

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE MEDICINA Y
ODONTOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA



**OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LA
PULPA DENTAL. CARACTERIZACIÓN Y
ADAPTACIÓN A DIVERSAS CONDICIONES
DE OXÍGENO**

Presentada por:

Marya El Alami

Dirigida por:

Prof. D. José Viña Ribes

Prof. Dña. Consuelo Borrás Blasco

Prof. D. Juan Gambini Buchón



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

Prof., **D. José Viña Ribes**, Catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof., **Consuelo Borrás Blasco** Profesora titular de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Prof., **Juan Gambini Buchón** Profesor ayudante doctor de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que Doña **Marya El Alami**, Licenciada en Farmacia por la universidad de Sofía, Bulgaria, ha realizado bajo su dirección la presente tesis titulada:

**“OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE LA PULPA DENTAL.
CARTACTERIZACIÓN Y ADAPTACIÓN A DIVERSAS
CONDICIONES DE OXÍGENO”**

Para la obtención del título de Doctora. Y para que conste a los efectos oportunos, firman la presente certificación.

Valencia, a 25 de Enero de 2013

Fdo.D. José Viña Ribes Fdo.D. Consuelo Borrás Blasco Fdo.D. Juan Gambini Buchón

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación obtenida de los siguientes proyectos:

- Papel de los radicales libres en la biología de las células madre. Importancia en el desarrollo del envejecimiento”- PROMETEO/2010/074 - Generalitat Valenciana

- Utilización de células madre de origen dental para enriquecimiento del biomaterial fosfato tricálcico como matriz para regeneración ósea en cirugía previa a la colocación de implantes dentales - TRA2009_0109 - Ministerio de Ciencia e Innovación

الحمد لله

*A mis padres,
Krassimira Tsvetkova y Ahmed El Alami*

AGRADECIMIENTOS

Durante el período de realización de la presente tesis, ha habido muchas personas que me han ayudado dándome su apoyo, cariño, consejos y ánimo. Sin ellas no habría podido realizarlo. Es el momento de expresar lo agradecida que estoy a todas ellas. Este es uno de los momentos en que las palabras no son lo suficiente fuertes.

De todo corazón gracias a:

Dr. José Viña por haberme acogido en su familia investigadora, apoyándome y guiándome como un padre a dar mis primeros pasos en la investigación, enseñándome con sus consejos. Gracias por haber compartido conmigo sus conocimientos.

Dra. Consuelo Borrás y Dr. Juan Gambini gracias por vuestras constantes palabras de ánimo, por vuestros sabios consejos científicos y vuestra paciencia en enseñarme. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera del laboratorio, por vuestro cariño, ayuda y porque siempre habéis sido un gran apoyo para mí en todos los sentidos. Gracias por haberme hecho sentir una parte de vosotros!

Dr. Giovanni Mann and Dr. Richard Sion, I'm so thankful to you because I felt at home since the first day I arrived in the King's College lab, for all your kindness to me asking me if I'm ok, for all your unconditional help all the time. Thank you!

Dr. Federico Pallardó y Dra. Mari Carmen Gomez, les agradezco vuestras constantes palabras de ánimo y vuestras cálidas sonrisas de apoyo.

Debo darle las gracias a todo el grupo del laboratorio por haberos conocido, me siento muy afortunada de haber compartido con vosotros tantos inolvidables ratos dentro y fuera del laboratorio. Especialmente:

A Rebeca, por lo perfecta que eres (mi ídolo), por tu gran ayuda constante a sacar la tesis adelante, por tu paciencia y tu manera de ayudar sin condiciones, tu manera de darme ánimo siempre con fuerza y sonrisa, eres un verdadero sol, sigue siempre así!

A Khira, gracias por tu constante apoyo 24 horas y tu manera de ser que me encanta; Vicent, por tu constantes peleas conmigo; Mar, nuestra mami del lab, eres un encanto de madre, Marta: por tu persona, tu apoyo y ánimo, tu delicadeza de hacer las cosas y tu paciencia para enseñar (se te da bastante bien). Raúl, siempre ayudando con una gran sonrisa y dándome ánimo, gracias. Cristina, quédate siempre con esa sonrisa!

A Thomas, Helios, Esther, Bea, Rubén, Consuelo Escrivá, Ana Lloret, Tania, Mika, Gloria, Sandra, Vladi, Fabián, Marilyn.

A José V.A. Por su esfuerzos y colaboración en sacar las pulpas dentales.

A J.Luis, Garcia Verdugo, Daniel Monleón, Vanina, José Manuel, Santi, Sergio, Ana Díaz, Sonia, María Duran, Luis Such.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología

Al formidable grupo de King's College en Londres: Tabasum, Sarah, Salil, Bijal, Shain, Aicha, Tom, Daniel, Sarina. I'm so lucky to have met so sweet, funny and kind people like you. Thank you for your help, your kindness and making me feel a part of you.

A las secretarias: Mari (por tu gran ayuda y paciencia conmigo), y también Elena y Eva.

Моето семейство, макар че сте в последната страница но сте първи в моето сърце!

За моите родители Красимира Цветкова и Ahmed El Alami. Благодаря ви за вашата непрекъсната подкрепа и любов, без вас не бих стигнала до тук. Бяхте моя сила в най трудните моменти и една топла усмивка в най радостните мигове. Обичам ви!

Pour ma soeur Violeta, puis Hatim et Micheline, á mes soeurs Assia, Sofía. Mon frère Youness. J'ai une grande chance de vous avoir comme famille. Je vous remercie tous pour être toujours lá á mes côtés dans tout le sens du terme.

A mi pequeña familia aquí en España: Mostafa y Zhor, gracias por haberme apoyado desde que llegué en España, y por haberme hecho sentir en casa con vosotros!

Au reste de ma famille au Maroc, en Bulgarie et en Espagne. Merci á vous tous!

i. ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	21
1. Células madre.....	23
1.1 Definición.....	23
1.2 Clasificación.....	23
1.2.1 Tipos de células madre según su potencialidad	23
1.2.2 Tipos de células madre según su origen.....	24
1.2.2.1 Células madre embrionarias	24
1.2.2.2 Las células madre adultas	26
1.3 Células madres mesenquimales	26
1.3.1 Células madres mesenquimales de la pulpa dental	28
1.3.1.1 La pulpa dental	28
1.3.1.2 Poblaciones celulares de la pulpa dental	28
1.3.1.3 Actividades de la pulpa dental.....	32
1.3.1.4 Modificaciones de la pulpa con la edad.....	32
2. Caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dental	33
3. Obtención de las células madre de la pulpa dental	41
3.1 Métodos comunes de obtención de CMPDs	44
4. Condiciones de cultivos celulares.....	47
4.1 Efecto de las alteraciones en el oxígeno sobre la función de las células madre.....	48

4.1.1 Proliferación	48
4.1.2 Producción de ROS	48
4.1.3 Diferenciación osteogénica	49
4.1.4 Conservación de pluripotencialidad	49
4.1.5 Consumo de oxígeno	49
4.1.6 Integridad del cromosoma	49
4.1.7 Migración celular	50
4.1.8 Apoptosis.....	50
4.2 Renovación celular.....	51
4.3 Ciclo celular	51
4.3.1 Fases del ciclo celular	52
4.3.2 Apoptosis, necrosis y senescencia.....	54
4.3.3 Regulación del ciclo celular	55
4.3.3.1 Los inhibidores de las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKI).....	57
4.3.3.1.1 Familia de Kip/Cip CDK-inhibidores	58
4.3.3.1.2 La familia de inhibidores Ink4	59
4.3.3.2 La MAP-quinasa p38.....	62
5. Radicales libres	63
5.1 Concepto de radical libre	63
5.2 El oxígeno	65
5.3 Clases de Radicales libres	67

5.4 Génesis de ROS	71
5.4.1 Fuentes exógenas.....	71
5.4.2 Fuentes endógenas.....	72
5.4.2.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial	72
5.4.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss	72
5.4.2.3 Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico..	74
5.4.2.4 Fagocitos activados	74
5.4.2.5 Microsomos o peroxisomas	74
5.4.2.6 Autooxidación de pequeñas moléculas	74
5.4.2.7 Enzimas solubles y proteínas.....	75
5.4.2.8 Membrana plasmática.....	75
6. Estrés oxidativo.....	76
6.1 Concepto de estrés oxidativo	76
6.1.1 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas	77
6.1.1.1 Daño oxidativo a lípidos.....	77
6.1.1.2 Daño oxidativo a proteínas	78
6.1.1.3 Daño oxidativo al DNA.....	80
6.1.1.4 Daño oxidativo a glúcidos	81
6.1.1.5 Indicadores de estrés oxidativo.....	82
7. Defensas frente al estrés oxidativo	82
7.1 Antioxidantes	82

