernández-Segura, E., Ceballos, G., Arrebola, F., Sánchez-Quevedo, M.C., and Campos, A. Hybrid cell death induced by exposure to 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA): an ultrastructural and X-ray microanalytical study. *J Adhes Dent* **10**, 105, 2008.
- Nieto-Aguilar, R., Serrato, D., Garzon, I., Campos, A., and Alaminos, M. Pluripotential differentiation capability of human adipose-derived stem cells in a novel fibrin-agarose scaffold. *J Biomater Appl* **25**, 743, 2011.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* **8**, 315, 2006.

WHARTON'S JELLY CELL VIABILITY

419

33. Maere, S., Heymans, K., and Kuiper, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics* **21**, 3448, 2005.
34. Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., and Jaenisch, R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349, 2006.
35. Prasanna, S.J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S.R., and Vasanadan, A.B. Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS One* **5**, 9016, 2010.
36. Weiss, M.L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K.B., Weiss, R.J., VanderWerff, I., Troyer, D., and McIntosh, K.R. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells* **26**, 2865, 2008.
37. Alaminos, M., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Muñoz-Avila, J.I., Serrano, D., Medialdea, S., Carreras, I., and Campos, A. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3311, 2006.
38. Garzon, I., Sanchez-Quevedo, M.C., Moreu, G., Gonzalez-Jaranay, M., Gonzalez-Andrades, M., Montalvo, A., Campos, A., and Alaminos, M. *In vitro* and *in vivo* cytokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontol Res* **44**, 588, 2009.
39. Garzon, I., Serrato, D., Roda, O., Del Carmen Sanchez-Quevedo, M., Gonzales-Jaranay, M., Moreu, G., Nieto-Aguilar, R., Alaminos, M., and Campos, A. *In vitro* cytokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *Int J Artif Organs* **32**, 711, 2009.
40. Gonzalez-Andrades, M., Garzon, I., Gascon, M.I., Muñoz-Avila, J.I., Sanchez-Quevedo, M.C., Campos, A., and Alaminos, M. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med* **3**, 442, 2009.
41. Zhu, C., and Joyce, N.C. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 1743, 2004.
42. Roomans, G.M. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 1, 2001.
43. Di Francesco, A., Desnoyer, R.W., Covacci, V., Wolf, F.I., Romani, A., Cittadini, A., and Bond, M. Changes in magnesium content and subcellular distribution during retinoic acid-induced differentiation of HL60 cells. *Arch Biochem Biophys* **360**, 149, 1998.
44. Roomans, G.M. X-ray microanalysis of epithelial cells in culture. *Methods Mol Biol* **188**, 273, 2002.
45. Berger, M.L., Reynolds, R.C., Hagler, H.K., Bellotto, D., Parsons, D., Mulligan, K.J., and Buja, L.M. Anoxic hepatocyte injury: role of reversible changes in elemental content and distribution. *Hepatology* **9**, 219, 1989.
46. Roomans, G.M., and Von Euler, A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int* **20**, 103, 1996.
47. Sasi, N., Hwang, M., Jaboin, J., Csiki, I., and Lu, B. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther* **8**, 1421, 2009.
48. Kumar, D., Whiteside, T.L., and Kasid, U. Identification of a novel tumor necrosis factor- α -inducible gene, SCC-S2, containing the consensus sequence of a death effector domain of fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme-inhibitory protein. *J Biol Chem* **275**, 2973, 2000.
49. Yasuda, M., Han, J.W., Dionne, C.A., Boyd, J.M., and Chinnadurai, G. BNIP3 α : a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. *Cancer Res* **1**, 533, 1999.
50. Yeung, K.T., Das, S., Zhang, J., Lomniczi, A., Ojeda, S.R., Xu, C.F., Neubert, T.A., and Samuels, H.H. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. *Mol Cell Biol* **31**, 2287, 2011.

Address correspondence to:

Miguel Alaminos, M.D., Ph.D., B.Sc., Ph.D.

Department of Histology (Tissue Engineering Group)

Faculty of Medicine

University of Granada

Avenida de Madrid 11

Granada E18012

Spain

E-mail: malaminos@ugr.es

Received: September 8, 2011

Accepted: December 13, 2011

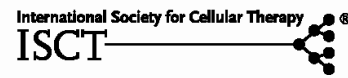
Online Publication Date: January 26, 2012

4.3 Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira ACX, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013. Índice de Impacto JCR (2013): 3.100; Cuartil 2.

.

Cytotherapy, 2013; 15: 507–518



Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering

MIGUEL ANGEL MARTIN-PIEDRA, INGRID GARZON, ANA CELESTE OLIVEIRA, CAMILO ANDRES ALFONSO-RODRIGUEZ, MARIA CARMEN SANCHEZ-QUEVEDO, ANTONIO CAMPOS & MIGUEL ALAMINOS

Department of Histology (Tissue Engineering Group), University of Granada, Granada, Spain

Abstract

Background aims. One of the most important issues in tissue engineering (TE) is the search for a suitable stem cell reservoir with optimal cell viability levels for the development of new tissues relevant for therapeutic needs. The aim of this study was to evaluate the cell viability levels of 10 sequential cell passages of human dental pulp stem cells (hDPSC) to determine their potential for TE techniques. **Methods.** To assess the average cell viability levels of hDPSC, four cell viability assays were used in a combinatorial approach: trypan blue exclusion test, water-soluble tetrazolium 1 assay, live/dead assay and electron probe x-ray microanalysis. **Results.** The results showed that cell viability as determined by trypan blue staining and live/dead assays was greater than 85%, with a significant decrease at the second passage ($P < 0.05$) and a significant increase at the ninth passage ($P < 0.05$). Electron probe x-ray microanalysis showed that the highest cell viability corresponded to the ninth passage, with the lowest K/Na values found at the third passage. No statistical differences were found among the different passages for the water-soluble tetrazolium 1 assay ($P = 0.219$). **Conclusions.** Assessment of average cell viability levels showed that the highest viability of hDPSC was reached after nine passages, suggesting that this passage would be the most adequate for use in TE protocols.

Key Words: cell viability, dental pulp, electron probe microanalysis, mesenchymal stromal cells

Introduction

Tissue engineering (TE) applications are based on the development of biological substitutes that can restore, maintain or even improve tissue function (1,2). Three key elements are necessary in the development of artificial tissues: (i) stem cells, (ii) biomaterials or scaffolds to allow cells to differentiate and proliferate and (iii) growth factors to induce differentiation and cell proliferation (3,4).

For a certain stem cell population to be considered a suitable substrate in TE protocols, cell populations must fulfill some minimal requirements; stem cells must have a high proliferation rate, differentiation capabilities and high cell viability levels. Some cell populations have been well described and characterized for use in TE. However, identification and characterization of new cell sources is needed, especially when other cell sources are not available or are very difficult to obtain.

In this context, the presence of stem cells/progenitors has been described in almost all human

tissues (5), including dental and periodontal tissues. Different types of stem cells have been identified in the dental pulp: dental pulp stem cells of human permanent teeth (hDPSC) (6), stem cells of human exfoliated deciduous teeth (7) and stem cells from apical papillae (8). Moreover, Seo *et al.* (9) described the presence of periodontal ligament stem cells as a promising cell source in guided tissue regeneration as part of periodontal therapies.

hDPSC have been specially studied and characterized (10). These cells are considered the most feasible and promising stem cells from human teeth due to their biological properties, ease in obtainment and presence during the whole life in the dental pulp of permanent human teeth. These dental stem cells are clonogenic and highly proliferative, even more than bone marrow mesenchymal stromal cells (BMSC) (6). Furthermore, hDPSC are very similar to BMSC regarding the positive expression of mesenchymal undifferentiation markers and the negative expression of CD45 (11,12). hDPSC have been widely characterized, showing great

Correspondence: **Miguel Alaminos**, Department of Histology (Tissue Engineering Group), Faculty of Medicine, University of Granada, Avenida de Madrid 11, Granada E18012, Spain. E-mail: malaminos@ngr.es

(Received 24 October 2012; accepted 30 November 2012)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2013, International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.017>

508 M. A. Martín-Piedra et al.

capabilities to differentiate into chondrogenic, osteogenic and adipogenic but also neurogenic and epithelial lineages (10,13–16). As a result, hDPSC are globally considered as mesenchymal stromal cells (MSC) (6,12,14,17–20). Morphometric studies in dental pulp by using bromodeoxyuridine assays and immunohistochemical assays described sub-odontoblastic, perivascular and stromal localization of hDPSC (21,22).

The evaluation of cell viability profiles is one of the most important targets of the quality control process of bio-artificial tissues generated by TE. In this regard, it is necessary to ensure the proliferative and regenerative potential of cells used in TE protocols. Several methods have been used to evaluate cell viability. One of the most commonly used methods is based on the detection of the integrity and functionality of the cell membrane using a vital dye exclusion method such as trypan blue (23,24). Functional metabolic methods including AM calcein staining or water-soluble tetrazolium 1 (WST-1) assays have also been used to determine the cytoplasmic and mitochondrial functionality of the cells, respectively (25).

One of the most interesting methods designed to evaluate cell viability is electron probe x-ray microanalysis (EPXMA), which allows the accurate determination of cell viability and the identification of the mechanisms underlying cell death by quantification of the ionic elements that play a key role in cell viability (26–28). EPXMA has already been used for the determination of viability profiles in different cell types (26,28–33). However, this technique has not been used to test cell viability profiles of other promising cells used in TE, such as hDPSC. In addition, several previous reports showed that cultured cells tend to enter senescence and lose viability through sequential subculturing (29,31). However, this phenomenon still remains unclear in hDPSC subcultured during several cell passages in culture.

All cell viability methods have different shortcomings and provide different information about cell viability. A combinatorial approach using different cell viability methods could increase the strength of the results and also confirm the data obtained by other techniques (34). As previously reported by our group, it is possible to summarize the cell viability results by the combination of different techniques in a global index, the so-called average cell viability levels (ACVL) (31).

The aim of this study was to evaluate the cell viability levels of 10 sequential cell passages of hDPSC to determine their potential as a suitable cell source for TE techniques. For this purpose, we used four different methods to calculate the ACVL to establish an accurate cell viability profile on hDPSC.

Methods

Samples and hDPSC cultures

Human dental pulps (N = 4) were obtained from young adult teeth (age, 22.5 ± 4.9 years). All patients provided informed consent. Teeth were third molars without dental or periodontal pathology extracted by dental prescription at the School of Dentistry of the University of Granada. This study was approved by the ethics committee of the University of Granada.

Once extracted, teeth were stored at 4°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 6% antibiotic/antimycotic solution (10,000 U/mL penicillin, 10 ng/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B) (Sigma-Aldrich) and immediately processed at the Tissue Engineering Laboratory at the School of Medicine of the University of Granada.

Dental pulps were obtained and digested as previously described in the literature (6). Briefly, teeth were rinsed with phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich), and periodontal tissues over the root surface were removed with a sterile surgical blade. Teeth were cut around the cementum-enamel junction by using a sterilized diamond bur to expose the pulp chamber. Pulp tissue was gently separated from the crown and the root and then digested in a 2 mg/mL collagenase type I solution (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Germany) for 6 hours at 37°C and 5% CO₂. Collagenase solution was centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes, and then the supernatant was discarded. hDPSC primocultures were obtained by resuspending the pellet in DMEM (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich) and 1% antibiotic/antimycotic solution (Sigma-Aldrich). All cells were incubated under standard cell culture conditions. The medium was changed every 3 days and cells were trypsinized using 0.5 g/L trypsin and 0.2 g/L ethylenediaminetetraacetic acid solution (Sigma-Aldrich) (29). Cells were kept in culture until the 10th passage.

Trypan blue assay

To determine the cell viability by vital dye exclusion tests, 20 µL of cell suspension were mixed with 20 µL of 0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich) for 5 min. Then, cells were counted using a Neubauer micro-chamber (Brand GmbH, Wertheim, Germany) under a light microscope (Nikon Eclipse 90-I; Nikon Instruments Inc, Melville, NY, USA). All counts were performed eight times for each of the individual specimens included in this study (N = 4), resulting in 32 different measures. Mean and standard deviation were calculated for each subculture.

WST-1 assay

To show the functional status of hDPSC, 1×10^4 cells were cultured in 96-well plates (Iwaki, Tokyo, Japan). After the subsequent subculture for 48 hours, cells were rinsed with phosphate-buffered saline and a 10% WST-1 reagent solution (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) was added and incubated for 4 hours at 37°C. Cell proliferation was assessed four times on each individual specimen using a UVM 340 plate reader (Asys, Cambridge, UK) to determine dual absorbance for two wavelengths: 450 nm and 690 nm. hDPSC were treated with 2% Triton X-100 (Probus, Barcelona, Spain) to be used as a negative control.

Live/dead assay

To determine the percentage of viable cells, the Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was utilized by using chamber slides (LabTek II; Nunc, Rochester, NY, USA). For this, a cell density of 2×10^4 cells was seeded on each well and cultured for 48 h. Subsequently, cultured cells were rinsed twice with phosphate-buffered saline and fluorochromes were added and incubated for 4 minutes. Finally, the reagents were removed and cells were analyzed under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 90-I; Nikon Instruments Inc) at 494 nm for calcein and 528 nm for ethidium homodimer 1. Six cell analyses were performed on each individual specimen ($N = 4$) using ImageJ (MacBiophotonics, Ontario, Canada) software developed at McMaster University.

EPXMA

For x-ray microanalysis, confluent hDPSC were subcultured using trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid on plated gold grids covered with a thin layer of polyvinyl butyral (Pioloform; Ted Pella, Inc, Redding, CA) and sterilized overnight under UV light. Cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per grid and cultured in DMEM supplemented with 10% serum and antibiotics. After 24 h of culture on the gold grids covered with Pioloform, support grids containing hDPSC were washed in ice-cold distilled water for 5 seconds to remove the extracellular medium. After washing, excess water was drained from the surface and the grids were immediately plunge frozen in liquid nitrogen (27,35). After cryofixation, the grids were placed in a precooled aluminum specimen holder at liquid nitrogen temperature and freeze dried at increasing temperatures for 24 h in an E5300 Polaron freezer-drier apparatus (Polaron, Watford, UK) equipped with

a vacuum rotatory pump system. Freeze-dried gold grids were carbon coated in a high-vacuum coating system and microanalyzed within 24 h.

EPXMA of the specimens was performed with a Philips XL30 scanning electron microscope equipped with an EDAX DX-4 microanalytical system and a solid-state backscattered electron detector (Philips, Eindhoven, Netherlands). The samples were examined with a scanning electron microscope with a combination of secondary electron and backscattered electron imaging modes. For x-ray microanalysis, the analytical conditions were a tilt angle of 0°, take-off angle of 61.34° and working distance of 10 mm. The acceleration voltage was 10 kV. All spectra were collected in the spot mode at 10,000× (equivalent to 50 nm spot diameter) for 200-second live time, and the number of counts per second recorded by the detector was approximately 500. All determinations were performed on the central area of the cell nucleus. To determine total ion content, we used the peak-to-local-background ratio method (36–38) with reference to standards composed of 20% dextran containing known amounts of inorganic salts (39).

In all, the ionic content was quantified in 50 cultured hDPSC in each subculture corresponding to three different dental pulps from the same subculture. Results are expressed in mean values and standard errors.

Characterization of hDPSC by flow cytometry

To evaluate the expression of key MSC markers on the different hDPSC cultures used in this study, cells corresponding to passages 1, 3, 5, 7 and 9 were analyzed using anti-CD90-allophycocyanin conjugated antibodies (CD90-APC) and anti-CD45-phycoerythrin conjugated antibodies (CD45-PE). Samples containing 5×10^5 cells were placed in flow cytometry tubes and washed with 2 mL of staining buffer (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN), and Fc receptors were blocked by incubating the cells for 5 min with 2 mL of PBS 1× containing 0.1% bovine serum albumin and 0.1% FBS. Next, cells were stained with the antibodies and isotype controls in different tubes and incubated for 45 min at 4°C in darkness. Cells were washed with 2 mL of staining buffer and samples were immediately run on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

hDPSC differentiation assays

Differentiation of hDPSC to different cell lineages was performed using chamber slides (LabTek II; Nunc). A cell density of 1×10^4 cells of the third

510 M. A. Martín-Piedra et al.

passage was seeded on each well and cultured for 28 days. Inductive culture media were used for 28 days to differentiate hDPSC into chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages. Osteogenic medium was DMEM supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic solution, 100 nmol/L dexamethasone, 10 mmol/L β -glycerophosphate and 50 μ mol/L ascorbic acid. Chondrogenic medium was DMEM supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic solution, 40 μ g/mL L-proline, 100 μ g/mL sodium pyruvate, 10 ng/mL transforming growth factor β , 50 μ mol/L ascorbic acid and 5 mg/mL insulin-transferrin-selenium. To induce adipogenesis, DMEM supplemented with 10% FBS, 1% antibiotic/antimycotic solution, 1 μ mol/L dexamethasone, 0.5 mmol/L 3-isobutyl-1-methylxantine and 5 mg/mL insulin-transferrin-selenium was used. All of the reagents used for inductive culture media were purchased from Sigma-Aldrich. As a negative control, we used chamber slides seeded with hDPSC and cultured for 28 days with DMEM (non-inductive culture medium) supplemented with 10% serum and antibiotics. Slides were rinsed once with phosphate-buffered saline and fixated in 4% formaldehyde for 10 min. To evaluate cell trans-differentiation, specific histochemical methods were performed as previously described (40). Alizarin Red S staining was used to determine the presence of extracellular calcium micro-mass around osteogenic cells. Alcian blue staining was used to identify proteoglycans in the extracellular matrix of chondrogenic cells, and Oil Red O method was used to detect fat cells. Histochemical analysis was performed using a Nikon Eclipse 90-1 microscope (Nikon Instruments Inc).

ACVL

The ACVL of each hDPSC passage was calculated as previously described (31). Briefly, values of cell viability obtained for each method were normalized to z-scores (mean = 0 and standard deviation = 1) according to the formula $Z = (X - \mu)/\sigma$, where μ is the average cell viability obtained for each method, X is the specific cell viability for a particular cell passage and σ is the standard deviation for each method. Finally, mean z-scores were calculated for each of the 10 passages included in this study.

Statistical analysis

Descriptive analysis, Wilcoxon test and Friedman F test were performed using SPSS 15 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The level of significance was determined at $P < 0.05$ for all tests.

Results

Culture and characterization of human hDPSC isolated from human dental pulp

hDPSC were efficiently isolated using the protocols previously reported. Cultured cells showed an elongated cytoplasm and one elliptical and central nucleus. Primocultures were established after 7 days of isolation. Cell cultures followed the minimal MSC requirements suggested by the International Society of Cell Therapy (11): (i) isolated cells showed plastic adherence at the *in vitro* level and (ii) cultured cells were multi-potent because they could be differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts at the third passage under suitable conditions (Figure 1). In addition, cells showed CD90-positive expression during the study (passages 1, 3, 5, 7 and 9). CD45 expression was negative throughout the experiment (Figure 2).