7.1.1	Antioxidantes enzimáticos	84
7.1.1.1	Superóxido dismutasa.....	84
7.1.1.2	Glutación peroxidasa.....	85
7.1.1.3	Catalasa.....	86
7.1.2	Antioxidantes no enzimáticos	86
7.1.2.1	El glutati3n	86
7.1.2.2	Vitamina E.....	87
7.1.2.3	Vitamina C.....	88
7.2	La vía de defensa celular del factor nuclear de transcripci3n Nrf2	89
7.2.1	Hemo oxigenasa 1 (HO-1)	91
7.2.2	NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1).....	92
II.	OBJETIVOS	95
1.	Objetivo general.....	97
2.	Objetivos específcos	97
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	99
1.	Materiales.....	101
1.1	Aparatos	101
1.2	Reactivos	104
2.	Métodos.....	105
2.1	Selecci3n de pacientes y obtenci3n de la muestra (pulpa dental).....	105

2.2 Cultivos celulares	107
2.2.1 Condiciones de cultivo	108
2.2.2 Métodos empleados para la optimización de la obtención de células madre de pulpas dentales al 3% O ₂	109
2.3 Caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dental mediante microscopía confocal	111
2.4 Proliferación de células madre de pulpa dental (CMPD) al 3% o 21% de O ₂	114
2.4.1 Curva de crecimiento	114
2.4.1.1 Contaje de células	114
2.4.1.2 Viabilidad celular	114
2.4.1.3 Elaboración de la curva de proliferación	117
2.5 Parámetros de estrés oxidativo	117
2.5.1 Determinación de MDA	117
2.6 Determinación de proteínas carboniladas por western blotting	122
2.6.1 Extracción de proteínas	123
2.6.2 Preparación de las muestras para medir proteínas oxidadas	124
2.7 Cuantificación de proteínas. Método Lowry	125
2.8 Western Blotting	126
2.9 Aspectos morfológicos mediante microscopía electrónica	129

2.9.1 Preparación de las muestras	130
2.9.2 Fijación.....	130
2.9.3 Inclusión en araldita	131
2.10 Análisis estadístico de los resultados	131
IV. RESULTADOS.....	139
1. Obtención de las células madre de la pulpa dental al 3% O ₂ y optimización del método de obtención.....	141
2. Caracterización de las células madre de la pulpa dental.....	148
3. Parámetros de estrés oxidativo.....	151
3.1 Daño a proteínas mediante la medición de las proteínas carboniladas.....	151
3.2 Daño a lípidos mediante la medición de malondialdehído (MDA).....	154
4. Proliferación de las células madre de la pulpa dental al 3% O ₂ o al 21% O ₂	156
4.1 Adhesión de las CMPDs al 3% O ₂ o al 21% O ₂	156
4.2 Curva de proliferación de las CMPDs al 3% O ₂ o al 21% O ₂	157
5. Reguladores del ciclo celular	159
5.1 Expresión de pp38.....	159
5.2 Expresión de la proteína p21 ^{Waf1/Cip1} mediante Western blotting.	161
6. Defensas frente al estrés oxidativo	163

6.1	La vía del factor nuclear de transcripción Nfr2	163
6.1.1	Expresión de la proteína hemo oxigenasa-1 en CMPDs mediante Western Blotting.....	163
6.1.2	Expresión de la proteína NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) en CMPDs mediante Western Blotting.....	166
6.1.3	Ensayo de viabilidad MTT.....	168
7.	Aspectos morfológicos.....	169
7.1	Microscopía óptica.....	169
7.1.1	Células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O ₂	170
7.1.2	Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O ₂	171
7.1.3	Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O ₂ con trolox al 50µM.....	173
7.2	Microscopía electrónica.....	175
7.2.1	Células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O ₂	175
7.2.2	Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O ₂	175
V.	DISCUSIÓN	179
1.	Optimización de la obtención de las células madre de la pulpa dental al 3% O ₂	183
2.	Caracterización de las células madre de la pulpa dental.....	189
3.	Parámetros de estrés oxidativo en células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O ₂ o al 21%O ₂	191

4. Proliferación de las células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O ₂ o al 21% O ₂	194
5. Reguladores del ciclo celular	197
6. Defensa frente al estrés oxidativo a través de la vía Nrf2.....	200
7. Aspectos morfológicos.....	205
VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION	209
1. Optimization of the dental pulp stem cells obtention at 3% O ₂	212
2. Characterization of the dental pulp stem cells (DPSCs).....	219
3. Parameters of oxidative stress in dental pulp stem cells cultured at 3% O ₂ or 21% O ₂	223
3.1 Damage to proteins by measuring the protein carbonylation .	224
3.2 Lipid peroxidation determined by measuring malondialdehyde (MDA).....	226
4. Proliferation of dental pulp stem cells cultured under 3% O ₂ or 21% O ₂	228
4.1 Adhesion of DPSCs under 3% O ₂ or 21% O ₂	231
4.2 Growth curve of DPSCs under 3% O ₂ or 21% O ₂	231
5. Cell cycle regulation in DPSCs.....	233
5.1 Protein expression of pp38.....	234
5.2 Protein expression of the protein p21 ^{Waf1/Cip1}	236
6. Defenses against oxidative stress.....	238

7. Morphological aspects of DPSCs under different oxygen tensions.....	243
VII. CONCLUSIONES	247
VII. CONCLUSIONS.....	251
VIII.BIBLIOGRAFÍA	255
IX. ABREVIATURAS.....	281
X. NOMENCLATURA	289
XI. UNIDADES Y MAGNITUDES FÍSICAS.....	293

ii. ÍNDICE DE TABLAS

I. INTRODUCCIÓN

Tabla I.1 Estudios más relevantes sobre la caracterización de las células madre traducida a partir de (Mafi, Hindocha et al. 2011). 41

Tabla I.2 Métodos de digestión de la pulpa dental para la obtención de CMPDs. 45

Tabla I.3 Complejo ciclina-CDK que participa en la regulación del ciclo celular humano (Ross 2007). 57

Tabla I.4 Papel de las ciclinas, las quinasas dependiente de las ciclinas y sus inhibidores en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la supervivencia de las células. (Maddika, Ande et al. 2007) 62

Tabla I.5 Vida media de radicales libres 64

Tabla I.6 Especies activadas del oxígeno y nitrógeno 66

Tabla I.7 Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas 79

Tabla I.8 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria 85

IV. RESULTADOS

Tabla IV.1 Resumen de los métodos empleados para la optimización de la obtención de las CMPD. 146

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Table VI.1 Summary of the used methods for the optimization of DPSC isolation 217

IX. ABREVIATURAS

Tabla IX.1 Abreviaturas empleadas en la tesis 287

X. NOMENCLATURA

Tabla X.1 Tabla de la nomenclatura empleada en la tesis 292

XI. UNIDADES Y MAGNITUDES FÍSICAS

Tabla XI.1 Magnitudes físicas empleadas en la tesis 295

Tabla XI.2 Unidades físicas empleadas en la tesis 296

iii. ÍNDICE DE FIGURAS

I. INTRODUCCIÓN

Figura I.1 Tipos de células madre según su origen (Lutolf, Gilbert et al. 2009).....	25
Figura I.2 Poblaciones celulares de la pulpa dental (Ferraris 2009).....	31
Figura I.3 Mecanismo de peroxidación lipídica	78
Figura I.4 Estructura de la vitamina E	88

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura III.1 Extracción de la pulpa dental	107
Figura III.2 Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehido (MDA).....	122
Figura III.3 Mecanismo de acción del reactivo ECL	128

IV. RESULTADOS

Figura IV.1 Fotos de cultivos primarios de células madre de la pulpa dental (CMPDs) (40x) obtenidas con cada método empleado.....	145
Figura IV.2 Caracterización de las células madre de pulpa dental mediante la microscopía confocal.....	149
Figura IV.3 Proteínas carboniladas de CMPDs cultivadas al 3% O ₂ , 21% O ₂ o al 21% O ₂ +Trolox al 50 µM a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. ..	153
Figura IV.4 Peroxidación lipídica de CMPDs cultivadas al 3% O ₂ , 21% O ₂ o 21% O ₂ +Trolox al 50 µM a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo.....	155
Figura IV.5 Adhesión de las células madre de la pulpa dental al 3% O ₂ o al 21% O ₂	157
Figura IV.6 Curva de proliferación de las células madre de la pulpa dental (CMPDs) al 3% O ₂ , al 21% O ₂ o al 21% O ₂ +Trolox al 50 µM.....	158
Figura IV.7 Fosforilación de la proteína p38 en la curva de crecimiento de las células madre de la pulpa dental al 3% O ₂ , al 21% O ₂ o al 21% O ₂ +Trolox al 50 µM a los 3, 5 y 7 días de cultivo.	160