Trypan blue exclusion test

Our analysis of cell viability using trypan blue staining revealed that cell viability was always greater than 80%. The percentage of viable cells ranged from $82.78\% \pm 5.93\%$ to $96.98\% \pm 3.73\%$ (Table I) during the experiment, reaching the highest viability at the ninth passage (Figure 3A). The viability of hDPSC tended to increase through all 10 passages, with significant differences among cell passages ($P < 0.001$). Statistically significant differences were detected from the second to third passages ($82.78\% \pm 5.93\%$ to $89.87\% \pm 8.97\%$, $P = 0.020$), from the eighth to ninth passages ($87.79\% \pm 8.08\%$ to $96.98\% \pm 3.73\%$, $P = 0.004$), and from the ninth to tenth passages ($96.98\% \pm 3.73\%$ to $90.73\% \pm 8.85\%$, $P = 0.026$) (Table II).

WST-1 assay

When cell viability and cell proliferation were analyzed using WST-1 assay, our results showed that hDPSC tended to remain stable during the study (Figure 3B). The highest viability was found at the ninth passage, with an absorbance of 2.25 ± 0.13 (Table I). Viability of hDPSC did not show great differences through different subcultures ($P = 0.219$). Differences were only statistically significant from the first to second passages (2.15 ± 0.20 to 2.04 ± 0.22 , $P = 0.021$) (Table II).

Live/dead assay

Cell viability according to the Live/Dead Viability/Cytotoxicity Kit (Figure 4) was always greater than 90% up to the 10th passage. Cells viability ranged from $90.77\% \pm 7.15\%$ at the second passage to

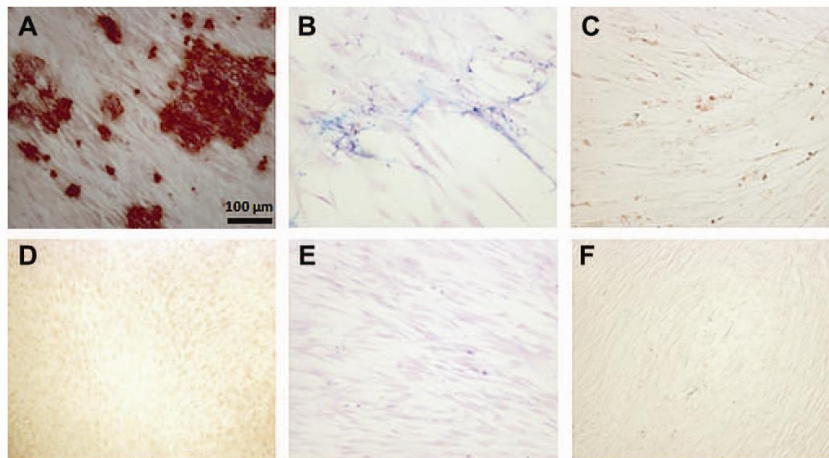


Figure 1. Images of hDPSC after 28-day multi-lineage differentiation (20 \times). (A–C) hDPSC differentiated into (A) osteogenic, (B) chondrogenic and (C) adipogenic lineages when cultured with specific inductive media. (D–F) hDPSC cultured with non-inductive medium did not show (D) osteogenic, (E) chondrogenic or (F) adipogenic characteristics. These pictures are representative of eight images obtained at third hDPSC subculture.

96.54% \pm 1.97% at the ninth passage (Table I), when the highest viability was reached (Figure 3C). As Friedman test revealed (Table II), there was a slight increasing trend of hDPSC viability ($P = 0.018$), although statistically significant differences among subsequent passages were only detected between the second and third passages (90.77% \pm 7.15% to 95.53% \pm 2.84%, $P = 0.007$) and between the eighth and ninth passages (95.51% \pm 1.88% to 96.54% \pm 1.97%, $P = 0.029$).

EPXMA

Sodium concentration within the cell nucleus changed among different hDPSC subcultures, ranging from 56.99 \pm 5.12 mmol/kg to 92.59 \pm 8.23 mmol/kg ($P < 0.001$). Sodium concentration significantly increased up to the fifth passage ($P = 0.017$) and then slightly decreased up to the ninth passage (Table II), when the lowest sodium concentration was reached. Standard deviations of sodium concentration seemed to be higher than values obtained with other elements (Table III).

Results for magnesium showed that the concentrations of this element remained stable from the beginning of the experiment to the fifth passage, when the magnesium concentration significantly decreased to 17.94 \pm 0.94 mmol/kg ($P = 0.002$) (Table II). After that, the differences in magnesium levels were not statistically significant. Differences in magnesium concentration were detected when all passages were considered globally ($P = 0.019$) (Table III).

Phosphorus levels showed a slight decreasing trend during the study, from 222.38 \pm 7.76 mmol/kg to 183.55 \pm 5.27 mmol/kg (Table III), with a significant decrease between the first and second passages ($P = 0.004$), the second and third passages ($P = 0.030$) and the fifth and sixth passages ($P = 0.018$). Friedman test also detected a global decreasing trend when all passages were considered ($P < 0.001$) (Table II).

Values of sulfur concentration (Table III) oscillated from 61.16 \pm 4.37 mmol/kg to 86.18 \pm 4.16 mmol/kg with significant changes among subsequent hDPSC subcultures ($P < 0.001$), although no clear global trend could be observed (Table II). Statistically significant changes were obtained between the second

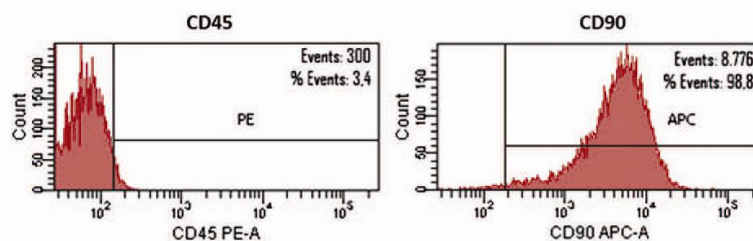


Figure 2. Flow cytometry analysis of CD45 (negative MSC marker) and CD90 (positive MSC marker) in hDPSC at passage 3.

512 M. A. Martín-Piedra et al.

Table I. Analysis of cell viability at successive hDPSC passages (P1 to P10) according to trypan blue exclusion test, WST-1 assay and live/dead assay.

Cell passage	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Trypan blue (%)	Mean ± SD	82.78 ± 5.93	89.87 ± 8.97	89.12 ± 6.85	87.18 ± 11.31	88.81 ± 10.36	89.19 ± 9.08	87.79 ± 8.08	96.98 ± 3.73	90.73 ± 8.85
	Median	81.70	90.85	89.28	93.22	91.11	93.61	88.44	98.69	91.45
	Q1-Q3	81.13-90.89	88.32-95.62	85.12-94.92	76.26-96.15	87.88-95.33	85.59-94.84	84.54-92.86	94.86-100.00	86.43-99.36
WST-1 (absorbance)	Mean ± SD	2.15 ± 0.20	2.04 ± 0.22	2.06 ± 0.26	2.16 ± 0.27	2.17 ± 0.24	2.14 ± 0.25	2.08 ± 0.25	2.25 ± 0.13	2.19 ± 0.23
	Median	2.20	2.01	2.16	2.28	2.27	2.18	2.18	2.28	2.30
	Q1-Q3	2.05-2.32	1.86-2.17	2.05-2.30	1.99-2.22	2.02-2.34	1.98-2.32	1.91-2.34	2.17-2.34	2.09-2.34
Live/dead (%)	Mean ± SD	92.66 ± 3.74	90.77 ± 7.15	95.53 ± 2.84	94.91 ± 4.25	95.59 ± 3.29	94.74 ± 3.92	95.51 ± 1.88	96.54 ± 1.97	95.54 ± 3.58
	Median	93.93	93.68	96.27	95.77	96.39	95.85	95.81	96.84	96.31
	Q1-Q3	89.91-95.01	84.02-96.05	94.02-97.62	92.18-98.56	94.77-97.42	92.71-97.42	94.60-96.53	95.99-97.92	94.72-97.70

Mean and standard deviation as well as median values and first and third quartiles (Q1-Q3) are shown for each passage and technique.

and fourth passages ($P = 0.001$ and $P < 0.001$) and between the sixth and eighth passages ($P < 0.001$ and $P = 0.027$). At the end of the study, sulfur concentration significantly increased up to 73.93 ± 2.50 mmol/kg ($P = 0.011$).

Chlorine concentration showed high variability among subsequent passages (Table III), with clearly significant changes from the third to seventh passages ($P < 0.01$) and from the ninth to tenth passages ($P < 0.001$). Because of this, Friedman test revealed global significant differences through all the hDPSC subcultures when chlorine concentration was analyzed (Table II). Despite high standard deviations, intracellular chlorine concentration increased up to 169.51 ± 9.98 mmol/kg at the last passage.

Similar results showing high variability were found for potassium concentrations. In this sense, there were significant differences ($P < 0.05$) between every pair of subsequent passages except from the eighth to ninth passages (251.28 ± 18.24 mmol/kg to 248.36 ± 13.93 mmol/kg, $P = 0.619$). There was a clear increasing trend on potassium concentration through all of the passages, and global differences were detected ($P < 0.001$) (Table II).

Calcium concentration showed a decreasing trend through all of the passages ($P < 0.001$). There is a high dispersion on these results (Table III), inducing the appearance of significant differences between the second and third passages ($P = 0.009$), fourth and fifth passages ($P < 0.001$), fifth and sixth passages ($P = 0.042$), sixth and seventh passages ($P = 0.041$), and ninth and tenth passages ($P < 0.001$) (Table II).

The K/Na ratio was used as a viability marker in this study. According to this microanalytical indicator, viability showed a slight decrease up to the third passage (3.97 ± 0.23) and began to increase, with the highest values at the end of the study (7.00 ± 0.88 at the ninth passage) (Figure 3D). Friedman test detected that viability changed during the study ($P < 0.001$), although these changes were low and there were no significant differences between each passage and the next when Wilcoxon test was applied (Table II).

ACVL

Based on the results of trypan blue staining, live/dead assay, WST-1 assay and EPXMA, we calculated the ACVL for each cell passage. As shown in Figure 3E, the highest ACVL corresponded to cell passages 9 and 10 and the lowest viability to cell passage 2.

Discussion

Recent studies have described hDPSC as a cell population with a growth rate higher than that of BMSC (6). There have been reports about the

Viability of human dental pulp stem cells 513

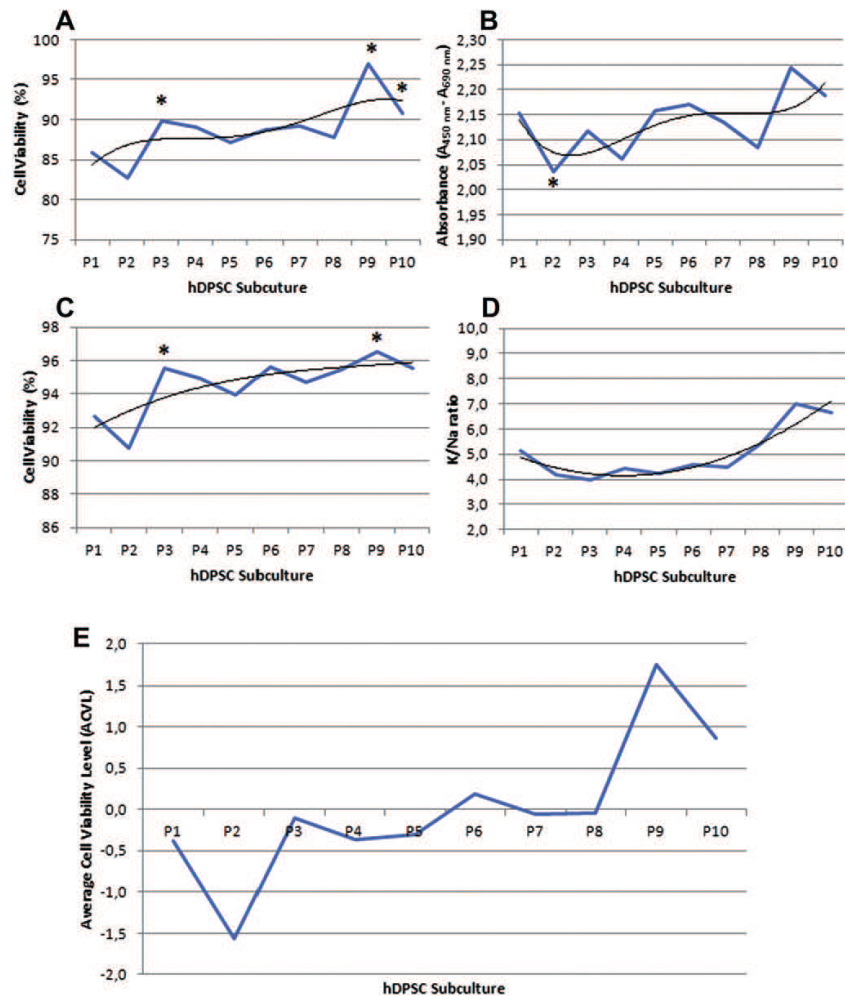


Figure 3. Analysis of cell viability profile of 10 subsequent passages of hDPSC. (A) Trypan blue exclusion test. (B) WST-1 assay. (C) Live/dead assay and (D) K/Na ratio obtained by EPXMA. Blue lines show cell viability according to each test used, and black lines show viability trends. (E) ACVL of 10 subsequent passages of hDPSC. *Statistically significant changes in comparison with the previous cell passage.

Table II. Significance (*P*) values for differences between each passage and the next (Wilcoxon test).

Cell passages		P1–P2	P2–P3	P3–P4	P4–P5	P5–P6	P6–P7	P7–P8	P8–P9	P9–P10	All (Friedman test)
EPXMA	Ca	0.091	0.009	0.068	0.000	0.042	0.041	0.684	0.099	0.000	0.000
	Cl	0.073	0.010	0.001	0.000	0.000	0.000	0.426	0.073	0.000	0.000
	K	0.011	0.002	0.002	0.001	0.048	0.003	0.005	0.619	0.000	0.000
	Mg	0.961	0.636	0.440	0.302	0.002	0.217	0.389	0.401	0.051	0.019
	Na	0.710	0.010	0.001	0.017	0.146	0.881	0.640	0.072	0.660	0.000
	P	0.004	0.030	0.385	0.862	0.018	0.502	0.423	0.988	0.599	0.000
	S	0.691	0.001	0.000	0.647	0.175	0.000	0.027	0.094	0.011	0.000
	K/Na	0.102	0.732	0.942	0.904	0.919	0.996	0.308	0.322	0.754	0.000
Trypan blue	0.179	0.020	0.427	0.756	0.569	1.000	0.278	0.004	0.026	0.000	
WST-1	0.021	0.952	1.000	0.171	0.428	0.614	0.914	0.349	0.622	0.219	
Live/dead	0.361	0.007	0.668	0.753	0.278	0.304	0.932	0.029	0.179	0.018	

Differences considering all the passages at once were analyzed to evaluate the sensitivity of the different techniques (Friedman test). Bold type indicates $P < 0.05$ (statistically significant difference).

514 M. A. Martín-Piedra et al.

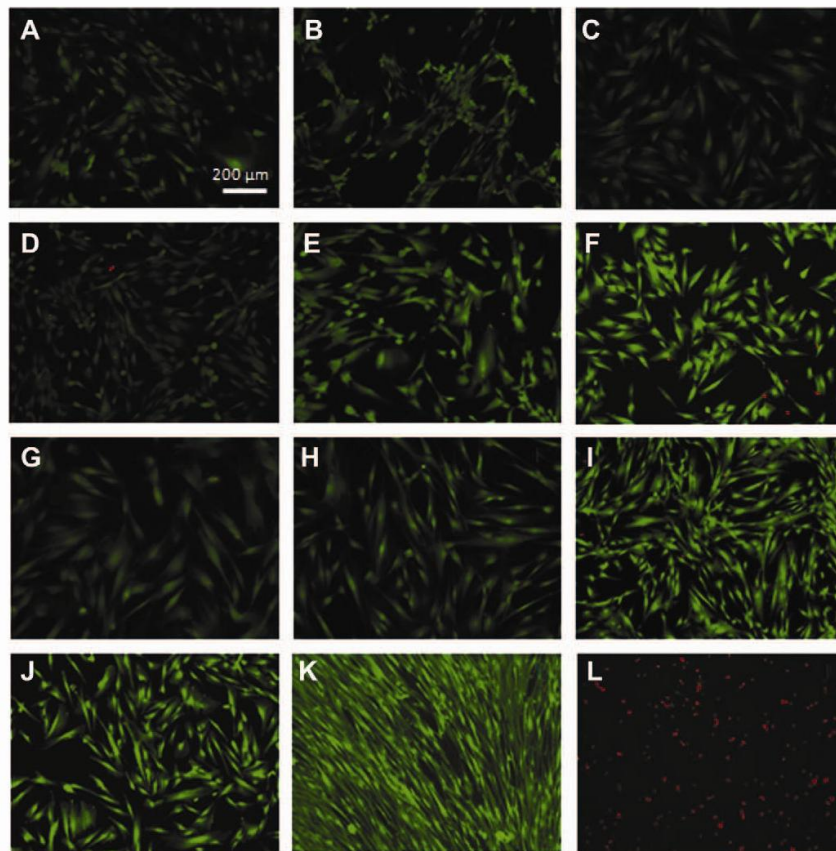


Figure 4. Images of hDPSC after fluorescence staining with a live/dead kit from primoculture to 10th passage (A–J). (K) Human fibroblasts from oral mucosa used as a positive control. (L) Human fibroblasts from oral mucosa treated with Triton X-100 used as a negative control. Green: cytoplasmic positive-esterase activity (live cells); red: damaged cell membrane allows ethidium homodimer to bind to DNA (dead cells). These images are representative of 24 assays performed at each hDPSC subculture.

potential of these cells from the dental pulp to differentiate to the adipose lineage, bone, cartilage, muscle and even neural precursors (10,41). These cells also have the ability to generate mineralized tissue *in vitro* and *in vivo* (15,16). According to this, hDPSC are considered a potential and suitable source of stem cells to be used in TE protocols.

The main aim of the present study was to determine the cell viability patterns of hDPSC corresponding to 10 consecutive cell passages to identify the most appropriate cell populations for clinical use. Evaluation of cell viability is one of the most important objectives of the quality control process of tissues engineered by TE. Thus, the determination of viability patterns of hDPSC allows conformation of the suitability of this cell source as substrate for the development of new artificial tissues.

In this work, cell viability was determined using a combination of different methods and techniques,

including the classic trypan blue dye exclusion test, a metabolic mitochondrial assay (WST-1), a mixed dye exclusion and metabolic cytoplasmic assay (live/dead) and a highly sensitive intracellular ionic determination method (EPXMA). This combinatorial approach was used to increase the sensitivity and accuracy of the results. As stated by Stoddart (34), more than one method should be used to confirm the results of individual assays. In fact, this approach revealed a high level of agreement among the four methods applied, thus supporting the strength of the results and allowing us to determine the ACVL.

Extraction and isolation of hDPSC can be achieved by two different protocols previously described (6,42). In this study, the removal of the dental pulp and subsequent enzymatic digestion of the extracellular matrix were performed to isolate hDPSC because it has been shown that a significantly higher rate of cell proliferation was obtained when this

Table III. Results of intracellular ionic concentration of 10 subsequent hDPSC passages (P1–P10) as determined by EPXMA.