Figura IV.8 Expresión de p21 ^{Waf1/Cip1} en la curva de crecimiento de las CMPDs al 3% O ₂ , al 21% O ₂ o al 21% O ₂ +Trolox al 50 μM a 1,3, 5 y 7 días de cultivo.....	162
Figura IV.9 Expresión de HO-1 en las CMPDs al 5% O ₂ y al 21% O ₂ después del tratamiento con DEM 50μM o 100 μM durante 8h y 24h de cultivo.....	165
Figura IV.10 Expresión de la proteína NQO-1 por western blotting en las CMPDs al 5% O ₂ o al 21% O ₂ después del tratamiento con DEM 50μM o 100 μM a las 8h y 24h de cultivo.	167
Figura IV.11 Ensayo de viabilidad MTT en CMPD al 21% O ₂ tratadas con DEM al 50μM o 100μM durante 24 horas de cultivo.	169
Figura IV.12 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 3% O ₂	171
Figura IV.13 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 21% O ₂	173
Figura IV.14 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 21% O ₂ con trolox al 50μM.....	174
Figura IV.15 Microscopía electrónica de las CMPDs al 3% O ₂	175
Figura IV.16 Microscopía electrónica de las CMPDs al 21% O ₂	176

V. DISCUSIÓN

Figura V.1 La ruta propuesta en las CMPDs en respuesta al estrés oxidativo inducido por el oxígeno ambiental.....	205
--	-----

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

Figure VI.1 Characterization of the dental pulp stem cells by confocal microscopy.	222
Figure VI.2 Protein carbonylation in DPSCs cultured at 3% O ₂ , 21% O ₂ or 21% O ₂ +Trolox (50 μM) at 1, 3, 5 y 7 days of culturing.	226

Figure VI.3 Lipid oxidation in DPSCs cultured at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50 μM) at 1, 3, 5 y 7 days of culturing. 227

Figure VI.4 Growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50μM). 232

Figure VI.5 Phosphorylation of p38 in the growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50μM) at 3, 5 and 7 days after seeding..... 235

Figure VI.6 Protein expression of p21^{Waf1/Cip1} in the growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50μM) at 1, 3, 5 and 7 days after seeding. 237

Figure VI.7 Protein expression of HO-1 in DEM (50-100μM) treated DPSCs at 5% O₂ or 21% O₂ after 8 and 24 h of treatments. 241

Figure VI.8 Protein expression of NQO-1 in DEM (50-100μM) treated DPSCs at 5% O₂ or 21% O₂ after 8 and 24 h of treatments. 241

Figure VI.9 The proposed pathway of DPSC in response to oxidative stress 243

I. INTRODUCCIÓN

1. Células madre

1.1 Definición

Las células madre o células troncales son aquellas células indiferenciadas con capacidad de proliferación y que se pueden diferenciar en distintos tipos celulares. Su descubrimiento y caracterización han revolucionado la comunidad científica gracias a tres aspectos que las hacen únicas en la medicina regenerativa: su estado de indiferenciación, su capacidad para proliferar indefinidamente y por último, su plasticidad y capacidad de dar origen a otros tipos celulares (Nombela 2010).

1.2 Clasificación

Las células madre se pueden diferenciar según su potencialidad y según su origen (Jaenisch and Young 2008) (ver Figura I.1).

1.2.1 Tipos de células madre según su potencialidad

Podemos clasificar las células madre en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

- Las células madre totipotentes son capaces de formar todo un organismo. En los mamíferos solamente lo son el cigoto y los primeros blastómeros.

- Las células madre pluripotentes son capaces de formar células de todos los linajes del cuerpo, son las denominadas células madre embrionarias.
- Las células madre multipotentes son las células madre adultas capaces de formar distintos tipos de células de un mismo linaje, como las células hematopoyéticas.
- Las células madre unipotentes son células madre adultas que producen células de solo un linaje, como las células madre germinales, entre ellas las espermatogonias que generan el esperma.

1.2.2 Tipos de células madre según su origen

Según su origen las células madre se pueden clasificar en células madre embrionarias y células madre de tejidos adultos.

1.2.2.1 Células madre embrionarias

La fuente de las células madre embrionarias son los embriones.

Éstos se pueden obtener a partir de los sobrantes de fecundación *in vitro* o por generación por transferencia nuclear somática.

Las células madre embrionarias derivan del blastocito (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998). A partir de este último pequeño cúmulo de células se desarrolla el embrión. De las células de la pared del blastocito se desarrolla el trofoblasto (ver figura I.1).

De las células embrionarias tempranas se forman por ejemplo las células madre hematopoyéticas y las células madre neuronales. Estas

células son pluripotentes, ya que pueden dar lugar a todos los linajes celulares del cuerpo: endodermo, mesodermo y ectodermo (Smith 2006).

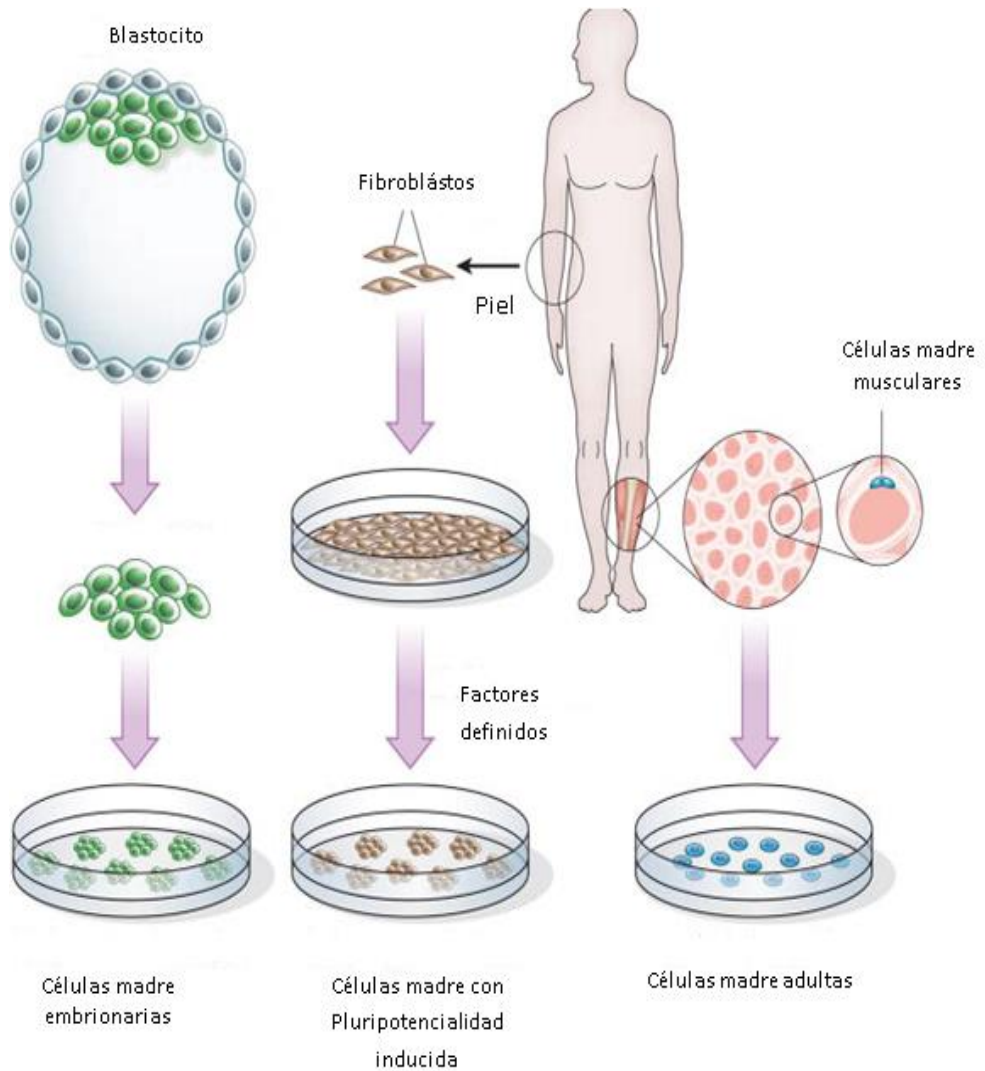


Figura I.1 Tipos de células madre según su origen (Lutolf, Gilbert et al. 2009)

1.2.2.2 Las células madre adultas

Las células madre adultas se pueden obtener de diferentes tejidos adultos como el cordón umbilical, la placenta, etc. Estas células pueden sustituir a uno o dos tipos celulares que caracterizan la histología del tejido en el cual se encuentran por lo que se les da la característica de multipotentes.

Dentro de las células madre adultas encontramos las células madre mesenquimales (CMMs).

1.3 Células madres mesenquimales

Las células madre mesenquimales son aquellas células capaces de dar lugar a células de origen mesodérmico (Friedenstein, Ivanov-Smolenski et al. 1978): dentina, hueso, ligamento periodontal, etc.

Friedenstein et al. 1970, fueron los primeros a aislar con éxito CMMs y fueron llamadas células fibroblásticas formadoras de colonias. Por su parte, hay estudios que demostraron que las CMMs tienen propiedades osteogénicas, condrogénicas y adipogénicas (Caplan 1991); (Pittenger, Mackay et al. 1999).

Actualmente se sabe que el mayor reservorio de CMMs se encuentra en el estroma de la médula ósea. Estas células se identifican por su capacidad de formar colonias, morfológicamente parecidas a fibroblastos cuando se cultivan en presencia de factores de crecimiento mitogénicos o suero (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970).

Las células madre mesenquimales se pueden aislar también de la pulpa dental, ligamento periodontal (Gronthos, Mankani et al. 2000), dientes deciduos (Miura, Gronthos et al. 2003), periostio (Nakahara, Goldberg et al. 1991), membrana sinovial (De Bari, Dell'Accio et al. 2001), músculo (Bosch, Musgrave et al. 2000), grasa (Zuk, Zhu et al. 2002), dermis (Young, Steele et al. 2001) y hueso trabecular (Tuli, Tuli et al. 2003).

Las CMMs son capaces de dar lugar a células de origen mesodérmico como condrocitos, osteoblastos, adipocitos (Pittenger, Mackay et al. 1999), mioblastos (Wakitani, Saito et al. 1995), células de tendón (Altman, Horan et al. 2002), odontoblastos (Gronthos, Mankani et al. 2000), (Miura, Gronthos et al. 2003) y cementoblastos (Kemoun, Laurencin-Dalicieux et al. 2007).

Las células madre adultas se pueden transdiferenciar, es decir, se les puede inducir pluripotencialidad (Song and Tuan 2004). De esta manera, las CMMs pueden dar lugar a células con propiedades biológicas y morfológicas de células ectodérmicas derivadas del tejido neuronal (Azizi, Stokes et al. 1998) (Kopen, Prockop et al. 1999) o células ameloblásticas (Hu, Unda et al. 2006).

Las CMMs se pueden caracterizar mediante marcadores moleculares de superficie como SH2 (CD105), SH3, SH4 (Haynesworth, Baber et al. 1992), CD44 (Conget and Minguell 1999) y Stro-1 (Gronthos and Simmons 1995), aunque ninguno de estos marcadores es específico para CMMs, ya que también han sido detectados en células mesenquimales diferenciadas, endoteliales y epiteliales. Hasta hoy no se

ha identificado un único marcador que caracterice definitivamente este tipo de células (Shanti, Li et al. 2007).

1.3.1 Células madres mesenquimales de la pulpa dental

1.3.1.1 La pulpa dental

Los dientes tienen su origen de las tres capas primitivas blastodérmicas, el ectodermo y el mesodermo (Lumsden 1988). En los primeros estadios de la odontogénesis se produce una interacción entre las células epiteliales del ectodermo y las células mesenquimales (Lumsden 1988); (Ruch 1985); (Thesleff and Sharpe 1997). La porción ectodérmica dará lugar al esmalte, mientras que las células mesenquimales darán lugar a los tejidos mesodérmicos: dentina, pulpa y cemento (Barbero 2000).

La pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo compuesto por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica que contiene células, fibras colágenas y reticulares, sustancia fundamental, vasos sanguíneos y nervios, y se encuentra totalmente rodeada por dentina mineralizada (Ferraris 2009).

1.3.1.2 Poblaciones celulares de la pulpa dental

➤ **Células ectomesenquimáticas o células madre de la pulpa dental (CMPDs)**

Estas células son denominadas también mesenquimáticas indiferenciadas, pero es importante señalar que derivan del ectodermo de las crestas neuronales. Constituyen la población de reserva pulpar por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos productores de

dentina o en fibroblastos productores de matriz pulpar, según el estímulo que actúe sobre ellas. Un poderoso estimulante de la proliferación y diferenciación de las células de la pulpa es el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF) (Ferraris 2009).

El número de células mesenquimales disminuye con la edad, lo cual trae aparejado una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa (Ferraris 2009).

Las CMPDs se pueden diferenciar además a odontoblastos (Gronthos, Mankani et al. 2000); (Zhang, Walboomers et al. 2006), también a adipocitos (Zhang, Walboomers et al. 2006); (Gronthos, Brahim et al. 2002), neuronas (Zhang, Walboomers et al. 2006); (Gronthos, Brahim et al. 2002), hueso (Laino, Graziano et al. 2006); (Zhang, Walboomers et al. 2006), músculo (Laino, Graziano et al. 2006); (Papaccio, Graziano et al. 2006); (Zhang, Walboomers et al. 2006) o condrocitos (Zhang, Walboomers et al. 2006).

➤ **Odontoblastos**

Son las células específicas del tejido pulpar, situadas en su periferia y adyacente a la predentina. Los odontoblastos pertenecen tanto a la pulpa como a la dentina, porque su cuerpo se localiza en la periferia pulpar y sus prolongaciones se alojan en los túbulos de la dentina.

El odontoblasto maduro es una célula altamente diferenciada que ha perdido la capacidad de dividirse. Los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina lo hacen a expensas de las células madre de la pulpa dental, aunque algunos autores opinan que

podrían derivar de los fibroblastos pulpares, sin embargo este mecanismo es todavía desconocido (Ferraris 2009).

➤ **Fibroblastos**

Son las células principales y más abundantes del tejido conectivo pulpar, especialmente en la corona, donde se forma la capa denominada rica en células.

➤ **Otras células del tejido pulpar**

Al examinar los componentes de la pulpa normal humana, se pueden identificar otros tipos celulares como: los macrófagos, las células dendríticas, linfocitos, células plasmáticas y en ocasiones, eosinófilos y mastocitos (ver figura I.2).

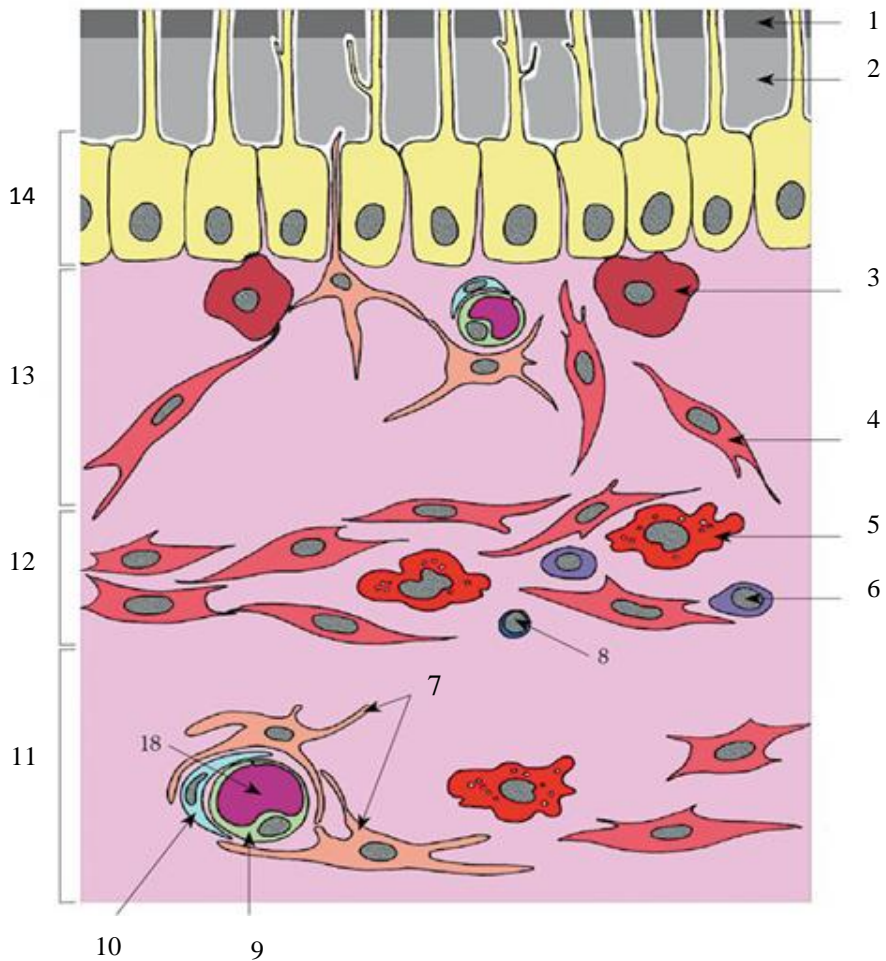


Figura I.2 Poblaciones celulares de la pulpa dental (Ferraris 2009) 1. Dentina 2. Pre-dentina 3. Célula subodontoblastica 4. Fibroblasto 5. Macrófago 6. Células mesenquimáticas 7. Célula dendrítica 8. Linfocito 9. Célula endotelial 10. Pericito 11. Zona central de la pulpa 12. Zona rica en células 13. Zona oligocelular o basal de Weil 14. Zona odontoblastica. 18. Capilar

1.3.1.3 Actividades de la pulpa dental

La pulpa dental desempeña diversas funciones. Se pueden destacar su función inductora para el depósito de dentina con el objetivo que se produzca la síntesis y el depósito del esmalte, su función nutritiva que es esencial para nutrir la dentina a través de las prolongaciones odontoblásticas, y para la difusión de los metabolitos desde el sistema vascular pulpar hasta el licor dentinario. También tiene una función sensitiva: el dolor dentinal es agudo y el pulpar es sordo y pulsátil, una función defensiva y reparadora, ya que la pulpa es un tejido que tiene una buena capacidad reparadora ante las agresiones.