Cell passage		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
Na	Mean	66.29	63.77	79.19	58.72	76.36	92.59	89.90	88.19	56.99	58.49
	SE	5.26	4.35	4.99	4.11	4.43	8.23	5.47	10.23	5.12	3.12
Mg	Mean	21.35	21.66	22.50	21.17	22.10	17.94	19.43	18.39	18.93	21.36
	SE	1.01	1.13	1.39	1.43	0.65	0.94	0.92	1.05	0.72	0.93
P	Mean	222.38	246.79	222.41	217.00	219.29	194.73	197.03	186.87	186.62	183.55
	SE	7.76	8.14	8.11	14.23	3.78	10.75	5.82	8.08	4.12	5.27
S	Mean	70.79	67.34	86.18	68.91	65.63	61.16	85.72	74.14	62.94	73.93
	SE	3.26	2.92	4.16	4.77	1.72	4.37	2.29	3.96	2.45	2.50
Cl	Mean	138.11	126.93	157.45	117.61	151.27	104.58	135.63	130.56	105.33	169.51
	SE	8.09	11.40	10.30	6.39	3.60	9.26	7.63	10.65	18.06	9.98
K	Mean	259.51	212.74	281.46	216.70	278.39	245.61	316.88	251.28	248.36	326.31
	SE	15.41	17.23	13.68	19.81	9.90	24.00	10.45	18.24	13.93	9.44
Ca	Mean	19.48	23.49	13.47	19.32	8.54	14.08	7.84	9.41	12.80	5.58
	SE	2.03	3.05	2.66	2.94	0.79	1.99	1.43	1.55	1.64	1.05
K/Na	Mean	5.13	4.17	3.97	4.44	4.22	4.56	4.51	5.43	7.00	6.63
	SE	0.52	0.43	0.23	0.47	0.23	0.61	0.45	0.67	0.88	0.53

K/Na ratio was calculated as one of the most relevant cell viability markers. Values are expressed as mean and SE of 50 ionic determinations for each hDPSC passage.

methodology was used (43). First, we confirmed the MSC nature of the cells by flow cytometry, multi-lineage differentiation assays and the morphology and adherence capability of the hDPSC isolated and cultured in our study.

According to flow cytometry results, hDPSC had positive expression of CD90 and negative expression of CD45, consistent with the results of other recent studies (19,44) and fulfilling the criteria established by the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cell Therapy (11). In addition, the ability of these cells to differentiate to other cell lineages was shown by the presence of calcium deposits, intracellular lipidic bodies and extracellular proteoglycans after culture in specific selective media for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, respectively. These facts confirm the stem cell potential of the cells used in this work, in accordance with previous reports (15,16,41,45,46).

In the present work, we have efficiently isolated and cultured this cell type and cell viability was determined using a combinatorial approach. According to our results, hDPSC maintained high viability profiles along the 10 passages analyzed here, suggesting that these cells kept their potential clinical usefulness for at least 10 passages (10) as determined by each of the methods and techniques used in this work. These results are in agreement with recent studies suggesting that the cloning ability of stem cells from dental pulp is optimal after 10 passages (47).

The first method used in this work was the trypan blue dye exclusion test. This method is extensively used for the determination of cell viability in cultured MSC. However, it is well known that this technique is not accurate enough to detect early cell damage; it

only identifies cell alterations once they have become irreversible and the cell membrane is disrupted (29,48). For this reason, this bona fide method has to be associated with other more sensitive assays. In contrast, live/dead methods combine a fluorescent exclusion dye test based on ethidium homodimers and a sensitive cytoplasmic enzymatic method, such as AM calcein. The application of this mixed method to hDPSC allowed us to confirm the results obtained by using trypan blue exclusion tests and to show that live cells were functionally active. In addition, in this study we wanted to prove that live cells were able to maintain adequate physiological levels of mitochondrial function. For that reason, we used WST-1 assay on the 10 cell passages. The correlation between the results of this analysis and the other methods supports the biological plausibility of this combinatorial approach. However, some differences exist because viability tended to increase from passages 4 to 5 and to decrease from passages 7 to 8 using the WST-1 assay, whereas viability decreased from passages 4 to 5 and increased from passages 7 to 8 using live/dead methods, although these trends were not statistically significant.

Finally, the last method used was EPXMA, which allows both qualitative and quantitative determination of the ionic elements that play a role in cell viability. The K/Na ratio is considered one of the most powerful microanalytical indicators of cell damage, and many works have been performed to determine cell viability by K/Na ratio quantification in other cell types (26,27,49,50). However, no data are available on hDPSC viability as determined by EPXMA. In this regard, our analysis revealed that the standard error corresponding to the sodium and calcium concentrations was very high. This finding is

516 M. A. Martín-Piedra et al.

in agreement with previous results from our group (29,31,33,51) and may indicate that a biological variation exists in cells corresponding to the same cell passage.

According to our EPXMA results, the intracellular potassium concentration significantly decreased at passage 2, suggesting that cell viability could be lower at this passage. Strikingly, the chlorine levels were lower in cells corresponding to passage 2 than to passage 1, suggesting that a process of cell apoptosis could be associated with this cell adaptation phenomenon. Various investigators have found an early decrease in K and Cl to be an early predictor of apoptosis, reporting that the decrease in Cl may be the more important of the two and may be used to predict early cell damage (28,52). In agreement with this, the intracellular calcium levels tended to increase at passage 2, as it is the case for different types of apoptotic cells (53,54). All these data also correlate with a significant decrease of WST-1 function at passage 2, thus supporting the idea that mitochondrial dysfunction could be associated with pre-apoptotic status.

After the initial adaptation of the cells to the culture conditions, cell viability was restored at passage 3, when a significant increase of K and Cl was found along with a significant decrease of Ca. Thus, in the present work, we found an initial decrease in cell viability from passage 1 to passage 2 with a subsequent increase. Most likely, this decrease could be associated with the cell adaptation from *in vivo* to culture conditions. Also, the cell isolation method used here involved an enzymatic digestion protocol that could affect membrane functionality (55,56). After that, as a result of cell adaptation, viability could be restored, reaching baseline cell viability levels and keeping stable or slightly increasing until passage 9, when the highest viability was reached. These results are in concordance with previous reports describing an initial adaptative period and optimal viability after some passages (29,31,33).

Furthermore, the average cell viability as determined by EPXMA was higher in hDPSC than in other types of MSC previously analyzed using the same method (31). Previous reports by our group revealed that the highest cell viability of different cell types kept in culture was found at passage 3 for adult cells, including vascular endothelial cells (33) and cornea cells (29), and at passage 6 for Wharton's jelly MSC (31). Therefore, the results obtained in the present study showed that hDPSC reached the highest cell viability as late as passage 9, implying that these cells could be more immature and undifferentiated than the other cell types analyzed. In fact, dental pulp is considered to be a mucous connective tissue, which is usually catalogued as an embryonic-like tissue (57,58). This could be the reason why

hDPSC levels were high for the 10 passages analyzed here, with optimal viability levels reached at passage 9.

In summary, hDPSC at passage 9 are likely in optimal conditions to be used in cell therapy and TE protocols because they showed the highest ACVL. First passages of hDPSC should probably be discarded for this purpose because they are not suitable due to low viability as a consequence of the adaptation to *in vitro* conditions. In this study, performed on 10 cell subcultures, we did not find any decrease in cell functionality as a consequence of senescence until passage 10. Thus, our findings lead us to believe that senescence may occur after the 10th passage. Thus, future long-term viability studies should be developed using these cells.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) from the National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI11/1582 and PI11/2668. M. A. Martín-Piedra is a recipient of a fellowship (AP2010-0279) from the Spanish Ministry of Education ("Formación de Profesorado Universitario 2010" programme).

Disclosure of interest: The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent.* 2008;36:379–86.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920–6.
- Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2003;21:1025–32.
- Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol.* 1998;16:247–52.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytherapy.* 2003;5:362–9.
- Gronthos S, Mankani M, Brahmi J, Robey PG, Shi S. Post-natal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13625–30.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:5807–12.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34:166–71.

Viability of human dental pulp stem cells 517

9. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004;364:149–55.
10. Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*. 2011; 136:455–73.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8:315–7.
12. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005;8:191–9.
13. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4:21–6.
14. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81:531–5.
15. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, 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.
16. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2006;206: 693–701.
17. Buurma B, Gu K, Rutherford RB. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur J Oral Sci*. 1999;107:282–9.
18. Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol*. 1992;37:945–52.
19. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, 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; 14:149–56.
20. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol*. 1998;174:194–205.
21. Lovschall H, Tummers M, Thesleff I, Fuchtbauer EM, Poulsen K. Activation of the Notch signaling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113:312–7.
22. Teclès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol*. 2005;50:103–8.
23. Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp Cell Res*. 1956;11:297–305.
24. Phillips HJ. In dye exclusion tests for cell viability. 2nd ed. New York: Academic Press; 1973.
25. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127–52.
26. Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater*. 2002;3:1–8.
27. Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int*. 1994;18:915–6.
28. Zierold K, Hentschel H, Wehner F, Wessing A. Electron probe X-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cryofixation. *Scanning Microsc Suppl*. 1994;8:117–26; discussion 26–7.
29. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JL, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol*. 2007;211:692–8.
30. Fernandez-Segura E, Warley A. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol*. 2008;88:19–43.
31. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012;18:409–19.
32. Warley A, Stephen J, Hockaday A, Appleton TC. X-ray microanalysis of HeLa S3 Cells. I. Instrumental calibration and analysis of randomly growing cultures. *J Cell Sci*. 1983; 60:217–29.
33. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg*. 2008;22:440–8.
34. Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*. 2011;740:1–6.
35. Abraham EH, Breslow JL, Epstein J, Chang-Sing P, Lechene C. Preparation of individual human diploid fibroblasts and study of ion transport. *Am J Physiol*. 1985;248: C154–64.
36. Boekstein A, Thiel F, Stols ALH, Bouw E, Stadhouders A. Surfaces roughness and the use of peak to background in the X-ray microanalysis of bulk bio-organic sample. *J Microsc*. 1984;134:327–34.
37. Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Revelles F, Campos A. Electron probe X-ray microanalysis of cultured epithelial tumour cells with scanning electron microscopy. *Cell Biol Int*. 1997;21:665–9.
38. Statham PJ, Pawley JB. A new method for particle X-ray microanalysis on peak to background measurements. *Scanning Electron Microscopy*. 1978;1:469.
39. Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc*. 1990;157:135–47.
40. Kiernan JA. *Histological and histochemical methods: theory and practice*. Banbury, UK: Scion Publishing Ltd; 2008.
41. Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*. 2007;1:128–35.
42. Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J*. 2004;37:185–92.
43. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006; 324:225–36.
44. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16:605–15.
45. Dissanayaka WL, Zhu X, Zhang C, Jin L. Characterization of dental pulp stem cells isolated from canine premolars. *J Endod*. 2011;37:1074–80.

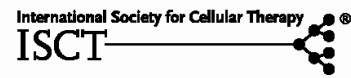
518 *M. A. Martín-Piedra et al.*

46. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:501–6.
47. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, 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;184:105–16.
48. Rodriguez IA, Lopez-Gonzalez G, Rodriguez MA, Campos-Sanchez F, Alaminos M. Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical X-ray microanalysis. *J Adhes Dent.* 2011;13:375–81.
49. Roomans GM. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10:1–19.
50. Salido M, Vilches J, Roomans GM. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 2004;28:397–402.
51. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007; 22:631–40.
52. Zierold K. Effects of cadmium on electrolyte ions in cultured rat hepatocytes studied by X-ray microanalysis of cryosections. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;144:70–6.
53. Berger ML, Reynolds RC, Hagler HK, Bellotto D, Parsons D, Mulligan KJ, et al. Anoxic hepatocyte injury: role of reversible changes in elemental content and distribution. *Hepatology.* 1989;9:219–28.
54. Roomans GM, Von Euler A. X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. *Cell Biol Int.* 1996;20:103–9.
55. Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol.* 1999;276:G591–8.
56. Van Landuyt KB, Jones EA, McGonagle D, Luyten FP, Lories RJ. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12: R15.
57. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and cell biology: an introduction to pathology.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
58. Welsch U, Deller T. *Sobotta lehrbuch histologie.* Munich, Germany: Urban & Fischer bei Elsevier; 2010.

4.4 Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures

Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, Alaminos M. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014. Índice de Impacto JCR (2013): 3.100; Cuartil 2.

Cytotherapy, 2014; 16: 266–277



Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures

MIGUEL ANGEL MARTIN-PIEDRA, INGRID GARZON, ANA CELESTE OLIVEIRA, CAMILO ANDRES ALFONSO-RODRIGUEZ, VICTOR CARRIEL, GIUSEPPE SCIONTI & MIGUEL ALAMINOS

Department of Histology (Tissue Engineering Group), Faculty of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

Abstract

Background aims. Evaluation of cell viability is one of the most important steps of the quality control process for therapeutic use of cells. The aim of this study was to evaluate the long-term cell viability profile of human dental pulp stem cell (hDPSC) subcultures (beyond 10 passages) to determine which of these passages are suitable for clinical use and to identify the cell death processes that may occur in the last passages. **Methods.** Four different cell viability assays were combined to determine the average cell viability levels at each cell passage: trypan blue exclusion test, water-soluble tetrazolium 1 (WST-1), LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit and electron probe x-ray microanalysis (EPXMA). Apoptosis was assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay and caspase 4 and BCL7C Western blotting, and cell proliferation was analyzed by WST-1 and proliferating cell nuclear antigen protein detection. **Results.** hDPSCs showed high average cell viability levels from passages 11–14, with adequate cytoplasmic and mitochondrial functionality at these subcultures. A non-significant trend to decreased cell proliferation was found from passages 16–20. EPXMA and TUNEL analyses suggested that a pre-apoptotic process could be activated from passages 15–20 ($P < 0.001$), with a correlation with caspase 4 and BCL7C expression. **Conclusions.** hDPSCs corresponding to passages 11–14 show adequate cell function, proliferation and viability. These cells could be considered as potentially useful for clinical applications.

Key Words: *cell viability, dental pulp, electron-probe x-ray microanalysis, mesenchymal stromal cells*

Introduction

Human dental pulp stem cells (hDPSCs) have been known only since 2000, and these cells have been studied in depth and characterized since then (1). hDPSCs are considered to be the most feasible and promising stem cells derived from human teeth because of their biologic properties, because they are easy to obtain, and because they are present during almost the whole life span in the dental pulp of permanent human teeth. hDPSCs are clonogenic and highly proliferative, even more than bone marrow mesenchymal stromal cells (2). hDPSCs are very similar to other adult mesenchymal stromal cells in regard to the positive expression of mesenchymal undifferentiation markers and the negative expression of CD45 (3,4). hDPSCs have high differentiation potential; they have been shown to have great capabilities for differentiating to chondrogenic, osteogenic, adipogenic, neurogenic and epithelial lineages (1,5–8). Because of this differentiation potential,

these cells are globally considered as mesenchymal stromal cells (2,4,6,9–12). Similar to other stem cells, hDPSCs are increasingly used in regenerative medicine, especially for the development of biologic substitutes (artificial tissues) by tissue engineering (5,8,13–19).

It is necessary to ensure the proliferative and regenerative potential of cells used in regenerative medicine and tissue engineering protocols to guarantee the success of these protocols (20–24). Evaluation of cell viability is one of the most important goals of the quality control process for cells used for the generation of artificial tissues. Understanding the specific cell death mechanisms that may occur during sequential cell culturing would contribute to a better selection of the most appropriate cell sources.

Several methods have been used to evaluate cell viability, ranging from commonly used methods based on the analysis of the integrity of the cell membrane

Correspondence: **Miguel Alaminos**, MD, PhD, Department of Histology (Tissue Engineering Group), Faculty of Medicine, University of Granada, Avenida de Madrid 11, Granada E18012, Spain. E-mail: malaminos@ngr.es

(Received 23 April 2013; accepted 31 October 2013)

ISSN 1465-3249 Copyright © 2014, International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.10.016>

employing vital exclusion dyes such as trypan blue (25,26) to other assays focused on the study of cell metabolism such as calcein acetoxyethyl ester (AM) staining or water-soluble tetrazolium 1 (WST-1) methods (27). Electron probe x-ray microanalysis (EPXMA) allows the accurate determination of cell viability and the identification of the mechanisms underlying cell death by quantification of the ionic elements that play a key role in cell viability. This method has been extensively used for the study of cell viability of different cell types, including hDPSCs (28–30).

Adult stem cells cultured in the laboratory for several passages tend to show a typical three-step cell viability profile as previously reported (20,22,23): (i) an initial adaptation to *ex vivo* cell culture conditions associated with a slight decrease of cell viability, (ii) an increasing period when cell viability increases and cells reach the top cell viability levels (cells during this period are recommended for use in regenerative medicine) and (iii) a decreasing phase when cells tend to lose viability and cell death is present (it is not recommended to use cells during this period).

hDPSC viability was studied more recently during the first 10 cell subcultures (23) by using an array of cell viability assays. However, hDPSCs reached the top cell viability at the end of the study (passage 9). It is necessary to go further in this type of research and to analyze long-term hDPSC subcultures (beyond 10 passages) to determine if these passages are also suitable for clinical use and because it is important to identify subcultures in which cells undergo active cell death and the mechanisms underlying this process. Once the cell viability profile has been evaluated, researchers will be able to choose hDPSC subcultures with optimal cell viability and proliferation and discard low-viability subcultures for therapeutic use.

The aim of this study was to evaluate the cell viability profile of long-term hDPSC subcultures (from passages 11–20) to determine the putative usefulness of these cells and to identify the stage when hDPSCs tend to lose cell viability. In addition, the mechanisms involved in cell death and its early indicators were analyzed.

Methods

Samples and hDPSC cultures

Four human dental pulps were obtained from young adult teeth (age range, 18–30 years). All teeth were third molars without dental or periodontal pathology extracted by dental prescription at the School of Dentistry of the University of Granada. All teeth demonstrated a fully developed root stage (closed apex stage).

After extraction, teeth were stored at 4°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) supplemented with 600 U/mL penicillin, 0.6 mg/mL streptomycin and 1.5 µg/mL amphotericin B (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) and immediately processed at the Tissue Engineering Laboratory at the School of Medicine of the University of Granada. Dental pulps were extracted and digested as previously described (2). The medium used for hDPSC culture was DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (catalog number F9665, lot number 062M3398; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 1% antibiotic and antimycotic solution (Sigma-Aldrich). Medium was changed every 3 days, and cells were subcultured at sub-confluence using a 0.5 g/L trypsin and 0.2 g/L ethylenediamine tetraacetic acid solution (Sigma-Aldrich) at 37°C for 4 min. Cells were kept in culture until passage 20 and analyzed from passages 11–20.

Trypan blue vital dye exclusion assay

To determine the number of cells and their viability using trypan blue, 20 µL of trypsinized and re-suspended cells were mixed with 20 µL of 0.4% solution of trypan blue dye (Sigma-Aldrich) for 1 min. Cells were immediately counted using a Neubauer microchamber (Brand GmbH, Wertheim, Germany) with a light microscope. All counts were done using four technical duplicates of each sample. Means and standard deviations were calculated for each subculture.

WST-1 metabolic proliferation and cell viability assay

To determine the mitochondrial metabolic activity and cell proliferation of hDPSCs, the WST-1 method was used as previously described (22,23). Briefly, 10,000 cells were cultured in 96-well plates (Iwaki Laboratories, Iwaki, Japan). After subsequent subculture for 48 h, cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS), and 10% WST-1 reagent solution (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) was added for 4 h at 37°C. Each sample was analyzed using a UVM 340 Microplate Reader (Asys, Cambridge, UK). As negative controls, selected cultured wells were previously treated with 2% Triton X-100 (Probus, Barcelona, Spain). All counts were done using four technical duplicates of each sample.