Las 2 líneas de defensa de la pulpa dental son: la formación de dentina peritubular y formación de dentina terciaria. La pulpa dental tiene además, una capacidad formativa y es esencial para formar la dentina, la cual se mantiene durante su vitalidad.

1.3.1.4 Modificaciones de la pulpa con la edad

Al igual que en otros tejidos existen cambios en el tejido y la cavidad pulpar con la edad, estos originan una disminución en la capacidad de respuesta biológica.

Entre los cambios que tienen lugar en el envejecimiento se pueden destacar la reducción del volumen pulpar, la disminución de la irrigación e inervación y la disminución gradual de la población celular del tejido conectivo pulpar. Además con la edad ocurre una transformación del tejido conectivo laxo de la pulpa en tejido conectivo semidenso (aumento de colágeno y disminución de la sustancia

fundamental amorfa) y la aparición de centros irregulares de mineralización.

En la región de la pulpa central, un fenómeno común en la pulpa adulta y que se incrementa con la edad, son las calcificaciones y los cálculos pulpares o dentículos, formados por precipitaciones de sales minerales sobre el centro de la matriz colágena.

2. Caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dental

Para poder confirmar que las células madre aisladas son células madre de origen mesenquimal, los autores las caracterizan con una serie de marcadores positivos o negativos, pero no existe un marcador que caracterice exclusivamente las CMPDs. Entre otros marcadores, estas células son positivas para STRO1, CD34, CD133, OCT4, Nestina y negativas para CD45.

STRO-1

Es un marcador de células madre de estroma, que reconoce el antígeno de células perivasculares, y que en la médula ósea contiene precursores osteogénicos. Es un marcador putativo de células madre (Gronthos, Graves et al. 1994).

CD34

Es una glicoproteína de 105-120kD, transmembrana y de superficie que está expresada dentro del sistema hematopoyético humano y murino sobre células madre, células progenitoras (Andrews, Singer et al. 1986); (Baumheter, Singer et al. 1993), (Wood, May et al. 1997) y células madre embrionarias humanas (Vazao, das Neves et al. 2011). También está expresada en células vasculares endoteliales (Yang, Li et al. 2011).

CD133 (Prominin-1)

Es una glicoproteína de la superficie celular de células madre capaces de dar lugar a células madre de origen hematopoyético, endotelial y miogénico (Meregalli, Farini et al. 2010).

OCT4

El OCT4 (también conocido como OTF3, POU5F1) es un factor de transcripción expresado en células madre embrionarias murinas y humanas (Nichols, Zevnik et al. 1998); (Donovan 2001). La expresión de OCT4 es necesaria para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias y disminuye en todos los tipos de células somáticas diferenciadas tanto *in vitro* como *in vivo* (Pesce and Scholer 2001).

Nestina

Nestina es un marcador de células madres neuronales (Lendahl, Zimmerman et al. 1990), también de células madre odontoblásticas y

dientes germinales (Kenmotsu, Matsuzaka et al. 2010); (Terling, Rass et al. 1995); (About, Laurent-Maquin et al. 2000), células aisladas de la retina (Bhattacharya, Jackson et al. 2003) y células aisladas del epitelio lumbral (Umemoto, Yamato et al. 2006). Más recientemente, se ha demostrado en células madre de la pulpa dental (Honda, Hirose et al. 2007).

CD45

Es un marcador de células hematopoyéticas, principalmente precursores de leucocitos (Barclay, Jackson et al. 1988); (Pittenger, Mackay et al. 1999); (Zhang, Niu et al. 2003).

El grupo de Kerkis et al. 2006, cultivaron células madre de dientes deciduos positivas para marcadores de células madre embrionarias como OCT-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, implicando la pluripotencialidad de estas células (Kerkis, Kerkis et al. 2006).

Existen indicios de que una población heterogénea de CMPDs reside en la pulpa dental (Gronthos, Mankani et al. 2000); (Shi and Gronthos 2003). Recientemente, Waddington et al. 2009, aislaron diferentes CMPDs de ratas mediante distintos protocolos de cultivo (Waddington, Youde et al. 2009). Cultivaron células madre derivadas de cresta neuronal y positivas para STRO-1, CD31 (marcador de células madre adultas), LANGFR (marcador de células derivadas de cresta neural), CD105 y Notch-2 (marcadores de superficie de células endoteliales). Por otra parte, cultivaron células madre derivadas de

médula ósea, y solo positivas para STRO-1, CD31 y fibronectina (Waddington, Youde et al. 2009).

Las CMPDs diferenciadas a osteoblastos siguen siendo positivas para STRO-1 pero negativas para CD34 y CD117. También son positivas para alcalina fosfatasa, calceína, osteonectina, CD54, CD44 y RUNX-2 (Papaccio, Graziano et al. 2006).

En un estudio, se siguió la cinética de la expresión de los marcadores cinéticos durante la diferenciación de las células madre de la pulpa dental humana a osteoblastos y observaron una disminución progresiva de los marcadores de células madre a los 26-28 días (Laino, d'Aquino et al. 2005). En particular, las células pierden CD117 y después CD34. Además, observaron que a los 26-28 días, las células empezaron a diferenciarse y que a los 40 días, se volvieron completamente negativas para los marcadores de células madre (c-kit, STRO-1 y CD34). Por otra parte, fueron positivas para CD44 que detecta células madre mesenquimales adheridas (Goodison, Urquidi et al. 1999), positivas para osteocalcina, proteína específica producida por los osteoblastos detectada tanto a nivel de la membrana celular como dentro de la matriz (Harada and Rodan 2003) y positivas para RUNX-2 (factor de transcripción para la diferenciación a osteoblastos) (Komori, Yagi et al. 1997); (Harada and Rodan 2003). Además se demostró que las CMPDs también reconocen estos marcadores tras 2 años de criopreservación (Papaccio, Graziano et al. 2006). La tabla I.1 es un resumen de los marcadores de las células madre mesenquimales.

Estudio	Tipo de células	Características de la superficie celular
(Dominici, Le Blanc et al. 2006)	Células multipotentes mesenquimales de la estroma	Estas células expresan CD105, CD73 ,CD90, y no expresan las moléculas de superficie CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA-DR
(Gronthos, Zannettino et al. 2003)	Células madre humanas adultas de la médula ósea	Expresan la actividad telomerasa <i>in vivo</i>
(Ohgushi, Kotobuki et al. 2005)	Células madre mesenquimales	Negativas para marcadores hematopoyéticos (CD14, CD34,CD45) pero positivas para marcadores presentes en las células madre mesenquimales CD13, CD29, CD90
(Wongchuensoontorn, Liebehenschel et al. 2009)	Células madre mesenquimales	Negativas para CD34 and CD45 pero positivas para CD44, CD73 y CD105
(Gronthos, Franklin et al. 2001)	Células de la estroma derivadas del tejido adiposo humano	CD9, CD10, CD13, CD29, CD34, CD44, CD 49(d), CD 49(e), CD54, CD55, CD59, CD105, CD106, CD146, y CD166. Pero ningún antígeno para STRO-1 fue encontrado en células de las estroma derivadas del tejido adiposo humano.
(Tsai, Lee et al. 2004)	Células madre mesenquimales multipotentes	Positivas para SH2, SH3, SH4, CD29, CD44 y HLA-ABC (MHC tipo I), menor positiva para CD90 y CD105, pero negativa para CD10, CD11b, CD14, CD34, CD117, HLA-DR, DP, DQ (MHC clase II) y EMA