LIVE/DEAD cell viability assay

Simultaneous evaluation of cytoplasmic function and membrane integrity was carried out using the LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit for mammalian

268 *M. A. Martín-Piedra et al.*

cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). This assay provides information about the functional status of the cell by detecting cytoplasmic esterase activity. The kit consists of two fluorescent dyes. Calcein AM passes across the cell membrane. When hydrolyzed by cytoplasmic esterase (live cells), calcein AM shows fluorescence in 515-nm emission wavelength. Ethidium homodimer shows fluorescence (617-nm emission wavelength) only after binding to DNA. Red fluorescence appears only in cells in which the cell membrane is disrupted (dead cells). The LIVE/DEAD cell viability assay was performed using Chamber slides (Lab-Tek II; Nunc, Rochester, NY, USA). Briefly, 20,000 cells were seeded on each well and cultured for 48 h. Cells were rinsed twice with PBS, and cell viability was assessed using the LIVE/DEAD kit according to the manufacturer's protocol as previously described (22,23). Cell counts were done using six technical duplicates of each sample.

EPXMA

For x-ray microanalysis, confluent hDPSCs were subcultured using trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid on plated gold grids covered with a thin layer of polyvinyl butyral (Pioloform; Ted Pella, Inc, Redding, CA, USA) and sterilized overnight under ultraviolet light. Cells were seeded at a density of 5000 cells per grid and cultured in DMEM supplemented with 10% serum and antibiotics. Grids containing the cells were washed with deionized water at 4°C, plunge-frozen, freeze-dried, carbon-coated and analyzed using a scanning electron microscope with an EDAX DX-4 microanalytical detector (Philips, Eindhoven, Netherlands) as previously described (20,22,23). For each cell, the intracellular ionic concentration of sodium, magnesium, phosphorus, sulfur, chloride, potassium and calcium as well as the potassium (K)/sodium (Na) ratio were determined. There were 50 cells analyzed per cell passage.

Average cell viability levels

To calculate average cell viability levels (ACVLs) for each cell passage (22,23), the raw cell viability values as determined by trypan blue, WST-1, LIVE/DEAD and K/Na index were first normalized to z scores (mean = 0 and standard deviation = 1) using the formula $Z = (X - \mu)/\sigma$, where μ is the average cell viability obtained for each method, X is the specific cell viability for a particular cell passage and σ is the standard deviation for each method. Mean z score values were obtained for each of the 10 cell passages analyzed.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay

Apoptosis of hDPSCs was detected with the In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and following the manufacturer's instructions at passages 11, 13, 15, 17 and 19. This fluorescence assay was carried out using Chamber slides. Briefly, 20,000 cells were seeded on each well and cultured for 48 h. Cells were washed and incubated with the terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) enzyme and label solution. Finally, the fluorescent reaction was counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole and analyzed in a fluorescent microscope.

Western blot and immunofluorescence

To obtain whole cell protein extracts, hDPSCs were collected in cell lysis buffer (Mammalian Cell Lysis Kit; Sigma-Aldrich Chemie GmbH). All samples were incubated on ice for 15 min and centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. Each protein extract was quantified using a Coomassie Blue protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Equal amounts of protein were loaded onto a 7.5% polyacrylamide gel (Mini-PROTEAN TGX; Bio-Rad Laboratories) and separated by electrophoresis. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane using 2.5Å current for 3 min. The membrane was blocked in blocking buffer (WesternDot; Invitrogen) for 1 h at room temperature and incubated with anti-BCL7C (Abcam, Cambridge, UK), anti-caspase 4 (Abcam), anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Sigma-Aldrich), anti-human telomerase reverse transcriptase (hTERT) (Abcam) or anti- β -actin antibodies (Sigma-Aldrich) at 4°C overnight. After rinsing in washing buffer (WesternDot), the membrane was incubated with Biotin-XX-goat anti-mouse immunoglobulin G secondary antibody (BCL7C, PCNA and β -actin) (Invitrogen) or Biotin-XX-goat anti-rabbit immunoglobulin G secondary antibody (caspase 4) (Invitrogen) for 30 min at room temperature. Positive bands were detected using a Qdot 625 Streptavidin Conjugate (WesternDot, Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence staining of these proteins was performed at passages 11, 13, 15, 17 and 19 using Chamber slides. There were 20,000 cells seeded on each well and cultured for 48 h. Cells were rinsed twice with PBS and permeabilized with 0.1% Triton X-100 (Panreac, Barcelona, Spain). After double rinse with PBS, hDPSCs were blocked with 1% casein solution (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). Primary antibodies anti-BCL7C, anti-caspase

4 and anti-PCNA (the same antibodies used for Western blotting) were incubated at 4°C overnight. Anti-mouse-fluorescein isothiocyanate and anti-rabbit-Cy3 secondary antibodies (Sigma-Aldrich) were incubated for 1 h at room temperature and mounted using Vectashield with 4,6-diamino-2-phenylindole (Vector Laboratories, Inc).

Statistical analysis

We used the Wilcoxon statistical test for the pairwise comparison of sequential cell passages (e.g., passage 11 versus passage 12, passage 12 versus passage 13) and to detect any differences between two consecutive subcultures. We used the Friedman test for global comparison of the 10 cell passages and to identify differences among the 10 passages. These statistical tests were carried out using SPSS 15 software (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA). The significance level was set at $P < 0.05$ for all tests, and all comparisons were performed double-tailed.

Results

Trypan blue exclusion test

Trypan blue staining analysis revealed that cell viability was >75% for all 10 passages analyzed. The percentage of live cells showed a significant decreasing trend from passages 11–20 ($P = 0.009$ for Friedman test) (Figure 1A). The percentage of viable cells significantly decreased from passages 11–12 ($92.54 \pm 7.27\%$ to $87.89 \pm 7.14\%$, $P = 0.009$ for Wilcoxon test) and from passages 18–19 ($91.15 \pm 5.77\%$ to $75.94 \pm 23.09\%$, $P = 0.027$). The lowest cell viability was found at the end of the study ($75.50 \pm 22.62\%$ for passage 20) (Tables I and II).

WST-1 assay

When the WST-1 cell proliferation and metabolism assay was performed, our results showed that hDPSCs tended to remain stable throughout the entire study (Figure 1B). WST-1 did not show any statistically significant differences among all the subcultures ($P = 0.853$) (Table II), and no increasing or decreasing behavior of cell viability was identified for the 10 cell passages analyzed in this study. However, a significant increase of cell viability was found from passages 13–14 ($1.70 \pm 0.59\%$ to $2.09 \pm 0.29\%$, $P = 0.037$) (Table I).

LIVE/DEAD cell viability assay

The LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit showed that cell viability of the analyzed hDPSCs was always

>90% until passage 15. Beyond this subculture, cell viability became <90% and reached the lowest values at passage 19 ($87.67 \pm 7.65\%$) (Table I). Overall, the statistical analysis revealed that cell viability changed (decreasing trend) until the last passage (Figure 1C), as revealed by the Friedman test ($P = 0.002$) (Table II). Statistically significant changes between successive passages were found from passages 11–12 ($90.20 \pm 7.63\%$ to $92.67 \pm 5.63\%$, $P = 0.031$) and from passages 15–16 ($91.52 \pm 6.25\%$ to $89.81 \pm 4.74\%$, $P = 0.021$) (Figure 2).

EPXMA

As shown in Table III, intracellular sodium concentration significantly varied among different hDPSC subcultures ($P < 0.001$ for Friedman test), ranging from 68.02 ± 35.63 mmol/kg at passage 11 to 109.06 ± 47.25 mmol/kg at passage 20, although differences between two consecutive cell passages were not statistically significant (Table II).

Magnesium levels tended to decrease throughout the entire experiment. Differences in magnesium concentration were detected when all passages were considered globally ($P < 0.001$) (Tables II, III). Magnesium concentration showed a significant decrease at passage 14 (17.97 ± 6.67 mmol/kg, $P = 0.006$) and increased from passage 17–18 (19.49 ± 19.84 mmol/kg to 20.62 ± 6.76 mmol/kg, $P = 0.010$).

Phosphorus concentrations revealed a slight decreasing trend throughout the entire study, ranging from 221.76 ± 33.90 mmol/kg at passage 11 to 186.11 ± 33.07 mmol/kg at passage 20 with a significant decrease at passage 14 (191.23 ± 49.67 mmol/kg, $P = 0.011$) and passage 19 (170.19 ± 39.69 mmol/kg, $P = 0.036$) and a significant increase at the end of the study (186.11 ± 33.07 mmol/kg at passage 20, $P = 0.021$). The Friedman test also detected a global decreasing trend when all passages were considered ($P < 0.001$) (Table II).

Sulfur values ranged from 66.13 ± 16.67 mmol/kg at passage 12 to 101.22 ± 29.67 mmol/kg at passage 18 with significant changes between subsequent hDPSC subcultures ($P < 0.001$). Although sulfur concentrations oscillated throughout the entire study, a slightly ascending trend could be observed. Because of these oscillations between pairs of subcultures, several significant differences were obtained: from passages 11–12 ($P < 0.001$), from passages 12–13 ($P < 0.001$), from passages 14–15 ($P = 0.011$), from passages 18–19 ($P = 0.006$) and from passages 19–20 ($P = 0.035$) (Table II).

Intracellular chlorine concentration showed a decrease among subsequent passages, with significant changes ($P < 0.001$) from passages 17–18, from

270 M. A. Martín-Piedra et al.

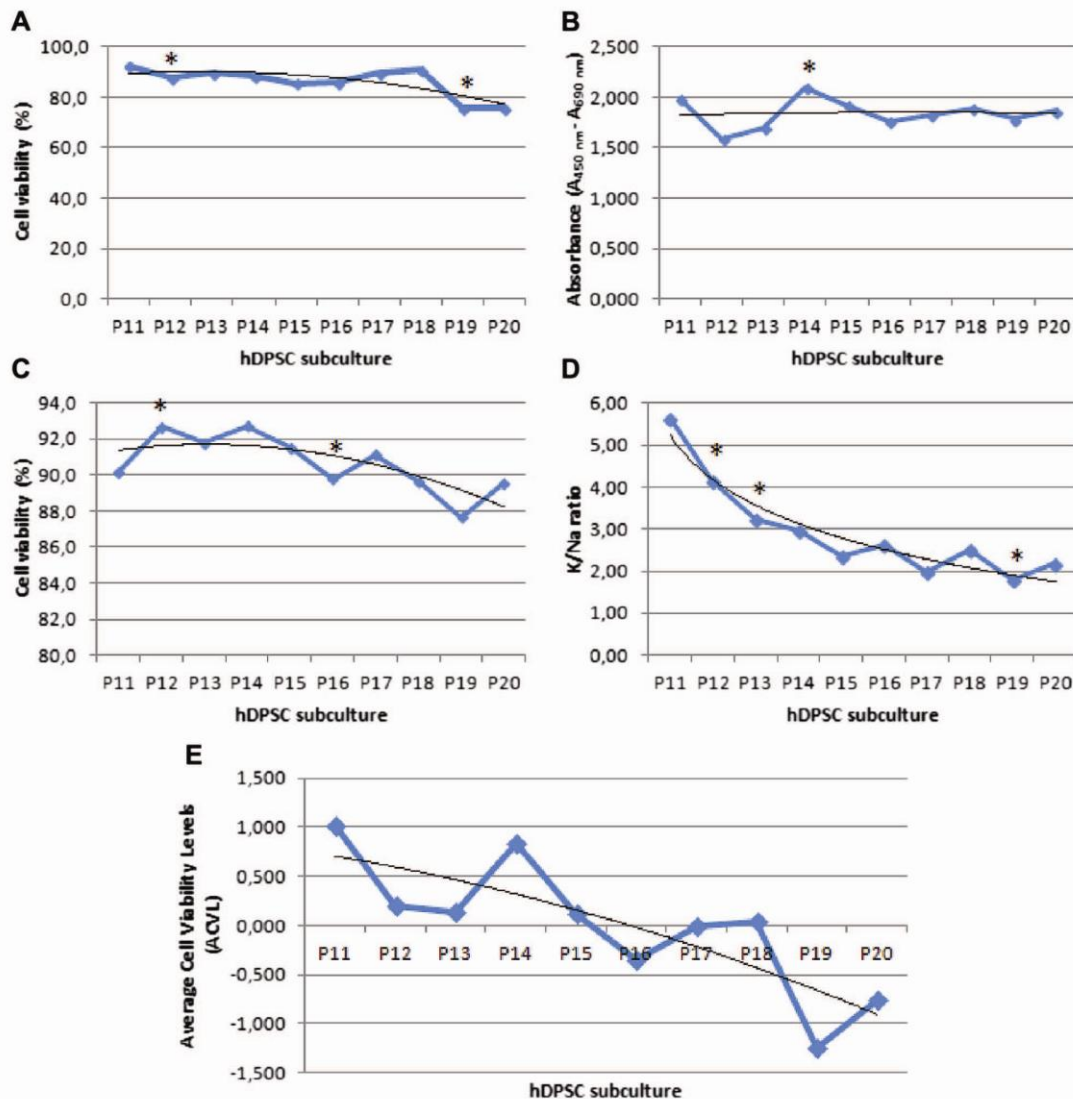


Figure 1. Analysis of cell viability of sequential passages of hDPSCs (passages 11–20). (A) Trypan blue exclusion test. (B) WST-1 assay. (C) LIVE/DEAD assay. (D) K/Na ratio obtained by EPXMA. Blue lines show cell viability according to each test used, and black lines show viability trends. (E) ACVLs. *Statistically significant changes compared with previous passage.

passages 18–19 and from passages 19–20. The Friedman test revealed a global significant reduction among all the hDPSC subcultures ($P < 0.001$). The lowest chlorine concentrations were found at passage 19 (89.47 ± 24.43 mmol/kg) (Table III).

Similarly, a decreasing trend was found for potassium concentrations, with the Friedman test revealing significant changes ($P < 0.001$) when all passages were analyzed globally. The Wilcoxon test revealed significant reduction of potassium concentrations from passages 11–12 ($P = 0.035$), from passages 12–13 ($P < 0.001$), from passages 14–15

($P = 0.022$) and from passages 18–19 ($P = 0.003$) (Tables II, III).

Calcium concentration showed an increasing trend through all cell passages ($P = 0.003$). Several significant differences ($P < 0.05$) were shown from passages 11–15 (Table II).

Analysis of K/Na ratio

The K/Na ratio is one of the most important microanalytic cell viability markers. According to this microanalytic indicator, hDPSCs showed a clear loss

Table I. Analysis of cell viability at successive hDPSC passages (1–10) according to trypan blue exclusion test, WST-1 assay and LIVE/DEAD assay.

Cell passage	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Trypan blue (%)	Mean ± SD	92.54 ± 7.27	87.89 ± 7.14	89.56 ± 14.47	88.24 ± 8.18	85.61 ± 6.62	85.88 ± 10.68	89.97 ± 7.68	91.15 ± 5.77	75.94 ± 23.09
	Median	93.89	87.90	94.99	87.87	85.71	89.09	90.83	92.86	80.13
	Q1–Q3	89.38–97.83	81.60–93.93	79.05–100.00	84.49–93.45	81.60–89.12	81.92–92.31	84.29–96.43	87.05–94.70	71.88–90.45
WST-1 (absorbance)	Mean ± SD	1.99 ± 0.44	1.58 ± 0.75	1.70 ± 0.63	2.09 ± 0.29	1.93 ± 0.51	1.77 ± 0.59	1.83 ± 0.64	1.89 ± 0.49	1.79 ± 0.71
	Median	2.20	1.81	1.48	2.16	2.22	1.91	2.14	2.14	2.34
	Q1–Q3	1.58–2.34	0.85–2.29	1.39–2.36	2.14–2.23	1.51–2.34	1.45–2.32	1.48–2.36	1.48–2.27	1.07–2.41
LIVE/DEAD (%)	Mean ± SD	90.20 ± 7.63	92.67 ± 5.63	91.81 ± 3.33	92.70 ± 3.41	91.52 ± 6.25	89.81 ± 4.74	91.13 ± 2.94	89.68 ± 9.64	87.67 ± 7.65
	Median	91.24	95.17	92.97	92.95	93.60	88.94	91.54	93.73	90.73
	Q1–Q3	85.63–96.46	88.00–97.06	89.32–94.17	91.87–94.61	85.50–96.77	86.07–93.49	88.38–93.39	84.12–96.21	84.90–93.41
TUNEL (%)	Mean ± SD	1.46 ± 0.32	2.64 ± 2.09	1.86	0.94	0.93 ± 0.38	7.21 ± 2.07	6.20 ± 7.04	8.51	7.44 ± 10.31
	Median	1.38	1.45–2.65	0.72–1.13	6.61	6.20–7.04	6.61	6.20–7.04	8.51	7.44–10.31
	Q1–Q3	1.27–1.70	1.45–2.65	0.72–1.13	6.61	6.20–7.04	6.61	6.20–7.04	8.51	7.44–10.31

Mean, standard deviation (SD), median values and first and third quartiles (Q1–Q3) are shown for each passage and technique.

Cell viability of long-term human dental pulp stem cells 271

of cell viability as they were passaged from passages 11–20 ($P < 0.001$ for Friedman test) (Figure 1D). The decrease in K/Na ratio was statistically significant from passages 11–12 (5.61 ± 2.56 and 4.16 ± 2.42 , $P = 0.001$), from passages 12–13 ($P = 0.001$) and from passages 18–19, when the K/Na ratio showed its minimal value (1.81 ± 0.97 , $P = 0.004$) (Tables II, III).

ACVLs

Based on the results of the previously analyzed assays, ACVL was calculated for each cell passage. As shown in Figure 1E, the highest ACVL corresponded to passage 11; high values also were found at passage 14. As hDPSCs were subcultured up to 20 subcultures, the ACVL tended to diminish gradually until reaching its lowest value (lowest cell viability) at passage 19.

TUNEL assay

The number of apoptotic cells was determined by TUNEL assay in each hDPSC subculture (Figure 3). The percentage of apoptotic cells significantly increased from passages 15–17 ($0.93 \pm 0.38\%$ to $7.21 \pm 2.07\%$, $P = 0.005$) and continued increasing until the end of the study, when the top percentage of apoptotic cells was found ($9.80 \pm 6.08\%$), showing a global trend to increase ($P < 0.001$ for Friedman test) (Table I).

Western blot and immunofluorescence

Selected apoptosis and proliferation markers were analyzed by Western blot and immunofluorescence. Caspase 4 expression (pro-apoptotic marker) was slightly higher on passages 16–20 compared with passages 11–15, especially at the end of the experiment (passages 18–20). Immunofluorescence staining revealed a positive cytoplasmic pattern of expression, mainly at passage 19. BCL7C protein, related to anti-apoptotic activity, also presented a cytoplasmic pattern by immunofluorescence, and its expression was higher during the first five subcultures (passages 11–15), mainly at passages 14 and 15, as determined by Western blot and immunofluorescence, and afterward expression decreased to almost absence (Figure 4).