(Zvaifler, Marinova-Mutafchieva et al. 2000)	Células madre precursoras encontradas en la sangre	Una minoría de células adultas de la médula ósea expresan CD34 y CD44.
(Igura, Zhang et al. 2004)	Células mesenquimales progenitoras derivadas de la placenta (PDMPCs)	Las PDMPC expresan CD13, CD44, CD73, CD90, CD105 y HLA clase I como moléculas de superficie, pero no CD31, CD34, CD45 y HLA-DR.
(Zuk, Zhu et al. 2002)	Células madre mesenquimales	Las células expresan CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2, SH3 y STRO-1. No expresan of CD31, CD34 y CD45. Son positivas para CD13 pero negativas para CD14, CD16, CD56, CD61, CD62(e), CD104 y CD106. CD49(d) no fue observado en las MSC. Sin embargo las MSC expresan el antígeno CD106.
(Miura, Gronthos et al. 2003)	Células madre humanas de dientes deciduos (SHEDs)	SHED expresa las moléculas de superficie STRO-1 y CD146, que son marcadores de superficie de células madre adultas de estroma derivadas de la médula ósea.
(Parte, Bhartiya et al. 2011)	Marcador putativo de las células madre de la superficie epitelial de ovarios humanos en menopausia	Genes pluripotentes con transcripción para Oct-4, Oct-4A, Nanog, Sox-2, TERT, Stat-3 en humanos.
(Iwata, Yamato et al. 2010)	Células madre mesenquimales humanas de la médula ósea	CD29, CD44, CD90 y CD90

(Hasebe, Hasegawa et al. 2011)	Células madre derivadas del tejido dermal	Expresan CD44, CD54, CD90, CD105 y CD271 que son marcadores de células madre.
(Yu, Jang et al. 2010)	Células de estroma y células madre derivadas del tejido adiposo	CD29(+) CD34(+), CD44(lo) CD45(baja) CD73(+) CD90(+) CD105(+)
(Kadar, Porcsalmy et al. 2009)	Células madre mesenquimales	Positivas para STRO-1
(Kyurkchiev, Shterev et al. 2010)	Células multipotentes deciduals de estroma endometriales	Expresa moléculas de superficie CD73, CD90 y CD105
(Royer-Pokora, Busch et al. 2010)	Células madre mesenquimales	CD105, CD90 y CD73
(Mousavi Niri, Jaberipour et al. 2009)	Células madre mesenquimales	Expresión de CD105, CD166, CD44, ausente de CD45, CD34 y CD14 sobre la superficie de las células parecidas a células madre mesenquimales
(Orciani, Mariggio et al. 2010)	Células madre mesenquimales de biopsias de piel humana (S-MSCs)	La expresión de HLA-A, B, C, CD29, CD44, CD73 y CD90, fue altamente positiva, mientras la de CD105 fue baja. CD10, CD11b, CD14, CD34, CD49d y HLA-DR fueron negativos
(Buhring, Treml et al. 2009)	Células madre mesenquimales en la médula ósea	CD13, CD15, CD73, CD140b, CD144, CD146 y CD164

(Latif, Sarathchandra et al. 2007)	Células madre mesenquimales y de la calva humana cardiaca ICs (células intersticiales)	Expresan un antígeno de la superficie de fibroblastos, α -actina del musculo liso, vimentin y CD44. CD105 fue con baja expresión en las CMM.
(Gronthos, Graves et al. 1994)	Células progenitoras de la estroma derivadas de la médula ósea	Positivas para STRO-1
(Gronthos, Zannettino et al. 1999)	Células de estroma derivadas de la médula ósea	Positivas para STRO-1
(Stewart, Walsh et al. 1999)	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Positivas para STRO-1
(Simmons and Torok-Storb 1991; Simmons and Torok-Storb 1991) (Simmons, Gronthos et al. 1994)	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Positivas para STRO-1 y CD34 Positivas para CD106 y CD34
(Walsh, Jefferiss et al. 2000)	Células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea	Positivas para STRO-1
(Conget and Minguell 1999)	Células progenitoras mesenquimales derivadas de la médula ósea	Expresan las subunidades de la integrina $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, las integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$, ICAM-1 y CD44H. Estas fueron CD49d (-) y CD34 (-).

(Pittenger, Mackay et al. 1999)	Células madre mesenquimales adultas humanas derivadas de la médula ósea	CD49d (-), CD106 (+), CD34 (-)
---------------------------------	---	--------------------------------

Tabla I.1 Estudios más relevantes sobre la caracterización de las células madre traducida a partir de (Mafi, Hindocha et al. 2011).

3. Obtención de las células madre de la pulpa dental

La obtención de las células madre de la pulpa dental se consigue mediante la digestión enzimática del tejido pulpar. Las enzimas de disgregación son proteínas que rompen las uniones intercelulares o las estructuras del tejido conjuntivo que proporcionan soporte a los tejidos liberando de este modo las células. El tejido pulpar, se encuentra conformado por una población heterogénea de células: células del estroma, células vasculares, células endoteliales y perivasculares, células nerviosas, células mastoides, linfocitos T y macrófagos, todas dentro de una matriz extracelular rica en colágeno, fibronectina, laminina, etc. que son el sustrato principal de las MMPs, especialmente las collagenasas intersticiales (Goldberg and Lasfargues 1995); (Nakata, Yamasaki et al. 2000). Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs), participan en la degradación y el cambio de la matriz extracelular (MEC) de todos los tejidos del organismo incluyendo hueso, esmalte y dentina.

Las colagenasas intersticiales forman uno de los grupos más usados en la disgregación del tejido pulpar. Las colagenasas MMP-1, 8 y 13 inician la degradación del colágeno I, II y III, los cuales continúan su degradación por otras MMPs y enzimas proteolíticas no MMPs. Estas enzimas para ejercer su acción dependen de cofactores como el calcio y el zinc, degradan el colágeno en fragmentos, que por sí solos son fácilmente desnaturalizados y transformados en gelatina. Una vez formada la gelatina, la MMP-2 y MMP-9 o gelatinasas, la degradan en miles de fragmentos diminutos. Las colagenasas son proteasas específicas que desestructuran el colágeno, pero no afectan a las proteínas de las membranas plasmáticas, por lo tanto se pueden realizar largas incubaciones.

Además, en la bibliografía se usan otros tipos de metaloproteinasas como la dispasa II (Gronthos, Mankani et al. 2000); (Laino, d'Aquino et al. 2005); (Papaccio, Graziano et al. 2006); (Koyama, Okubo et al. 2009); (Waddington, Youde et al. 2009) y la termolisina (Perry, Zhou et al. 2008); (Woods, Perry et al. 2009). La dispasa es una metaloproteinasa neutral derivada del *Bacillus polymyxa* que requiere calcio para su actividad. Esta enzima corta la fibronectina y el colágeno IV que son componentes de la lámina densa y las fibrillas de anclaje de la membrana basal y degrada en menor extensión, el colágeno I. No corta el colágeno V o la laminina.

La termolisina es una metaloproteinasa extracelular, de peso molecular 34,6 kDa, aislada de la bacteria gram-positiva *Bacillus thermoproteolyticus* (Klopman and Bendale 1989). Contiene un ion de zinc esencial para la actividad catalítica y cuatro iones de calcio

necesario para la estabilidad térmica. En comparación con muchas proteínas que sufren cambios conformacionales frente al calor con su desnaturalización, la termolisina no sufre ningún cambio conformacional hasta al menos 70°C (Matthews, Weaver et al. 1974). Ésta enzima es específica para cortar enlaces peptídicos que contienen residuos hidrófobos de aminoácidos como L-leucina, L-isoleucina, valina y L-fenilalanina, además es especialmente útil para la hidrólisis parcial de polipéptidos que no contengan arginina o lisina. El mecanismo de acción para la termolisina fue propuesto por B. W. Matthew en 1988, en el que sugiere, a partir de una serie de estudios estructurales, que el ion zinc de la termolisina nativa forma un complejo de coordinación con tres ligandos proporcionados por la proteína (His 142, His 146 y Glu 166) y con un cuarto ligando proporcionado por una molécula de agua en la que el ion de zinc tiene dos funciones: polarizar el grupo carbonilo del sustrato y facilitar la desprotonización del agua nucleofílica (Matthews 1988).

Otro método usado para la disgregación del tejido pulpar así como para otros tejidos es el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a la concentración 0.02 %. Es un quelante de cationes divalentes en tampón fosfato salino o en tampón de Krebs sin calcio ni magnesio y se emplea también junto con la tripsina para aumentar la disgregación.

La tripsina, que es una serina-proteasa pancreática, corta los enlaces peptídicos de los amino ácidos básicos arginina y lisina, también ataca al complejo desmosómico entre las células. Es una proteasa inespecífica, con lo cual las incubaciones con la tripsina deben de tener

una duración limitada, ya que esta enzima es capaz de dañar a las proteínas presentes en las membranas celulares.

3.1 Métodos comunes de obtención de CMPDs

El primer tipo de células madre dentales fueron aisladas de la pulpa dental por el grupo Gronthos (Gronthos, Mankani et al. 2000). Fueron extraídas de terceros molares humanos y además de demostrar su capacidad clonogénica, fueron capaces de diferenciarlas hacia odontoblastos y de formar el complejo dentino-pulpar cuando fueron implantadas subcutáneamente en ratas inmunocomprometidas. Se observó que estas células presentaban un mayor porcentaje de proliferación que las células madre mesenquimales de la médula ósea (Langer and Vacanti 1993). El método usado fue la digestión de la pulpa dental, fragmentada previamente, con colagenasa tipo I a la concentración 3 mg/mL y dispasa 4mg/mL durante 60 minutos a 37°C. Muchos autores usaron este protocolo para aislar CMPDs (Takeda, Tezuka et al. 2008); (Liu, Li et al. 2005).