PCNA is a well-known cell proliferation indicator. Its expression was higher at the beginning of the study (passages 11–15) and tended to decrease slightly as hDPSCs were subcultured (passages 16–20) (Figure 4). Immunofluorescence staining showed a typical nuclear pattern of expression mainly at passages 11, 13 and 15. Finally,

272 M. A. Martín-Piedra et al.

Table II. Statistical *P* values for comparison between each passage and the next one using the Wilcoxon test and for global comparison of the 10 passages analyzed using the Friedman test.

Cell passages	11–12	12–13	13–14	14–15	15–16	16–17	17–18	18–19	19–20	All (Friedman)
Trypan blue	0.009	0.796	0.570	0.163	0.877	0.393	0.756	0.027	0.733	0.009
WST-1	0.090	0.866	0.037	0.848	0.064	0.163	0.509	0.773	0.962	0.853
LIVE/DEAD	0.031	0.456	0.885	0.848	0.021	0.810	0.773	0.242	0.313	0.002
EPXMA										
Na	0.063	0.566	0.304	0.337	0.472	0.478	0.540	0.415	0.566	0.000
Mg	0.114	0.303	0.006	0.969	0.594	0.962	0.010	0.148	0.774	0.000
P	0.133	0.342	0.011	0.167	0.163	0.067	0.508	0.036	0.021	0.000
S	0.000	0.000	0.087	0.011	0.406	0.337	0.546	0.006	0.035	0.000
Cl	0.000	0.206	0.000	0.466	0.866	0.761	0.000	0.000	0.001	0.000
K	0.035	0.000	0.490	0.022	0.675	0.277	0.211	0.003	0.001	0.000
Ca	0.001	0.006	0.045	0.003	0.108	0.975	0.598	0.153	0.054	0.003
K/Na	0.001	0.001	0.950	0.245	0.237	0.534	0.142	0.004	0.131	0.000
TUNEL										
11–13	0.074		13–15		15–17		17–19			0.000
			0.017		0.005		0.139			

Statistically significant differences ($P < 0.05$) are highlighted in bold.

Na, sodium; Mg, magnesium; P, phosphorus; S, sulfur; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium.

telomerase activity determined by hTERT expression showed a slight loss of expression at passages 17 and 19 and an increase at passage 15.

Discussion

hDPSCs are a promising mesenchymal stromal cell population that can be obtained autologously from the pulp tissue of human adult teeth, especially from young patients who undergo third molar extraction (2). Dental pulp is a mucous connective tissue, which is usually catalogued as an embryonic-like tissue (31,32). hDPSCs have been proposed as appropriate cells for use in regenerative medicine and tissue engineering applications, including the development of biologic substitutes for dental pulp tissue (13,14), cartilage (16) and bone (17,18), tooth development (15), bone regeneration (5,7,8) and cardiac regeneration (19).

Because of the increasing relevance of hDPSCs as a cell source in regenerative medicine, it is important to analyze the functionality and suitability of these cells before their use in clinical protocols. One important aspect of the quality control to which these cells should be subjected is detection of the best cell populations that would ensure optimal functionality, cell viability and clinical effectiveness. Analysis of cell viability profiles is an important requirement in the evaluation of hDPSCs used in therapeutic applications.

Previous research evaluated cell viability of hDPSCs during the first 10 passages (23), and ACVLs were calculated using a combinatorial index including four different cell viability assays. Results of this previous study showed that the top cell viability was found in the ninth subculture (passage 9). However, more recent studies suggested that the cloning ability of stem cells from dental pulp may

be optimal after 10 passages (33), suggesting that further studies should be carried out. hDPSCs have been shown to be very resistant under culture conditions because they can be expanded over the Hayflick limit (>60 population doublings) preserving cytogenetic stability and remaining undifferentiated (34). Nevertheless, no studies had been carried out to date to determine hDPSC viability at long-term subcultures (beyond passage 10). In the present study, we evaluated 10 subsequent long-term hDPSC subcultures (passages 11–20) corresponding to young human teeth to shed light on the cell viability profiles of hDPSCs kept in culture using a comprehensive approach including several highly sensitive methods.

One of the most extensively used cell viability methods is trypan blue dye exclusion test. However, it is well known that this technique is not accurate enough to detect early cell damage—it identifies cell alterations only after they have become irreversible and the cell membrane is disrupted (20,35). In our study, evaluation of cell viability by the trypan blue exclusion method showed a slightly decreasing trend, especially from passage 15. The percentage of viable cells significantly decreased from passage 19, suggesting that hDPSCs should not be used at passages 19–20. The use of LIVE/DEAD dual metabolic/exclusion techniques showed similar profiles. hDPSCs were viable up to passage 15, and cell viability subsequently became significantly reduced, reaching the lowest values at the final subcultures (passages 19–20). These findings suggest that cells corresponding to passages 15–20 may have a certain degree of cell membrane damage associated with metabolic impairment at the cytoplasmic level. Passages 10–14 showed high cell viability, suggesting that these passages could be appropriate for clinical use.

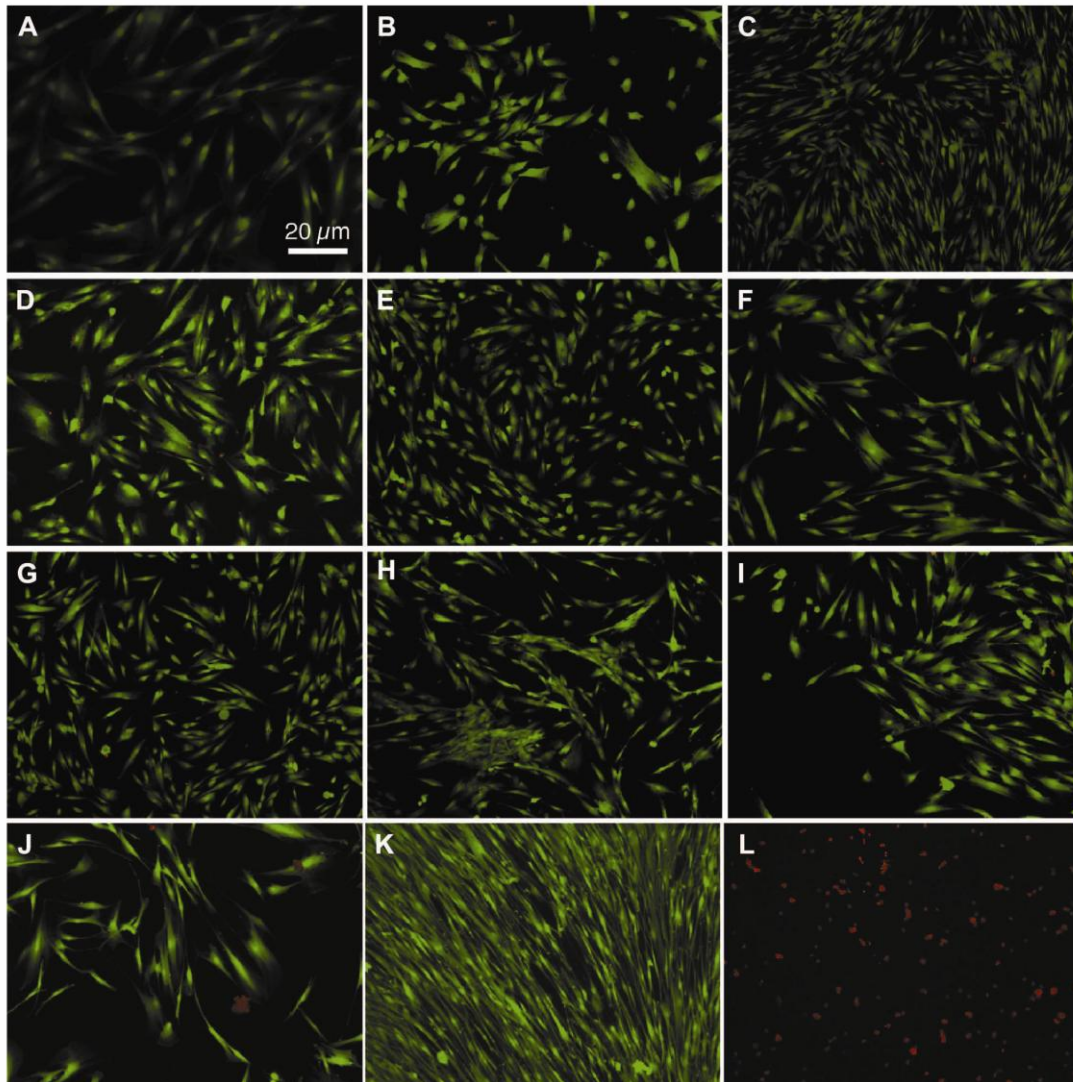


Figure 2. (A–J) Images of hDPSCs after fluorescence staining with LIVE/DEAD from passages 11–20. (K) Human fibroblasts from oral mucosa used as positive controls. (L) Human fibroblasts from oral mucosa treated with Triton X-100 used as negative controls. Green stain indicates cytoplasmic positive-esterase activity (live cells); red stain indicates damaged cell membrane allows ethidium homodimer to bind to DNA (dead cells). These images are representative of 24 assays performed at each hDPSC subculture.

We also evaluated mitochondrial function and cell proliferation using WST-1 assays. WST-1 is a metabolic technique that can complement other cell viability assays, providing specific information about mitochondrial functionality. In agreement with the results found for trypan blue and LIVE/DEAD methods, cells corresponding to passages 11–14 showed the most adequate mitochondrial function, pointing out the possibility of using these cell populations. To confirm these results further, we performed PCNA protein analyses and hTERT

expression at each specific cell passage, and we corroborated that the first passages analyzed in this study (passages 11–15) showed a slightly higher proliferation rate than the last five passages (passages 16–20). Despite this trend, both the WST-1 assay and PCNA detection suggest that the proliferation rate of hDPSCs is conserved from passages 11–20, and these results reveal that the proliferative capability of these cells is not deeply affected by cell culturing. Telomerase activity determined by hTERT expression was detectable from passages

274 *M. A. Martín-Piedra et al.*

Table III. Quantification of intracellular ionic concentrations and K/Na ratio in 10 consecutive hDPSC passages (11–20) as determined by EPXMA.

Cell passage		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Na	Mean	68.02	81.25	83.75	94.17	105.26	108.34	103.67	99.36	103.11	109.06
	SD	35.63	38.90	36.55	42.35	54.25	44.95	32.49	45.85	37.32	47.25
Mg	Mean	24.08	26.06	23.70	17.97	18.52	17.34	19.49	20.62	17.72	17.48
	SD	7.02	7.72	10.92	6.67	8.27	4.04	19.84	6.76	5.35	7.26
P	Mean	221.76	209.20	215.07	191.23	174.86	161.60	179.70	188.51	170.19	186.11
	SD	33.90	57.32	49.99	49.67	42.01	41.73	48.43	41.50	39.69	33.07
S	Mean	86.06	66.13	87.57	97.63	84.18	88.13	96.44	101.22	83.55	91.51
	SD	17.64	16.67	29.38	31.39	24.11	25.28	30.10	29.67	17.77	17.33
Cl	Mean	191.34	147.84	140.82	191.08	198.99	200.74	198.83	143.66	89.47	107.85
	SD	49.25	37.51	74.85	59.93	66.41	51.67	66.13	49.87	24.43	29.04
K	Mean	312.81	276.28	205.09	220.37	171.23	167.81	182.04	203.67	161.86	194.37
	SD	86.52	86.57	107.23	110.20	71.87	116.39	81.50	94.00	45.78	53.32
Ca	Mean	16.49	9.16	14.26	10.33	17.19	13.96	13.40	15.00	10.71	15.96
	SD	10.14	9.13	9.17	9.15	11.75	9.27	11.94	15.25	9.06	13.92
K/Na	Mean	5.61	4.16	3.22	2.95	2.35	2.62	1.98	2.53	1.81	2.19
	SD	2.56	2.42	3.72	2.53	2.18	3.43	1.20	1.80	0.97	1.36

SD, standard deviation; Na, sodium; Mg, magnesium; P, phosphorus; S, sulfur; Cl, chloride; K, potassium; Ca, calcium.

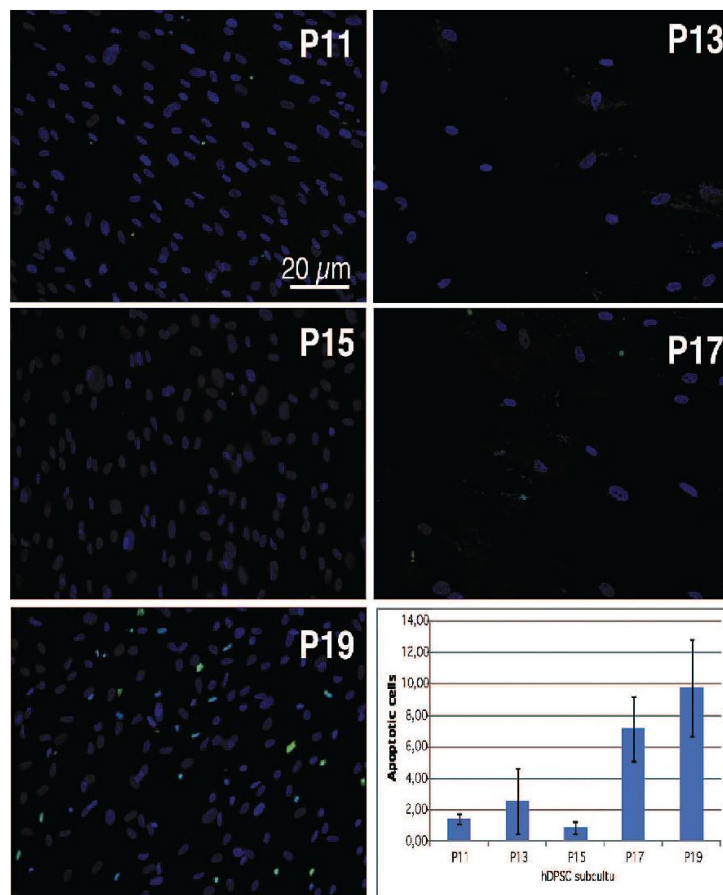


Figure 3. Apoptosis analysis of sequential hDPSC subcultures as determined by TUNEL assay. The first five panels correspond to fluorescence photomicrographs of passages 11, 13, 15, 17 and 19, in which apoptotic cells with fragmented DNA have been stained green. The last panel represents the percentage of apoptotic cells per subculture.

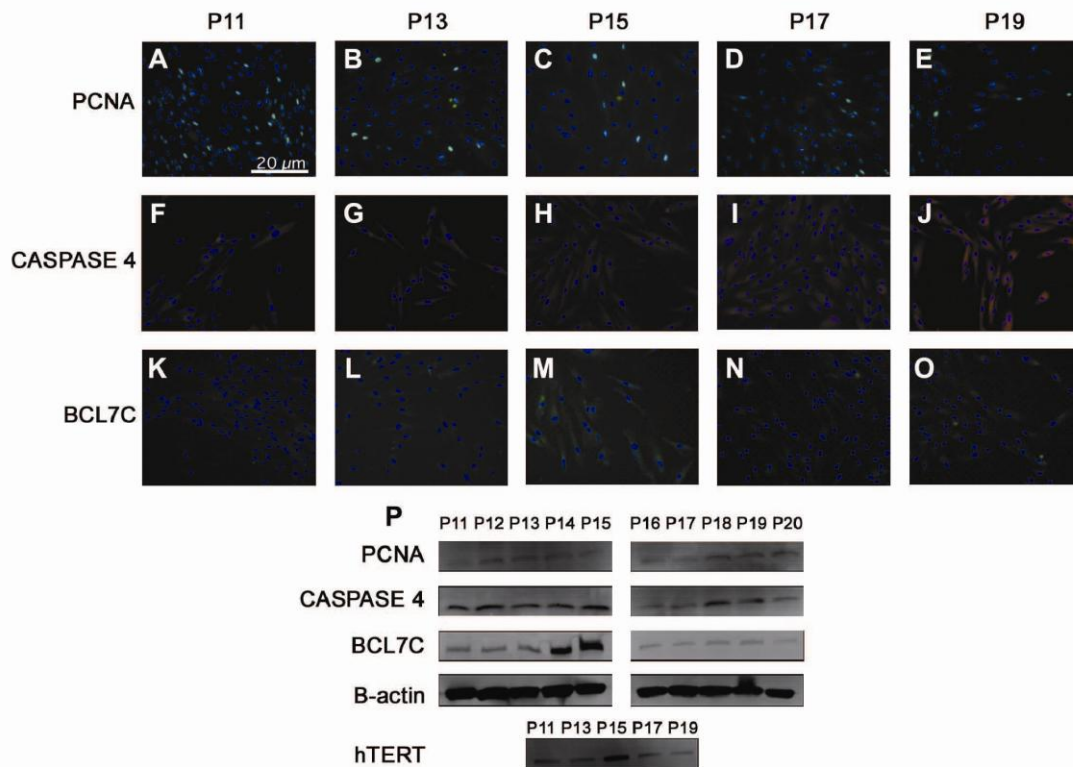


Figure 4. (A–E) Immunofluorescence photomicrographs of hDPSCs at passages 11, 13, 15, 17 and 19 of PCNA (green signal on nuclei). (F–J) Immunofluorescence photomicrographs of hDPSCs at passages 11, 13, 15, 17 and 19 of caspase 4 (cytoplasmic orange signal). (K–O) Immunofluorescence photomicrographs of hDPSCs at passages 11, 13, 15, 17 and 19 of BCL7C (cytoplasmic green signal). All images were counterstained with 4,6-diamino-2-phenylindole (blue nuclei). (P) Analysis of caspase 4, BCL7C, PCNA, hTERT and β -actin expression by Western blot, from passages 11–20.

11–20, confirming the maintenance of cell viability and cell proliferation of hDPSCs after 20 subcultures. hTERT expression was higher at passage 15 probably as a consequence of a cellular mechanism to prevent senescence. Similar results were seen regarding BCL7C anti-apoptotic protein expression. After passage 15, hTERT activity decreased confirming a loss of proliferation, as also confirmed by PCNA. This senescence stage occurs at the same time as a loss of cell viability owing to an apoptotic process.

EPXMA allows qualitative and quantitative determination of the ionic elements that play a role in cell viability. Mainly, the K/Na ratio is considered to be one of the most powerful microanalytic indicators of cell damage, and many studies have been carried out to determine cell viability accurately in other cell types by K/Na ratio quantification (28,29,36,37). Our EPXMA results found a significant loss of cell viability at passages 12 and 13 subcultures as determined by K/Na ratio. Potassium concentrations were significantly reduced at these subcultures, and

sodium was increased compared with previous passages. Chlorine levels significantly decreased at passage 12. Various authors described that the early decrease in potassium and chloride concentrations is a powerful early predictor of pre-apoptosis, reporting that the decrease in chloride may be the more important of the two and may be used to predict early cell damage (30,38). To confirm this hypothesis in our study, several techniques were used to detect apoptosis on cultured cells.

First, we used the TUNEL assay to detect cells with DNA fragmentation (i.e., cells in an established state of apoptosis). Second, the expression of two relevant proteins (the pro-apoptotic protein caspase 4 and the anti-apoptotic protein BCL7C) was analyzed by Western blotting. As the results obtained showed, a significant percentage of apoptotic cells was found by TUNEL assay at passage 17, with almost 10% of the cells undergoing apoptosis at passage 19, confirming that these later passages could not be adequate for tissue engineering protocols. In accordance with these results, expression

276 M. A. Martín-Piedra et al.

of the pro-apoptotic protein caspase 4 was higher from passages 16–20 compared with passages 11–15, especially at passages 18–20, when ACVL showed its lowest values. In contrast, the expression of the anti-apoptotic marker BCL7C was down-regulated from passage 16 and up-regulated at passages 14–15, when high viability levels were detected and TUNEL assay showed few apoptotic cells. As seen, expression of BCL7C was lower as hDPSCs were subcultured. In agreement, Garzon *et al.* (22) reported that some genes of the BCL family (BCL2L2) may be involved in complex life-death equilibrium in cultured mesenchymal stromal cells.

In conclusion, hDPSCs obtained from donors 18–30 years old and cultured in DMEM showed high ACVLs up to passage 14, indicating hDPSCs of 14 passages could be used in regenerative medicine and tissue engineering. These cells still maintain high functionality and membrane integrity as well as high proliferation capabilities. From passage 15 to the end of the study, some relevant ionic changes occurred, leading to apoptosis and loss of proliferation. Consequently, subcultures of hDPSCs far from passage 15 should be discarded for therapeutic use because they do not fulfill the minimum quality control requirements for clinical use. In contrast to the general assumption that only the first cell passages should be clinically used, these stem cells isolated from an embryonic-like tissue such as the dental pulp are able to maintain adequate cell viability and functionality (cytoplasmic and mitochondrial) until passage 14. These results may lead to a revision of the cell culture protocols that are currently accepted. However, these results should be confirmed by independent studies including teeth from younger and older donors and different culture media.

Acknowledgments

This study was supported by the Spanish Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica (I+D+I) from the National Ministry of Science and Innovation (Instituto de Salud Carlos III), grants FIS PI11/1582 and PI11/2668. MAM-P is a recipient of a fellowship (AP2010-0279) from the Spanish Ministry of Education (“Formación de Profesorado Universitario 2010” program).

Disclosure of interest: The authors have no commercial, proprietary or financial interest in the products or companies described in this article.

References

- Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011; 136:455–73.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Post-natal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:13625–30.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315–7.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:191–9.
- Graziano A, d’Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4:21–6.
- Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531–5.
- Laino G, d’Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, 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.
- Laino G, Graziano A, d’Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006;206:693–701.
- Buurma B, Gu K, Rutherford RB. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:282–9.
- Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.* 1992;37:945–52.
- Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, 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;14:149–56.
- Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol.* 1998;174: 194–205.
- Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nör JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater.* 2013;29:97–102.
- Yu J, Deng Z, Shi J, Zhai H, Nie X, Zhuang H, et al. Differentiation of dental pulp stem cells into regular-shaped dentin-pulp complex induced by tooth germ cell conditioned medium. *Tissue Eng.* 2006;12:3097–105.
- Xiao L, Tsutsui T. Three-dimensional epithelial and mesenchymal cell co-cultures form early tooth epithelium invagination-like structures: expression patterns of relevant molecules. *J Cell Biochem.* 2012;113:1875–85.
- Rizk A, Rabie ABM. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy.* 2013;15:712–25.
- Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Impl.* 2011; 26:947–54.
- Seong JM, Kim B-C, Park J-H, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y-S. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater (Bristol, England).* 2010;5:062001.

Cell viability of long-term human dental pulp stem cells 277

19. Armiñán A, Gandía C, Bartual M, García-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18:907–18.
20. Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JL, García JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe x-ray microanalysis. *J Cell Physiol.* 2007;211:692–8.
21. Garzon I, Carriel V, Marin-Fernandez AB, Oliveira AC, Garrido-Gomez J, Campos A, et al. A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering. *PLoS One.* 2012;7:e51961.
22. Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the cell viability of human Wharton's jelly stem cells for use in cell therapy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012;18:409–19.
23. Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, et al. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytherapy.* 2013;15:507–18.
24. Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 2008;22:440–8.
25. Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp Cell Res.* 1956;11:297–305.
26. Phillips HJ. In dye exclusion tests for cell viability. 2nd ed. New York: Academic Press; 1973.
27. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127–52.
28. Roomans GM. Application of x-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater.* 2002;3:1–8.
29. Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by x-ray microanalysis. *Cell Biol Int.* 1994;18:915–6.
30. Zierold K, Hentschel H, Wehner F, Wessing A. Electron probe x-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cry-oxification. *Scanning Microsc Suppl.* 1994;8:117–26; discussion 126–7.
31. Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and cell biology: an introduction to pathology.* Philadelphia: Saunders; 2011.
32. Welsch U, Deller T. *Sobotta Lehrbuch Histologie.* Munich: Urban & Fischer; 2010.
33. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, 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;184:105–16.
34. Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, et al. Human dental pulp stem cells— isolation and long term cultivation. *Acta Med (Hradec Králové).* 2007;50:195–201.
35. Rodriguez IA, Lopez-Gonzalez G, Rodriguez MA, Campos-Sanchez F, Alaminos M. Biological evaluation of 2-hydroxyethylmethacrylate (HEMA) toxicity in human gingival fibroblasts with histochemical x-ray microanalysis. *J Adhes Dent.* 2011;13:375–81.
36. Roomans GM. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10:1–19.
37. Salido M, Vilches J, Roomans GM. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 2004;28:397–402.
38. Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007; 22:631–40.

5. DISCUSIÓN

El objetivo de la Ingeniería Tisular es el desarrollo de sustitutos artificiales para regenerar o reparar un tejido dañado o perdido. Para ello, es necesaria la utilización de una fuente de células que, además de presentar la capacidad de proliferación, autorrenovación y multipotencialidad, tengan un estado biológico compatible con la realización de dichas funciones en el momento de su utilización, es decir, que tengan un estado de viabilidad óptimo.

En este sentido, en las publicaciones científicas que conforman la presente Tesis Doctoral, se han evaluado los perfiles de viabilidad celular de dos fuentes potenciales de células madre de origen mesenquimal procedentes de dos tejidos conectivos mucosos, como son las células madre de la pulpa dental humana (hDPSC), de origen dental; y las células madre de la gelatina de Wharton, del cordón umbilical humano (hWJSC), de origen no dental.

Se han utilizado estas dos poblaciones de células madre debido a su facilidad de obtención y de expansión *ex vivo* frente a otras localizaciones de células madre como son el tejido adiposo (ADSC) o la médula ósea (BMSC), así como su gran potencialidad y capacidad de proliferación en cultivo (Martin-Piedra *et al.*, 2013).

La evaluación de los perfiles de viabilidad celular que se ha desarrollado en la presente Tesis Doctoral constituye no sólo un procedimiento de control de calidad para establecer el momento óptimo en el que estas células deben utilizarse, sino además, un importante modelo para investigar la senescencia celular en condiciones de cultivo, así como para identificar los mecanismos de muerte celular subyacentes.

La elección de aquellos subcultivos celulares que presenten mejor viabilidad y capacidad proliferativa supone un factor crítico para predecir los resultados clínicos

de los tejidos artificiales que serán desarrollados (Alaminos *et al.*, 2006, Garzón *et al.*, 2009, Garzon *et al.*, 2009, González-Andrades *et al.*, 2009).

En primer lugar, en la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral, se obtuvieron cultivos primarios tanto de hDPSC como de hWJSC mediante la técnica de digestión enzimática, ya que las células obtenidas mediante la digestión de la matriz extracelular presentan una tasa de proliferación significativamente mayor (Huang *et al.*, 2006) en comparación a cuando se establecen cultivos primarios a partir de explantes (Park *et al.*, 2004). La aplicación de estas técnicas en la presente Tesis Doctoral permitió obtener cultivos celulares adecuados de hDPSC y hWJSC de posible utilidad en protocolos de Ingeniería Tisular.

Además, las células obtenidas en los primocultivos se consideran células madre mesenquimales ya que, en ambas fuentes celulares, se confirmaron los criterios establecidos por el *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* de la *International Society for Cell Therapy* (Dominici *et al.*, 2006). En este sentido, los primocultivos, así como los posteriores subcultivos de hWJSC y de hDPSC mantenían una tasa de proliferación adecuada, así como capacidad de adhesión a sustratos plásticos. Igualmente, la diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica fue evidenciada mediante tinciones histoquímicas específicas (Figura 9). Asimismo, el estudio de marcadores de superficie mediante citometría de flujo reveló que estas células expresaron marcadores de células madre indiferenciadas como son CD90, CD146 y CD105, así como la expresión negativa de CD45 (Figura 10). Todos estos datos confirman la idoneidad de los cultivos celulares establecidos en la presente Tesis Doctoral.

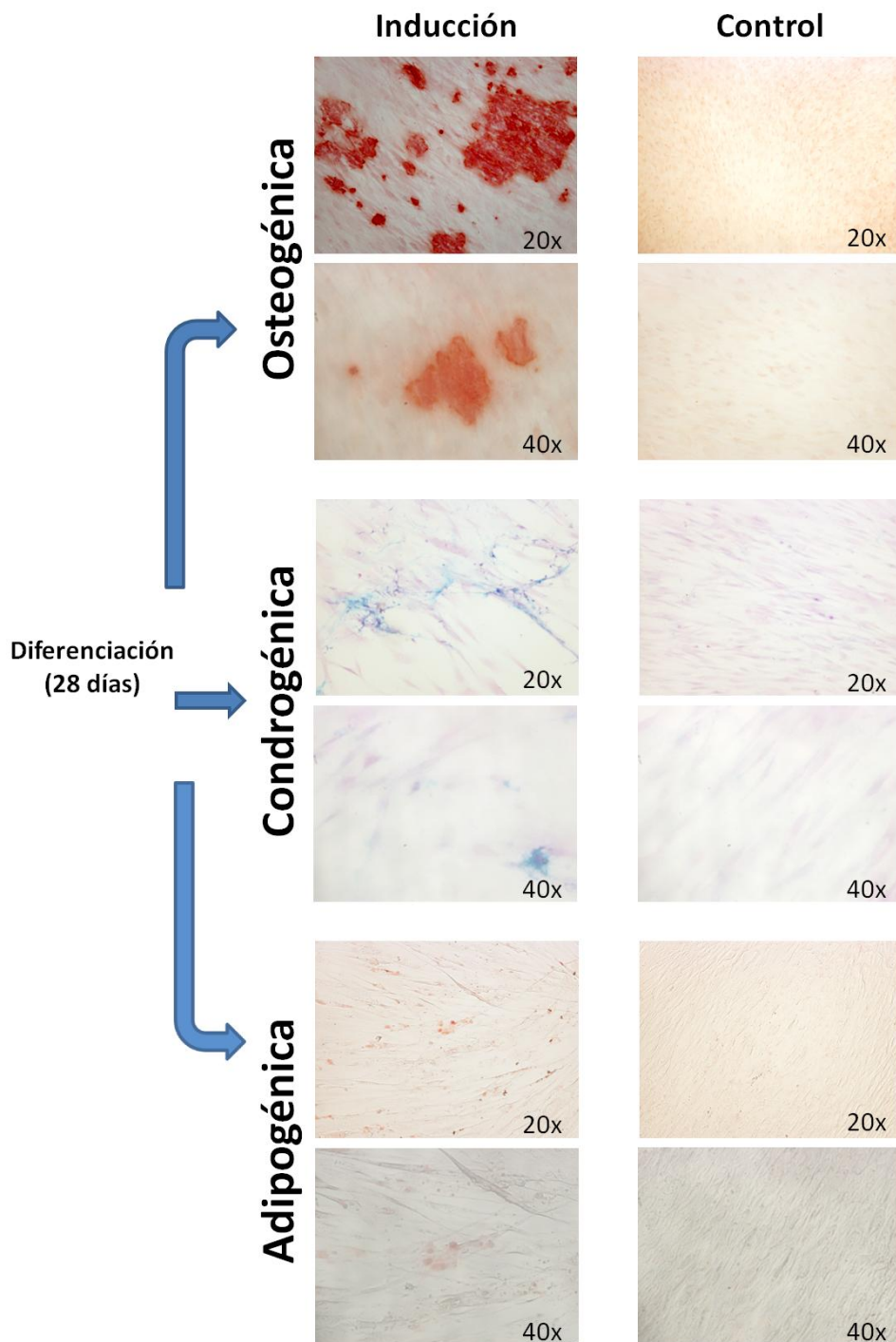


Figura 9. Microfotografías obtenidas con microscopio óptico de células madre de la pulpa dental (hDPSC) cultivadas en medios selectivos para la transdiferenciación osteogénica, condrogénica y adipogénica durante 28 días y teñidas mediante la técnica de *Alizarin Red S* (osteogénica), *Alcian Blue* (condrogénica) y *Oil Red O* (adipogénica).

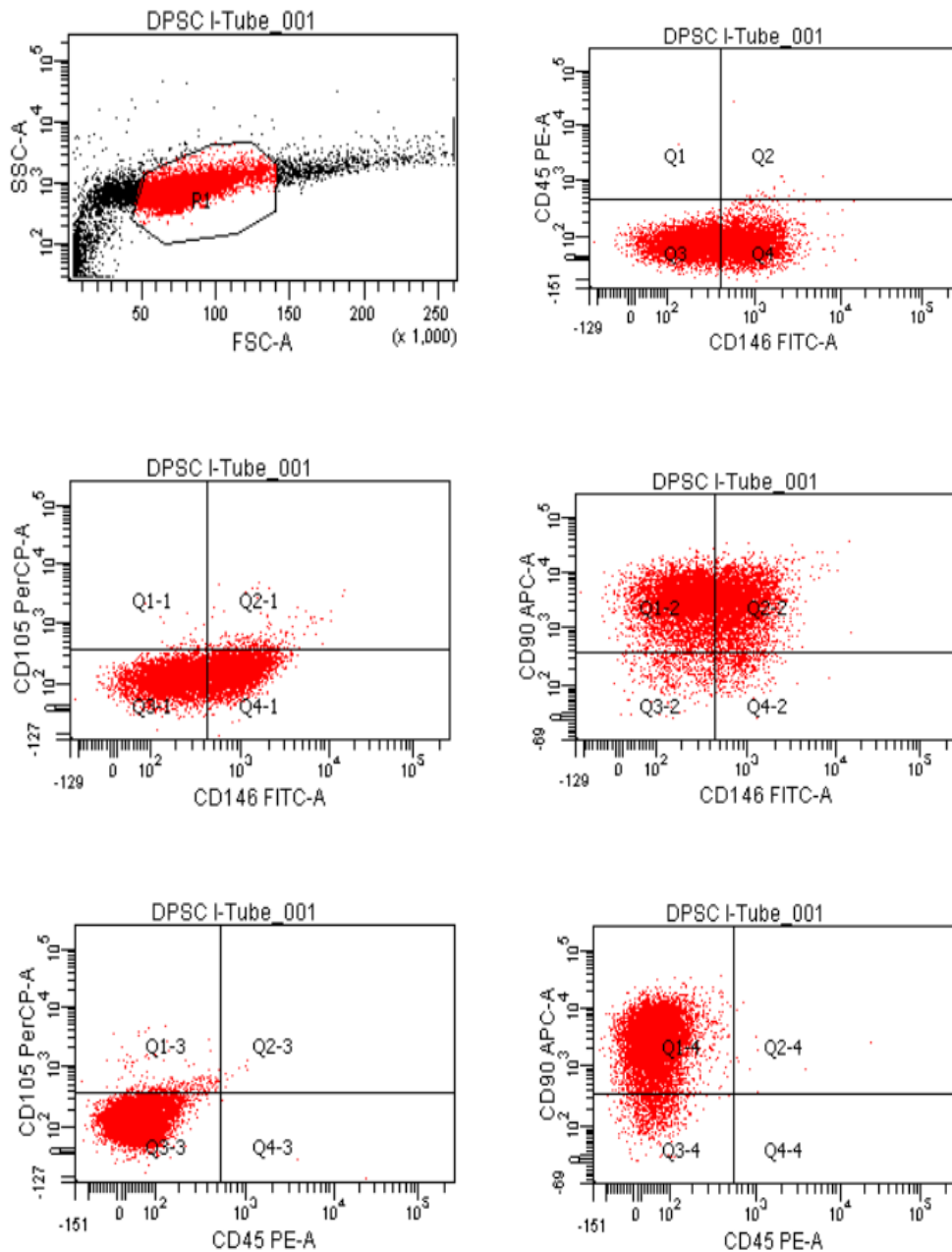


Figura 10. Gráficas de citometría de flujo para identificación de marcadores CD45, CD90, CD105 y CD146 en hDPSC del primer subcultivo.

Una vez establecidos y caracterizados los cultivos primarios, se procedió a evaluar su viabilidad en sucesivos pases celulares. En la actualidad, no existe ningún método validado de forma exclusiva para el estudio de la viabilidad celular. En cualquier caso, como afirma Stoddart, siempre debería usarse más de un ensayo

para confirmar los resultados obtenidos tras la realización de una única prueba (Stoddart, 2011). Por ello, en la investigación realizada, se ha utilizado una combinación de distintos ensayos de viabilidad celular, cada uno de los cuales evalúa el *status* biológico de la célula desde un punto de vista diferente. Con ello, se consigue aumentar la sensibilidad y la especificidad de los resultados obtenidos. Asimismo, los resultados de las distintas pruebas han sido normalizados y tratados en conjunto mediante el desarrollo de un parámetro que hemos denominado *Average Cell Viability Levels* (ACVL) aplicado a tres de los trabajos que conforman esta Tesis Doctoral (Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2013, Martin-Piedra *et al.*, 2014). Los cuatro ensayos que se combinan en el ACVL son los siguientes: una prueba de evaluación de la integridad de la membrana, —el método de exclusión de azul tripán—; una prueba funcional que evalúa la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, —el ensayo WST-1—; una técnica mixta que evalúa de forma conjunta el estado de la membrana y el estado metabólico citoplasmático, —el ensayo LIVE/DEAD—; y, por último, una prueba que mediante la microscopía analítica por energía dispersiva de rayos X (EPXMA) nos permite conocer de forma precisa los cambios iónicos intracelulares que determinan la viabilidad celular. El desarrollo del método combinado ACVL permite determinar de forma muy exacta y fiable los niveles de viabilidad de una población celular y abre la puerta a su utilización en todo tipo de protocolos de Ingeniería Tisular.

Estudios previos demostraron que cuando las células madre adultas se mantienen en condiciones de cultivo durante varios subcultivos consecutivos, los perfiles de viabilidad celular suelen mostrar una curva que se divide en tres fases diferenciadas (Alaminos *et al.*, 2007, Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2013). En primer lugar, durante los primeros subcultivos, la viabilidad disminuye ligeramente como respuesta a la adaptación inicial de las células a las condiciones *ex vivo*. En

segundo lugar, tras la adaptación inicial, la viabilidad celular recupera los niveles basales e incluso los supera, alcanzándose los niveles máximos de viabilidad. Es en esta fase donde se recomienda utilizar las células para Ingeniería Tisular. En último lugar, a partir de un determinado subcultivo, la senescencia celular se hace evidente, y la viabilidad celular va disminuyendo progresivamente, generalmente asociada a la aparición de uno o varios mecanismos de muerte celular por necrosis y/o apoptosis. Las células que se encuentren en esta última fase de senescencia celular no deberían ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular.