Otros métodos descritos en la literatura fueron usar colagenasa/dispasa ambos a 4 mg/mL durante 1 hora (Waddington, Youde et al. 2009), efectuar la digestión con colagenasa tipo I a 3 mg/mL (Zhang, Walboomers et al. 2008), o fragmentar la pulpa sin la aplicación de ningún tipo de digestión (Pierdomenico, Bonsi et al. 2005); (Karamzadeh, Eslaminejad et al. 2012). En otro estudio, cultivaron 40 pulpas realizando la digestión con colagenasa tipo I y tipo II en combinación con la termolisina durante 40 minutos a 37° C (Perry, Zhou et al. 2008). Observaron crecimiento en 31 casos, contaminación con hongos en 7 casos y no observaron crecimiento en 2 casos. La tabla I.2 es

un resumen de los métodos de digestión de la pulpa dental más usados para la obtención de las CMPDs.

Autor	Método de obtención de CMPD			CO ₂ /O ₂ condiciones	Origen
(Gronthos, Mankani et al. 2000) (Laino, d'Aquino et al. 2005) (Papaccio, Graziano et al. 2006) (Koyama, Okubo et al. 2009)	Colagenasa tipo I Dispasa	3mg/mL 4mg/mL	60min	5%CO ₂ 21% O ₂	Humanos
(Waddington, Youde et al. 2009)	Colagenasa Dispasa	4mg/mL 4mg/mL	60 min	-	Ratas
(Zhang, Walboomers et al. 2008)	Colagenasa I	3mg/mL	-	-	Humanos
(Perry, Zhou et al. 2008)	Colagenasa I y II termolisina	-	40 min	-	Humanos
(Woods, Perry et al. 2009)	Colagenasa I y II termolisina	-	15-30 min	5%CO ₂ 21% O ₂	Humanos

Tabla I.2 Métodos de digestión de la pulpa dental para la obtención de CMPDs

Se han aislado células madre de la pulpa dental de ratones (Mina and Braut 2004) y de ratas (Zhang, Walboomers et al. 2005) o de perros (Jafarian, Eslaminejad et al. 2008). Además de las CMPDs, se han

aisladas células madre de otros tejidos dentales humanos como el ligamento periodontal (Gronthos, Mankani et al. 2000) o los dientes deciduos (Miura, Gronthos et al. 2003). Estas células madre de dientes deciduos son capaces de formar dentina *in vivo* al ser implantadas subcutáneamente en ratas (Cordeiro, Dong et al. 2008).

Recientemente, se ha demostrado la presencia de CMMs en la papila apical, tejido derivado del ectomesénquima, que inducido por la lámina dental (D'Souza 2002); (Bhasker 1991) tiene como función el desarrollo de las raíces durante la odontogénesis.

Además de derivar a odontoblastos (Gronthos, Mankani et al. 2000); (Marei, Nouh et al. 2005), las células madre de pulpa dental se han podido diferenciar hacia adipocitos y neuronas (Marei, Nouh et al. 2005); (Abukawa, Shin et al. 2004), hueso (Bosch, Musgrave et al. 2000); (Marei, Nouh et al. 2005), músculo (Bosch, Musgrave et al. 2000); (Zuk, Zhu et al. 2002); (Marei, Nouh et al. 2005) y condrocitos (Marei, Nouh et al. 2005).

Actualmente, las CMMs están usadas en los ensayos clínicos como suspensiones de células (Giordano, Galderisi et al. 2007). Para tales usos clínicos, se requiere un número grande de células que todavía pueden limitar la preparación de implantación en los usos clínicos. Otra propiedad importante es la capacidad de las CMMs de sobrevivir después de la implantación con un suministro nutritivo limitado debido a una falta de vascularización.

4. Condiciones de cultivos celulares

La mayoría de los cultivos celulares convencionales *in vitro* están realizados bajo concentración de oxígeno ambiental (20-21% O₂ / 160 mm Hg), también es definido como "normoxia". Al contrario, *in vivo* las CMMs no están expuestas a tan alta concentración de oxígeno. Las CMMs se desarrollan en entornos con baja tensión de oxígeno que varía entre el 1 % al 7 % O₂ en la médula ósea (Chow, Wenning et al. 2001); (Harrison, Rameshwar et al. 2002) y entre el 10 % al 15 % de O₂ en el tejido adiposo (Bizzarri, Koehler et al. 2006) y en la sangre entre 10% al 12% O₂ (Steurer, Hoffmann et al. 1997).

Los valores comunes de entre 3 % O₂ y 6 % O₂ (20-40 mm Hg) en la mayoría de los tejidos es generalmente aceptado (Hall E. J. 2005), aunque la concentración real de oxígeno *in situ* depende mucho de la vascularización del tejido y su actividad metabólica (Ward 2008).

Esto sugiere que *in vitro* se debe trabajar en condiciones de bajo oxígeno para un tratamiento de estas células en condiciones similares a las de su entorno natural fisiológico. Así, existen trabajos que muestran que altas concentraciones de oxígeno pueden causar estrés oxidativo vía la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)- que pueden dañar lípidos, proteínas y DNA, cambiando el metabolismo de la célula (Wiseman and Halliwell 1996). Por lo tanto, la hipoxia moderada puede bajar la generación intracelular de ROS así como su acumulación, lo que aumentaría la eficacia metabólica celular (Miller, Wilke et al. 1987).

En este contexto, es interesante destacar que precultivar las CMMs en condiciones de hipoxia antes del trasplante mejora el potencial regenerador de tejido (Rosova, Dao et al. 2008).

4.1 Efecto de las alteraciones en el oxígeno sobre la función de las células madre

4.1.1 Proliferación

En cuanto a la proliferación de las células madre en condiciones de normoxia (2-5% O₂) en comparación con hiperoxia (20% O₂), varios estudios demostraron la menor tasa de proliferación de estas células en la condición de oxígeno convencional (20% O₂). Se ha demostrado entre otras, en células madre neuronales (Rodrigues, Diogo et al. 2010), en células madre de la médula ósea (Dos Santos, Andrade et al. 2010); (Hung, Ho et al. 2012), en células madre del cordón umbilical (Lavrentieva, Majore et al. 2010) y células madre de la grasa tisular (Efimenko, Starostina et al. 2011); (Kim, Song et al. 2012).

4.1.2 Producción de ROS

En un estudio sobre las células de la sangre del cordón umbilical positivas para CD34, se demostró la alta tasa de formación del anión superóxido (O₂^{•-}) y de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en células cultivadas al 20% O₂ en comparación con aquellas cultivadas al 5% O₂ (Fan, Cai et al. 2008). Otro estudio demostró un incremento significativo en la formación de ROS en macrófagos cultivados al 20% O₂ con respecto al 5% O₂ (Pfau, Schneider et al. 2004). En mioblastos C2C12, también se observó un incremento significativo en la formación de ROS

en células cultivadas al 20% O₂ en comparación con aquellas cultivadas al 5% y al 6% O₂, respectivamente (Hansen, Klass et al. 2007).

4.1.3 Diferenciación osteogénica

La diferenciación osteogénica está más inducida cuando las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea está cultivadas al 1% O₂ en comparación con aquellas cultivada al 20% O₂ (Hung, Ho et al. 2012).

4.1.4 Conservación de pluripotencialidad

Hung et al. 2011 demostraron que la normoxia fisiológica en células madre mesenquimales de la médula ósea estimula importantes genes como Oct4, Nanog, Sall4 y Klf4 (Hung, Ho et al. 2012). Además, el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF 2 α regula la expresión del factor de transcripción Oct-4, esencial para el mantenimiento de la pluripotencialidad (Covello, Kehler et al. 2006); (Forristal, Wright et al. 2010) y también la expresión de Sox2 y Nanog que mantienen las características de las células e inhiben los genes promotores de la diferenciación (Boyer, Lee et al. 2005).

4.1.5 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno en células madre del cordón umbilical cultivadas al 21% O₂ se demostró que es casi 5 veces mayor que aquellas cultivadas al 2,5-5% O₂ (Lavrentieva, Majore et al. 2010).

4.1.6 Integridad del cromosoma

La integridad cromosomal está directamente relacionada con el estrés oxidativo (Csete 2005); (Woo and Poon 2004). Hay un estudio

que demostró que hay menos aberraciones espontáneas de cromosomas en células madre embrionarias humanas cultivadas al 2% O₂ en comparación con aquellas cultivadas al 20% O₂ (Forsyth, Musio et al. 2006). Además, fue observado que las mutaciones acumuladas en fibroblastos embrionarios de ratones (MEFs) son más frecuentes en aquellos cultivados al 20% O₂ en comparación con el 3% O₂ (Busuttil, Rubio et al. 2003).