A este respecto, los resultados de ACVL obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran que, en ambos casos, tanto las células de origen dental (hDPSC) como las células de origen no dental (hWJSC) tienden a disminuir su la viabilidad determinada mediante ACVL en los primeros subcultivos. Probablemente, la utilización de métodos enzimáticos y de medios de cultivo supone un gran cambio para las células, que requieren un periodo de adaptación a las condiciones *ex vivo*. Los resultados de EPXMA para las células de origen dental (hDPSC) mostraron una disminución significativa del potasio intracelular en el segundo subcultivo, acompañado de una disminución de cloro, mientras que la concentración de sodio se mantuvo estabilizada. Además, el calcio también se elevó durante los dos primeros subcultivos (Martin-Piedra *et al.*, 2012). En el caso de las células de la gelatina de Wharton (hWJSC), de origen no dental, el patrón iónico observado fue muy similar, con una disminución significativa de cloro y potasio entre el segundo y tercer subcultivo (Garzon *et al.*, 2012b). La ratio K/Na, utilizada como indicador de viabilidad celular, se ha validado como uno de los indicadores microanalíticos más fiables para determinar el daño celular (Warley *et al.*, 1994, Roomans, 2001, Salido *et al.*, 2004).

El perfil iónico anteriormente descrito es característico de una población en estado pre-apoptótico, en el que la concentración intracelular de cloro y potasio inicialmente disminuyen (Fernandez-Segura *et al.*, 1999). A partir del tercer subcultivo en las hDPSC y del cuarto subcultivo en las hWJSC, los niveles de cloro y sodio vuelven a aumentar. Asimismo, el porcentaje de células tripán-positivas aumenta en estos subcultivos en ambas fuentes celulares, lo que indica la existencia de cierto daño a nivel de la membrana plasmática. El porcentaje de células viables fue siempre, en cualquier caso, superior al 75%. El ensayo mixto LIVE/DEAD también mostró una disminución de la viabilidad celular en el segundo subcultivo de hDPSC y en el segundo y tercer subcultivo de hWJSC. Estos resultados sugieren que las células mesenquimales aisladas de tejidos mucosos responden de manera muy similar al procedimiento de expansión *ex vivo*, independiente de si su origen es dental o no dental. En consecuencia, tanto las hDPSC como las hWJSC sufren un proceso apoptótico durante los tres primeros subcultivos, probablemente debido a una combinación de la adaptación celular al medio *ex vivo*, así como al proceso de estrés enzimático sufrido por las células durante la obtención de los primocultivos (Ikejima *et al.*, 1999, Van Landuyt *et al.*, 2010). Estos resultados concuerdan con otros estudios previos realizados sobre otros tipos celulares (Alaminos *et al.*, 2007, Rodríguez-Morata *et al.*, 2008).

De forma complementaria, la utilización del ensayo TUNEL (*transferase dUTP nick-end-labeling*) permitió confirmar el estado apoptótico de las hDPSC, mediante la detección de oligonucleótidos intranucleares como consecuencia de la fragmentación de ADN. Estos resultados iniciales confirman el importante papel que desempeña la EPXMA como técnica que permite la detección altamente sensible y precoz de cambios en el metabolismo celular relacionados con la viabilidad celular con anterioridad a la existencia de alguna alteración evidenciable en la membrana

plasmática (Martin-Piedra *et al.*, 2012). En el caso de las hWJSC, el estudio de expresión génica mediante *microarray* permitió identificar la sobreexpresión de genes pro-apoptóticos como FASTKD2 y BNIP3L que podrían estar relacionados con esta respuesta inicial.

En relación con la prueba metabólica WST-1, que determina la capacidad proliferativa y la funcionalidad mitocondrial, no se detectaron grandes cambios, si bien se apreció una disminución significativa en el segundo subcultivo de hDPSC, lo cual sugiere la existencia de cierta alteración metabólica durante este periodo adaptativo inicial a las condiciones de cultivo (Martin-Piedra *et al.*, 2013).

Tras esta etapa inicial de adaptación, se inicia una segunda fase. En dicha fase, la viabilidad celular, medida mediante ACVL, se recupera hasta alcanzar los niveles basales en el cuarto subcultivo en las hWJSC, y en el quinto subcultivo en las hDPSC (Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2013). Esta mejoría en la viabilidad se pone en evidencia a través de la recuperación del estado funcional mitocondrial en el caso de las células de la pulpa (hDPSC), mientras que en el caso de las células de la gelatina de Wharton (hWJSC), la recuperación de la viabilidad se evidencia a través del perfil iónico intracelular, concretamente de la ratio K/Na.

La viabilidad celular, determinada mediante ACVL, alcanza en esta segunda fase el valor más elevado. De ello puede deducirse que esta fase constituye el momento óptimo para la utilización de estas células en los protocolos de Ingeniería Tisular. Las hWJSC muestran su momento de máxima viabilidad en el sexto subcultivo, mientras que las hDPSC lo hacen en el noveno subcultivo (Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2013). Resultados similares fueron obtenidos por Kerkis *et al.*

(Kerkis *et al.*, 2006), que concluyen que la capacidad proliferativa de las hDPSC es óptima tras 10 subcultivos. Estos resultados, sin embargo, contrastan con los obtenidos para otras poblaciones de células adultas como son las células endoteliales (Rodríguez-Morata *et al.*, 2008) o células corneales (Alaminos *et al.*, 2007). En estos casos, la máxima viabilidad se alcanzó en el tercer subcultivo, momento a partir del cual la viabilidad celular se reduce dejando paso a la senescencia celular, si bien hay que aclarar que en estos casos, los resultados de viabilidad celular no están publicados en términos de ACVL, sino mediante la utilización de ensayos aislados. La razón de que las células madre mesenquimales alcancen su máxima viabilidad tras varios subcultivos puede estar relacionado con su inmadurez y su carácter indiferenciado (Martin-Piedra *et al.*, 2013). La pulpa dental y la gelatina de Wharton se consideran tejidos conectivos mucosos. Este tipo de tejido es catalogado usualmente como un tejido conjuntivo pseudo-embionario (Welsch y Deller, 2010, Kierszenbaum y Tres, 2011), lo cual también podría explicar el hecho de que estas células preserven características óptimas durante más tiempo, en relación con otros tipos de células (Martin-Piedra *et al.*, 2013). En cualquier caso, es importante señalar que nuestra investigación ha puesto de relieve que las hDPSC se mantienen en óptimas condiciones durante tres subcultivos más que las hWJSC, lo cual sugiere que las hDPSC podrán tener un carácter aún más indiferenciado que las células del cordón umbilical.

Durante esta segunda fase de máxima viabilidad celular, las hWJSC y las hDPSC pusieron de relieve, a través de las distintas técnicas utilizadas, una integridad de membrana apropiada —determinada mediante el ensayo de exclusión de azul tripán y el ensayo mixto LIVE/DEAD—, así como un buen *status* metabólico —determinado mediante WST-1— y un perfil iónico óptimo —determinado mediante EPXMA—. Ello demuestra una alta correlación entre las distintas pruebas realizadas (Garzon *et al.*,

2012b), aportando validez a la metodología combinada desarrollada en la presente Tesis Doctoral. Algunos parámetros adicionales ayudan a confirmar los hallazgos descritos como, por ejemplo, una elevada concentración de azufre intracelular durante el sexto subcultivo de hWJSC, lo cual podría relacionarse con un aumento en la síntesis de glicosaminoglicanos sulfatados y, por tanto, con el buen *status* funcional de estas células (Roomans, 2002b).

La determinación del nivel de expresión génica a partir de RNA microarray y su posterior análisis mediante SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) en hWJSC también mostró la activación de algunos genes relacionados con la síntesis proteica, el crecimiento celular o la proliferación, lo cual se correlacionó con los datos de viabilidad obtenidos con las otras técnicas, aunque la capacidad de proliferación no mostró diferencias significativas según el ensayo WST-1 (Garzon *et al.*, 2012b).

Cuando el proceso de cultivo secuencial se alarga en el tiempo, las células entran en una fase compatible con un periodo de senescencia y la viabilidad celular empieza a disminuir (Zhu y Joyce, 2004, Rodríguez-Morata *et al.*, 2008). El estudio de la senescencia celular, así como los mecanismos subyacentes a la misma, nos permiten identificar, por un lado, aquellos subcultivos que no son recomendables para su empleo en protocolos de Ingeniería Tisular o Medicina Regenerativa y, por otro lado, profundizar en los procesos de involución celular. Esta fase de pérdida de viabilidad celular, acompañada de uno o varios mecanismos de muerte celular, constituye la tercera y última fase de la curva de viabilidad celular. La senescencia empieza a manifestarse de forma progresiva justo después del momento óptimo de viabilidad (viabilidad celular máxima), es decir, a partir del séptimo subcultivo en las hWJSC, y a partir del décimo subcultivo en las hDPSC, según los resultados de

ACVL obtenidos en nuestra Tesis Doctoral (Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2014)

Durante esta última fase, la viabilidad celular determinada mediante ACVL presenta una progresiva disminución asociada, principalmente, al descenso de la ratio K/Na. Este hallazgo confirma el papel del EPXMA como un método altamente sensible que permite detectar precozmente cambios iónicos relacionados con la viabilidad celular. En el caso de las hWJSC, la disminución de la ratio K/Na vino acompañada de un aumento de células tripán-positivas (no viables), mientras que en el caso de las hDPSC, este descenso vino acompañado de un mayor número de células no viables detectadas mediante LIVE/DEAD. Ambos ensayos, LIVE/DEAD y método de exclusión de azul tripán, sustentan su fundamento biológico en la alteración de la integridad de las membranas, lo que sugiere que las células de los subcultivos avanzados podrían tener alterada la integridad de sus membranas celulares. Sin embargo, la capacidad proliferativa, evaluada mediante WST-1, no presenta grandes cambios durante la senescencia para ninguna de las dos fuentes celulares evaluadas. Estos resultados sugieren, una vez más, el comportamiento similar que presentan las MSC procedentes de ambos tejidos mucosos a lo largo de la expansión mediante subcultivos consecutivos, independientemente de si su origen es dental (hDPSC) o no dental (hWJSC) (Garzon *et al.*, 2012b, Martin-Piedra *et al.*, 2014).

La introducción de pruebas complementarias nos permite conocer con mayor precisión cuáles son los procesos celulares que dirigen este último estadio de la viabilidad celular. El análisis de expresión génica realizado sobre los subcultivos de hWJSC permitió identificar algunos de los genes posiblemente responsables. Concretamente, se han podido identificar cuatro genes que al parecer podrían estar

asociados a los resultados obtenidos en el ACVL (Garzon *et al.*, 2012b). Por una parte, los genes BCL2L2 (perteneciente a la familia BCL-2) y TNFAIP8 (perteneciente a la familia de genes del factor de necrosis tumoral) son genes inhibidores de la apoptosis cuya función ha sido previamente demostrada en células humanas y tumorales (Kumar *et al.*, 2000, Sasi *et al.*, 2009). La acción combinada de estas señales antiapoptóticas podría ser responsable de los altos niveles de viabilidad encontrados en el quinto y sexto subcultivo de las hWJSC y su menor expresión podría afectar de forma importante al proceso de senescencia. Por otra parte, los genes BNIP3L y FASTKD2 han sido identificados como genes proapoptóticos o reguladores de la apoptosis y se relacionan asimismo con el proceso de viabilidad celular (Yasuda *et al.*, 1999, Yeung *et al.*, 2011). Posiblemente, la viabilidad celular sea resultado de un complejo equilibrio entre estos y otros genes y, tras sucesivos cultivos, dicho equilibrio se rompe en favor de las señales apoptóticas, lo cual concuerda con el proceso preapoptótico detectado mediante EPXMA y la baja viabilidad celular detectada mediante ACVL (Garzon *et al.*, 2012b).

De forma análoga, las células obtenidas de la pulpa dental humana (hDPSC) sufren un proceso parecido a partir del duodécimo y decimotercer subcultivo, momento en el que los marcadores microanalíticos detectan un perfil iónico compatible con el inicio de la apoptosis (disminución de potasio y cloro junto con un ligero aumento de sodio) (Zierold *et al.*, 1994, Sanchez-Quevedo *et al.*, 2007).

Todas estas señales constituyen el primer indicio de subcultivos que muestran senescencia. En el decimoquinto subcultivo de hDPSC y en el octavo subcultivo de hWJSC, estos cambios se identifican en los ensayos de exclusión de azul tripán y LIVE/DEAD, que detectan valores mínimos en los dos últimos subcultivos, lo cual sugiere que existe daño en la membrana celular, tal y como se ha mencionado con

anterioridad (Martin-Piedra *et al.*, 2014). Estos resultados están en concordancia con trabajos previos en los que se afirma que las células madre de origen dental (hDPSC) son muy resistentes en cultivo y pueden permanecer en estado de indiferenciación y conservando la estabilidad citogenética, así como expandirse superando el límite de Hayflick (duplicar la población celular más de sesenta veces) (Suchánek *et al.*, 2007).

Para confirmar los resultados de la viabilidad celular en pases celulares de hDPSC de larga duración (más de diez subcultivos), se evaluó la expresión específica de PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*) y de hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) en los últimos diez subcultivos de hDPSC. La expresión de PCNA fue algo mayor en los subcultivos XI-XV en comparación con los subcultivos XVI-XX, si bien estas diferencias no fueron muy marcadas. Estos resultados, unidos a la ausencia de diferencias significativas detectadas por el ensayo WST-1 en los diez últimos subcultivos (XI-XX) nos permiten afirmar que la capacidad proliferativa de las hDPSC se mantiene de forma aceptable hasta veinte subcultivos. (Martin-Piedra *et al.*, 2014)

La actividad de la telomerasa, detectada a partir de la expresión de hTERT mediante *western blotting*, fue elevada en el subcultivo XV, al igual que la expresión de BCL7C (proteína antiapoptótica) que también alcanzó su punto máximo de expresión, lo cual concuerda con algunos estudios previos (Mokry *et al.*, 2010). Probablemente, estos resultados obtenidos sugieren la presencia de un mecanismo celular para prevenir la senescencia. A partir del subcultivo XVI-XVII, la expresión de estas señales se reduce, lo que, junto a un aumento en la expresión de proteínas proapoptóticas, como la Caspasa 4, desemboca irreversiblemente en el proceso apoptótico que tendrá como consecuencia la pérdida progresiva de la viabilidad celular determinada

mediante ACVL (Martin-Piedra *et al.*, 2014). Estos hallazgos sugieren la existencia de un complejo equilibrio entre distintas señales que influyen, de forma directa o indirecta, en el *status* biológico celular, en su senescencia, así como pueden desencadenar la entrada en un estado de muerte celular como es la apoptosis, de forma similar a lo que ocurre con las hWJSC a partir del séptimo subcultivo, como ya fue mencionado previamente.

Una de las principales consecuencias de la apoptosis es la fragmentación de ADN que ocurre en el interior del núcleo. La biomarcación de oligonucleótidos de ADN mediante fluorescencia (ensayo TUNEL) detectó un aumento de células que estaban en una fase activa de fragmentación de ADN a partir del XVII subcultivo, lo cual confirma los hallazgos previamente descritos.

En resumen, la combinación de varias pruebas con distinto fundamento biológico nos permite un conocimiento más amplio y preciso de cualquier proceso biológico que pretendamos evaluar. En nuestro caso, la metodología combinada ACVL desarrollada en la presente Tesis Doctoral nos ha permitido una detección más sensible y, por tanto, un diagnóstico más precoz del *status* biológico de las poblaciones celulares que pretendemos emplear para elaborar tejidos artificiales en el laboratorio. De dicho diagnóstico dependerá que las células utilizadas en Ingeniería Tisular tengan unas propiedades óptimas en el momento exacto de su utilización. La utilización de células cuyas propiedades se encuentren parcial o totalmente comprometidas influirá de forma negativa en la calidad de los tejidos elaborados y, por tanto, en la efectividad de dichos tejidos una vez sean implantados en el huésped correspondiente. Es por ello que la evaluación de la viabilidad celular constituye un control de calidad y un factor pronóstico de gran importancia en el desarrollo de la Ingeniería Tisular.

Los cultivos evaluados en esta Tesis Doctoral son células madre mesenquimales procedentes de tejidos mucosos de origen dental (hDPSC) y no dental (hWJSC). Tras un proceso de subcultivo secuencial, las hWJSC alcanzan un punto óptimo para su utilización en Medicina Regenerativa o Ingeniería Tisular en el sexto subcultivo, mientras que las hDPSC tienen una viabilidad óptima tras nueve subcultivos. De igual manera, no es recomendable el uso de los cultivos de hWJSC que hayan sido subcultivados más de siete veces, o las hDPSC que hayan sido subcultivadas más de catorce veces, ya que son cultivos en estado de senescencia con una viabilidad celular reducida. El hecho de que las células de origen dental mantengan niveles de viabilidad celular durante un mayor número de pases celulares sugiere que estas células, localizadas en la pulpa del diente permanente, podrían presentar menores niveles de diferenciación celular que las hWJSC obtenidas en el momento del nacimiento.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la investigación realizada en la presente Tesis Doctoral permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Los protocolos de aislamiento y de cultivo celular desarrollados en la presente Tesis Doctoral permiten la obtención de células madre mesenquimales de origen dental (células madre de la pulpa dental humana —hDPSC) y no dental (células madre de la gelatina de Wharton humana —hWJSC) verificándose el cumplimiento de los criterios de caracterización establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para células madre mesenquimales, sin que se hayan detectado alteraciones artefactuales significativas durante el proceso.
2. El desarrollo de la técnica combinada ACVL permitió evaluar la viabilidad celular con gran sensibilidad y especificidad. Según esta técnica, las células madre mesenquimales de origen dental (hDPSC) y no dental (hWJSC) poseen un alto perfil de viabilidad celular en el conjunto de los subcultivos secuenciales desarrollados en cada tipo celular. En ambos casos, el perfil de viabilidad puede subdividirse en tres fases: una fase inicial en la que la viabilidad está parcialmente comprometida como consecuencia de la adaptación de las células al medio *ex vivo*, una segunda fase en la que la viabilidad aumenta hasta alcanzar un valor máximo, y una tercera fase en la que la viabilidad disminuye progresivamente como consecuencia de la senescencia celular, lo que suele ir asociado a un proceso apoptótico.

3. Las células madre mesenquimales de origen dental (hDPSC) pertenecientes al noveno subcultivo, tras el análisis combinado de varios ensayos (ACVL), presentan el nivel de viabilidad celular óptimo para su utilización como fuente celular en protocolos de Ingeniería Tisular.

4. Las células madre mesenquimales de origen no dental (hWJSC) correspondientes al sexto subcultivo, tras el análisis combinado de varios ensayos (ACVL), presentan el nivel de viabilidad celular óptimo para su utilización como fuente celular en protocolos de Ingeniería Tisular.

5. Las células madre mesenquimales de origen dental (hDPSC) pertenecientes a los subcultivos segundo a séptimo y decimocuarto a vigésimo, así como las células de origen no dental (hWJSC) pertenecientes a subcultivos del segundo al cuarto y del séptimo al décimo no alcanzan el carácter óptimo que se requiere para que estas células puedan ser utilizadas como fuente celular prioritaria en protocolos de Ingeniería Tisular.

7. BIBLIOGRAFÍA

Alaminos M, Perez-Kohler B, Garzon I, Garcia-Honduvilla N, Romero B, Campos A, et al. Transdifferentiation potentiality of human Wharton's jelly stem cells towards vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2010;223:640-7.

Alaminos M, Sanchez-Quevedo MC, Munoz-Avila JI, Garcia JM, Crespo PV, Gonzalez-Andrades M, et al. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *J Cell Physiol.* 2007;211(3):692-8.

Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Avila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, et al. Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:3311-7.

Allen JC. Sodium and potassium content and viability of mouse mammary gland tissue and acini. *J Dairy Sci.* 1988;71:633-42.

Allison DC, Ridolpho P. Use of a trypan blue assay to measure the deoxyribonucleic acid content and radioactive labeling of viable cells. *J Histochem Cytochem.* 1980;28:700-3.

Armiñán A, Gandía C, Bartual M, García-Verdugo JM, Lledó E, Mirabet V, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cell Dev.* 2009;18:907-18.

Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet.* 2006;367:1241-6.

Bank HL. Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetologia.* 1987;30:812-6.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

Bhuyan BK, Loughman BE, Fraser TJ, Day KJ. Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Exp Cell Res.* 1976;97:275-80.

Bianco P, Gehron Robey P. Marrow stromal stem cells. *J Clin Invest.* 2000;105:1663-8.

Bier FF, von Nickisch-Roseneck M, Ehrentreich-Förster E, Reiss E, Henkel J, Strehlow R, et al. DNA microarrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008;109:433-53.

Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Adv Cancer Res.* 2008;100:133-58.

Bouhadir KH, Mooney DJ. In vitro and in vivo models for the reconstruction of intercellular signaling. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;842:188-94.

Bowtell DD. Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet.* 1999;21:25-32.

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997;64:278-94.

Burton JD. The MTT assay to evaluate chemosensitivity. *Methods Mol Med.* 2005;110:69-78.

Buurma B, Gu K, Rutherford RB. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(4):282-9.

Calle EA, Ghaedi M, Sundaram S, Sivarapatna A, Tseng MK, Niklason LE. Strategies for whole lung tissue engineering. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2014;61:1482-96.

Coco-Martin JM, Oberink JW, van der Velden-de Groot TA, Beuvery EC. Viability measurements of hybridoma cells in suspension cultures. *Cytotechnology*. 1992;8:57-64.

Conconi MT, Burra P, Di Liddo R, Calore C, Turetta M, Bellini S, et al. CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *Int J Mol Med*. 2006;18:1089-96.

da Costa AO, de Assis MC, Marques EdA, Plotkowski MC. Comparative analysis of three methods to assess viability of mammalian cells in culture. *Biocell*. 1999;23:65-72.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol*. 2000;28:875-84.

Debbage PL, Griebel J, Ried M, Gneiting T, DeVries A, Hutzler P. Lectin intravital perfusion studies in tumor-bearing mice: micrometer-resolution, wide-area mapping of microvascular labeling, distinguishing efficiently and inefficiently perfused microregions in the tumor. *J Histochem Cytochem*. 1998;46:627-39.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Edidin M. A rapid, quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J Immunol*. 1970;104:1303-6.

Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*. 1988;53:785-94.

Emilson LB, Dougherty KA, Cockett AT, Urry RL. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability: simple office technique. *Urology*. 1978;11:488-91.

Feng JQ, Luan X, Wallace J, Jing D, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (Dspp) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein. *J Biol Chem.* 1998;273:9457-64.

Fernandez-Segura E, Canizares FJ, Cubero MA, Warley A, Campos A. Changes in elemental content during apoptotic cell death studied by electron probe X-ray microanalysis. *Exp Cell Res.* 1999;253(2):454-62.

Fernandez-Segura E, Warley A. Electron probe X-ray microanalysis for the study of cell physiology. *Methods Cell Biol.* 2008;88:19-43.

Garzon I, Carriel V, Marin-Fernandez AB, Oliveira AC, Garrido-Gomez J, Campos A, et al. A combined approach for the assessment of cell viability and cell functionality of human fibrochondrocytes for use in tissue engineering. *PloS one.* 2012a;7(12):e51961.

Garzon I, Martin-Piedra MA, Alfonso-Rodriguez C, Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Martinez-Gomez C, et al. Generation of a Biomimetic Human Artificial Cornea Model Using Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4073-83.

Garzon I, Miyake J, Gonzalez-Andrades M, Carmona R, Carda C, Sanchez-Quevedo Mdel C, et al. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(8):625-32.

Garzon I, Perez-Kohler B, Garrido-Gomez J, Carriel V, Nieto-Aguilar R, Martin-Piedra MA, et al. Evaluation of the Cell Viability of Human Wharton's Jelly Stem Cells for Use in Cell Therapy. *Tissue Eng Part C Methods.* 2012b;18(6):409-19.

Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Jaranay M, González-Andrades M, Montalvo A, et al. In vitro and in vivo cyokeratin patterns of expression in bioengineered human periodontal mucosa. *J Periodontal Res.* 2009;44:588-97.

Garzon I, Serrato D, Roda O, Del Carmen Sanchez-Quevedo M, Gonzales-Jaranay M, Moreu G, et al. In vitro cyokeratin expression profiling of human oral mucosa substitutes developed by tissue engineering. *Int J Artif Organs.* 2009;32:711-9.

Gerstein M, Lesk AM, Chothia C. Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry.* 1994;33:6739-49.

Geschickter C. The application of dyes in the cancer problem. *Biotech Histochem.* 1930;5:49-64.

Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone.* 1996;19:23S-37S.

Gill RT. Enabling inverse metabolic engineering through genomics. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14:484-90.

Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy.* 2003;5(5):362-9.

Giuliano KA, Post PL, Hahn KM, Taylor DL. Fluorescent protein biosensors: measurement of molecular dynamics in living cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995;24:405-34.

Giuliano KA, Taylor DL. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol.* 1998;16:135-40.

Gomez de Ferraris ME, Campos A. Histología y embriología Bucodental: Ed. Panamericana; 1999.

Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, Del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52:215-22.

González-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Avila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, et al. Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. J Tissue Eng Regen Med. 2009;3:442-9.

Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. Stem Cell Rev. 2008;4(1):21-6.

Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. Mamm Genome. 1992;3:609-19.

Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res. 2002;81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(25):13625-30.

Hall PA, Watt FM. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development. 1989;106:619-33.

Hamilton VT, Habbersett MC, Herman CJ. Flow microfluorometric analysis of cellular DNA: Critical comparison of mithramycin and propidium iodide. J Histochem Cytochem. 1980;28:1125-8.

Hilz FM, Ahrens P, Grad S, Stoddart MJ, Dahmani C, Wilken FL, et al. Influence of extremely low frequency, low energy electromagnetic fields and combined mechanical stimulation on chondrocytes in 3-D constructs for cartilage tissue engineering. *Bioelectromagnetics*. 2014;35:116-28.

Hongpaisan J, Roomans GM. Retaining ionic concentrations during in vitro storage of tissue for microanalytical studies. *J Microsc*. 1999;193:257-67.

Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Exp Cell Res*. 1956;11(2):297-305.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res*. 2006;324(2):225-36.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008;34:645-51.

Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, Ikejima A, Brenner DA, Thurman RG. Pronase destroys the lipopolysaccharide receptor CD14 on Kupffer cells. *Am J Physiol*. 1999;276(3 Pt 1):G591-8.

Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2011;26:947-54.

Jaluria P, Chu C, Betenbaugh M, Shiloach J. Cells by design: a mini-review of targeting cell engineering using DNA microarrays. *Mol Biotechnol*. 2008;39:105-11.

Jaluria P, Konstantopoulos K, Betenbaugh M, Shiloach J. A perspective on microarrays: current applications, pitfalls, and potential uses. *Microb Cell Fact.* 2007;6:4.

Kanafi M, Majumdar D, Bhonde R, Gupta P, Datta I. Midbrain cues dictate differentiation of human dental pulp stem cells towards functional dopaminergic neurons. *J Cell Physiol.* 2014;229:1369-77.

Kanafi MM, Rajeshwari YB, Gupta S, Dadheech N, Nair PD, Gupta PK, et al. Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy.* 2013;15:1228-36.

Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2007;25:319-31.

Karaoz E, Demircan PC, Saglam O, Aksoy A, Kaymaz F, Duruksu G. Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011;136(4):455-73.

Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell stem cell.* 2012;10:709-16.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, 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;184(3-4):105-16.

Kierszenbaum AL, Tres LL. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology.* Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.

Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol.* 1975;66:188-93.

Kumar D, Whiteside TL, Kasid U. Identification of a novel tumor necrosis factor-alpha-inducible gene, SCC-S2, containing the consensus sequence of a death effector domain of fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein. *J Biol Chem.* 2000;275:2973-8.

Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn LJ. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.* 1992;37(11):945-52.

Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, 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(8):1394-402.

Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2006;206(3):693-701.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260(5110):920-6.

Lauer G, Schimming R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: a clinical and immunohistologic study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;59:167-9.

Legrand C, Bour JM, Jacob C, Capiamont J, Martial A, Marc A, et al. Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *J Biotechnol.* 1992;25:231-43.

Li Z, Jiang C-M, An S, Cheng Q, Huang Y-F, Wang Y-T, et al. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.* 2014;20:25-34.

Lockhart DJ, Winzeler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature.* 2000;405:827-36.

Lovschall H, Tummers M, Thesleff I, Fuchtbauer EM, Poulsen K. Activation of the Notch signaling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur J Oral Sci.* 2005;113(4):312-7.

Lu DT, Chen EYT, Lee P, Wang Y-C, Ching W, Markey C, et al. Accelerated neuronal differentiation toward motor neuron lineage from human embryonic stem cell line (H9). *Tissue Eng Part C Methods.* 2014.

Lu L-L, Liu Y-J, Yang S-G, Zhao Q-J, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* 2006;91:1017-26.

Lund RD, Wang S, Lu B, Girman S, Holmes T, Sauv e Y, et al. Cells isolated from umbilical cord tissue rescue photoreceptors and visual functions in a rodent model of retinal disease. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2007;25:602-11.

Lupatov AY, Karalkin PA, Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Yarygin VN, Yarygin KN. Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med.* 2006;142:521-6.

Llames SG, Del Rio M, Larcher F, Garcia E, Garcia M, Escamez MJ, et al. Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation.* 2004;77:350-5.

Ma L, Feng X-Y, Cui B-L, Law F, Jiang X-W, Yang L-Y, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. *Chin Med J (Engl).* 2005;118:1987-93.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Carriel V, Scionti G, et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. *Cytotherapy*. 2014;16:266-77.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Oliveira AC, Alfonso-Rodriguez CA, Sanchez-Quevedo MC, Campos A, et al. Average cell viability levels of human dental pulp stem cells: an accurate combinatorial index for quality control in tissue engineering. *Cytotherapy*. 2013;15:507-18.

Martin-Piedra MA, Garzon I, Sánchez-Quevedo MdC, Alaminos M. Evaluation of cell viability and apoptotic patterns in stem cells isolated from human dental pulp. *Actualidad Médica*. 2012;97:6-12.

Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998;24:621-30.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(10):5807-12.

Mohr LR, Trounson AO. The use of fluorescein diacetate to assess embryo viability in the mouse. *J Reprod Fertil*. 1980;58:189-96.

Mokry J, Soukup T, Micuda S, Karbanova J, Visek B, Brcakova E, et al. Telomere attrition occurs during ex vivo expansion of human dental pulp stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:673513.

Montalvo A. Evaluación genética y microanalítica de las células madre de la gelatina de Wharton para su utilización en Ingeniería Tisular. Granada: Universidad de Granada; 2008.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.

Murray PE, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. *Arch Oral Biol*. 2002a;47:709-15.

Murray PE, Stanley HR, Matthews JB, Sloan AJ, Smith AJ. Age-related odontometric changes of human teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002b;93:474-82.

Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*. 2003;21(9):1025-32.

Papadopoulos NG, Dedoussis GV, Spanakos G, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1994;177:101-11.

Park C, Moon D-o, Ryu C-h, Choi Bt, Lee Wh, Kim G-y, et al. Beta-sitosterol sensitizes MDA-MB-231 cells to TRAIL-induced apoptosis. *Acta Pharmacol Sin*. 2008;29:341-8.

Park SH, Hsiao GY, Huang GT. Role of substance P and calcitonin gene-related peptide in the regulation of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression in human dental pulp. *Int Endod J*. 2004;37(3):185-92.

Patau K, Swift H. The DNA-content (Feulgen) of nuclei during mitosis in a root tip of onion. *Chromosoma*. 1953;6:149-69.

Peng G, McNary SM, Athanasiou KA, Reddi AH. Surface Zone Articular Chondrocytes Modulate the Bulk and Surface Mechanical Properties of the Tissue-Engineered Cartilage. *Tissue Eng Part A*. 2014.

Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, 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;14(2):149-56.

Phillips HJ. In dye exclusion tests for cell viability. 2nd ed. New York: Academic Press; 1973.

Phillips HJ, Terryberry JE. Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp Cell Res*. 1957;13:341-7.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.

Posadas I, Vellecco V, Santos P, Prieto-Lloret J, Ceña V. Acetaminophen potentiates staurosporine-induced death in a human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol*. 2007;150:577-85.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 2008;34:421-6.

Puleo DA, Holleran LA, Doremus RH, Bizios R. Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro. *J Biomed Mater Res*. 1991;25:711-23.

Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev*. 2004;13(5):452-5.

Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol*. 1998;16(3):247-52.

Rinaldi M, Tricarico M, Bonmassar E, Parrella P, Barrera G, Fazio VM. Effect of 4-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, on NK susceptibility of human K562 target cells. *Anticancer Res.* 18:3591-5.

Rizk A, Rabie ABM. Human dental pulp stem cells expressing transforming growth factor β 3 transgene for cartilage-like tissue engineering. *Cytotherapy.* 2013.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45:1013-6.

Rodriguez-Morata A, Garzon I, Alaminos M, Garcia-Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J, et al. Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Ann Vasc Surg.* 2008;22(3):440-8.

Roomans GM. Pharmacological treatment of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2001;10(1):1-19.

Roomans GM. Application of X-ray microanalysis to the study of cell physiology in cells attached to biomaterials. *Eur Cell Mater.* 2002a;3:1-8.

Roomans GM. X-ray microanalysis of epithelial cells in culture. *Methods Mol Biol.* 2002b;188:273-89.

Rotman B, Papermaster BW. Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1966;55:134-41.

Saber SE. Tissue engineering in endodontics. *J Oral Sci.* 2009;51:495-507.

Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2010;28:585-96.

Salido M, Vilches J, Roomans GM. Changes in elemental concentrations in LNCaP cells are associated with a protective effect of neuropeptides on etoposide-induced apoptosis. *Cell Biol Int.* 2004;28(5):397-402.

Sanchez-Quevedo MC, Alaminos M, Capitan LM, Moreu G, Garzon I, Crespo PV, et al. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. *Histol Histopathol.* 2007;22(6):631-40.

Sanchez-Quevedo MC, Crespo PV, Garcia JM, Campos A. X-ray microanalytical histochemistry of human circumpulpar and mantle dentine. *Bone Miner.* 1989;6:323-9.

Sarugaser R, Lickorish D, Baksh D, Hosseini MM, Davies JE. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 2005;23:220-9.

Sasi N, Hwang M, Jaboin J, Csiki I, Lu B. Regulated cell death pathways: new twists in modulation of BCL2 family function. *Mol Cancer Ther.* 2009;8:1421-9.

Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays.* 1996;18:427-31.

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995;270:467-70.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364(9429):149-55.

Seong JM, Kim B-C, Park J-H, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang Y-S. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010;5:062001.

Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, Ganjei P, Penalver M, Averette HE. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol.* 1988;31:191-204.

Sevin BU, Perras JP, Averette HE, Donato DM, Penalver M. Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer.* 1993;71:1613-20.

Shalon D, Smith SJ, Brown PO. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res.* 1996;6:639-45.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(3):191-9.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18:696-704.

Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 2001;29(6):532-9.

Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, et al. Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture. *J Cell Physiol.* 1998;174(2):194-205.

Sloff M, Simaioforidis V, de Vries R, Oosterwijk E, Feitz W. Tissue Engineering of the Bladder: Reality or Myth? A Systematic Review. *J Urol.* 2014.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.

Stoddart MJ. Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol.* 2011;740:1-6.

Suchánek J, Soukup T, Ivancaková R, Karbanová J, Hubková V, Pytlík R, et al. Human dental pulp stem cells--isolation and long term cultivation. *Acta medica (Hradec Králové).* 2007;50:195-201.

Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta.* 2011;32 Suppl 4:S311-5.

Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res.* 2008;87:676-81.

Takenouchi T, Munekata E. Trophic effects of substance P and beta-amyloid peptide on dibutyryl cyclic AMP-differentiated human leukemic (HL-60) cells. *Life Sci.* 1995;56:PL479-84.

Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2012;307:1169-77.

Tao S-C, Chen C-S, Zhu H. Applications of protein microarray technology. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2007;10:706-18.

Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol.* 2005;50(2):103-8.

Toh WS, Cao T. Derivation of Chondrogenic Cells from Human Embryonic Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Methods Mol Biol.* 2014.

Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008;26(3):591-9.

Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*. 2003;5:32-45.

Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*. 1987;56:279-85.

Van Landuyt KB, Jones EA, McGonagle D, Luyten FP, Lories RJ. Flow cytometric characterization of freshly isolated and culture expanded human synovial cell populations in patients with chronic arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(1):R15.

Wang X, Ge J, Wang K, Qian J, Zou Y. Evaluation of MTT assay for measurement of emodin-induced cytotoxicity. *Assay Drug Dev Technol*. 2006;4:203-7.

Warley A. Standards for the application of X-ray microanalysis to biological specimens. *J Microsc*. 1990;157(Pt 2):135-47.

Warley A. X-ray microanalysis for biologists. First ed. London: Portland Press; 1997.

Warley A, Fernandez-Segura E, Lopez-Escamez JA, Campos A. Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis. *Cell Biol Int*. 1994;18(9):915-6.

Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2008;26:2865-74.

Welsch U, Deller T. *Sobotta Lehrbuch Histologie*: Urban & Fischer bei Elsevier; 2010.

Wiltgen M, Tilz GP. DNA microarray analysis: principles and clinical impact. Hematology (Amsterdam, Netherlands). 2007;12:271-87.

Wong DC, Wong KT, Lee YY, Morin PN, Heng CK, Yap MG. Transcriptional profiling of apoptotic pathways in batch and fed-batch CHO cell cultures. Biotechnol Bioeng. 2006;94:373-82.

Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. Cryobiology. 2009;59:150-7.

Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, et al. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. J Cell Biochem. 2007;100:608-16.

Yang X, Zhang W, van den Dolder J, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, et al. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. J Tissue Eng Regen Med. 2007;1(2):128-35.

Yasuda M, Han JW, Dionne CA, Boyd JM, Chinnadurai G. BNIP3alpha: a human homolog of mitochondrial proapoptotic protein BNIP3. Cancer Res. 1999;59:533-7.

Yeung KT, Das S, Zhang J, Lomniczi A, Ojeda SR, Xu C-F, et al. A novel transcription complex that selectively modulates apoptosis of breast cancer cells through regulation of FASTKD2. Mol Cell Biol. 2011;31:2287-98.

Zhu C, Joyce NC. Proliferative response of corneal endothelial cells from young and older donors. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004;45:1743-51.

Zierold K, Hentschel H, Wehner F, Wessing A. Electron probe X-ray microanalysis of epithelial cells: aspects of cryofixation. Scanning Microsc Suppl. 1994;8:117-26; discussion 26-7.