4.1.7 Migración celular

En un estudio sobre las células madre de la médula ósea (Hung, Ho et al. 2012) y en otro en células madre del tejido adiposo (Kim, Song et al. 2012), se observó que la concentración del oxígeno influye sobre la motilidad fisiológica de las células, en las cuales la hipoxia fisiológica aumenta la habilidad de la migración celular y regula la expresión mesenquimal de genes como fibronectina y N-cadherina (moléculas de adhesión) y vimentina: marcador mesenquimático y una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células embrionarias (Fuchs and Weber 1994).

4.1.8 Apoptosis

Está demostrado que las células madre neuronales de ratas cultivadas en condiciones de bajo oxígeno sufren menos apoptosis que aquellas cultivadas en oxígeno ambiental (Studer, Csete et al. 2000).

4.2 Renovación celular

Las células somáticas del organismo adulto pueden clasificarse de acuerdo con su actividad mitótica en tres poblaciones celulares (Ross 2007):

- *Las poblaciones celulares postmitóticas*: son células que ya no se dividen (células postmitóticas). Las células de este tipo, son las células del sistema nervioso central y las células musculares esqueléticas o cardíacas.
- *Las poblaciones celulares estables*: son las células que se dividen de manera episódica y con lentitud para mantener la estructura normal de los tejidos y órganos. Estas células se pueden estimular por una agresión para tornarse más activas desde el punto de vista mitótico. Por ejemplo, las células del periostio y del pericondrio, las células musculares lisas, las células endoteliales de los vasos sanguíneos y los fibroblastos del tejido conjuntivo.
- *Las poblaciones celulares renovables*: son células de renovación lenta o rápida pero exhiben actividad mitótica regular. Tras la división se suelen producir dos hijas que se diferencian morfológicamente y funcionalmente o dos células que permanecen como células madre o precursoras.

4.3 Ciclo celular

El ciclo celular es un conjunto de procesos autoreguladores que controlan el crecimiento y la división de las células. Para las poblaciones celulares renovables y las poblaciones celulares proliferantes, incluyendo las células embrionarias y las células de cultivos primarios, el objetivo

del ciclo celular es producir dos células hijas, cada una con cromosomas idénticos a los de la célula de origen.

4.3.1 Fases del ciclo celular

El ciclo celular tiene dos fases principales: la fase S (interfase) y la fase M (mitosis), caracterizada por la división del genoma. Otras tres fases subdividen adicionalmente la interfase: la fase G₁ (gap₁), la fase S (de síntesis del DNA) y la fase G₂ (gap₂). Así, la interfase está constituida por la sucesión de las fases G₁, S y G₂ y normalmente comprende el 90 % o más del tiempo total del ciclo celular.

Las células humanas de renovación rápida cumplen un ciclo celular completo en 24 horas. Durante el ciclo varios mecanismos internos (puntos de control), controlan la transición entre las etapas del ciclo celular. Éste se detiene en varios puntos de control y solo puede continuar si se cumplen determinadas condiciones.

- Fase G₁: Suele ser la más larga y la más variable del ciclo celular y comienza al final de la fase M. Durante esta fase, la célula capta sustancias nutritivas y sintetiza el RNA y las proteínas necesarias para la síntesis del DNA y la duplicación de los cromosomas. Dos puntos de control verifican la progresión de la célula a través de esta fase:
 - 1) *El punto de restricción*: es el punto primordial del ciclo celular, es sensible al volumen celular, al estado de los procesos fisiológicos de la célula y a sus interacciones con la matriz extracelular. La célula en este punto de control autoevalúa su propia capacidad replicativa para entrar en la fase S seguida por la división o

abandonar el ciclo celular. Una célula que abandona el ciclo en G_1 para comenzar la diferenciación entra en la fase G_0 , llamada así por estar fuera del ciclo. Este punto de control está estimulado por interacciones de la proteína de susceptibilidad, la retinoblastoma (pRb), y una familia de factores de transcripción esenciales (E2F) con sus promotores diana. En las células normales la interacción adecuada entre pRb y E2F impide la progresión del ciclo celular.

- 2) *El punto de control del daño al DNA en G_1 .* Este punto comprueba la integridad del DNA recién duplicado. Por ejemplo, si el DNA tiene un daño irreparable, este punto de control detecta el nivel elevado de la proteína supresora de tumores p53 y no permite la entrada de la célula en la fase S. Por lo tanto la fase G_1 , puede durar unas horas (9-12h) en una célula de división rápida o puede durar toda una vida en una célula que no se divide.
- Fase S: El inicio de la síntesis del DNA marca el inicio de la fase S, que suele durar entre 7,5 y 10 horas. Durante la fase S, se duplica el DNA de la célula y se forman nuevas cromátides. El punto de control del daño del DNA en la fase S controla la calidad del DNA en proceso de duplicación.
 - Fase G_2 : Durante esta fase, la célula comprueba su DNA duplicado en preparación para la mitosis. Este es un período de crecimiento de la célula y reorganización de los orgánulos citoplasmáticos antes de entrar en el ciclo mitótico. La fase G_2 puede ser una hora en las células con rápida división o de una duración casi indefinida en algunas células poliploides o en

células detenidas en G₂ por períodos prolongados, por ejemplo, los oocitos primarios. La calidad del DNA en esta fase se examina por dos puntos de control: el punto de control del daño al DNA en G₂ y el punto de control del DNA no duplicado. Este último impide la progresión celular hacia la fase M antes de que se complete la síntesis del DNA.

- Fase M: es un proceso en el que la célula progenitora se divide y produce dos células hija con la misma cantidad de cromosomas y contenido de DNA, dura alrededor de una hora y ocurre en varias etapas: profase, metafase, anafase y telofase.

4.3.2 Apoptosis, necrosis y senescencia

La muerte celular puede ocurrir como resultado de una agresión celular aguda o de un programa de autodestrucción codificado internamente. Los dos mecanismos diferentes de muerte celular son (Ross 2007):

- Necrosis o muerte celular accidental. La necrosis es un proceso patológico que ocurre cuando las células se exponen a condiciones físicas o químicas desfavorables. Por ejemplo, la hipotermia, la hipoxia, la radiación, el pH bajo y los traumatismos que causan lesión celular aguda y daño de la membrana plasmática. El daño de la membrana plasmática se puede causar también por virus, sustancias como el complemento o las proteínas llamadas perforinas.
- Apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es un proceso fisiológico en el que las células que ya no se necesitan son eliminadas del organismo. Este proceso puede ocurrir a lo

largo del desarrollo embrionario normal o en otros procesos fisiológicos normales.

- **Senescencia.** Las células humanas normales pierden el potencial replicativo e inevitablemente se hacen senescente como consecuencia de pasos sucesivos en los cultivos de tejidos (Hayflick 1991); (Smith and Lincoln 1984); (Goldstein 1990); (Cristofalo and Pignolo 1993); (Campisi 1996); (Smith and Pereira-Smith 1996). La senescencia está determinada por el número de replicaciones de las células en el tiempo cronológico. En general, los fibroblastos humanos fetales se pueden replicar 50–55 veces. Las células senescentes no pueden replicarse y se vuelven voluminosas, un aumento de superficie de la célula y una morfología alterada (Smith and Lincoln 1984); (Goldstein 1990). Las células senescentes se diferencian de las quiescentes, por el hecho que no se pueden replicar cuando se estimulan con factores mitogénicos fisiológicos (Smith and Lincoln 1984); (Goldstein 1990), (Campisi 1996); (Smith and Pereira-Smith 1996).

4.3.3 Regulación del ciclo celular

El ciclo celular está mediado por proteínas que se sintetizan y se degradan en forma cíclica durante el ciclo. Otras proteínas verifican activamente la calidad de los diferentes puntos de control distribuidos a lo largo de todo el ciclo. Los complejos proteicos en los puntos de control pueden impulsar a la célula a que entre en el ciclo celular o a que salga de él, porque estimulan el crecimiento y la división cuando las condiciones son favorables o detienen la división celular y reducen su ritmo cuando las condiciones son desfavorables (Ross 2007).

El primer hito en la comprensión de la regulación del ciclo celular fue el descubrimiento de una proteína llamada factor promotor de la maduración (MPF) a principios de la década de 1970 (Drury and Schorderet-Slatkine 1975). El MPF parecía controlar el comienzo de la mitosis.

Cuando se inyectaba MPF en los núcleos de oocitos de rana inmaduros, que normalmente están detenidos en G₂, las células continuaban de inmediato con la división. Después se comprobó que el MPF estaba formado por dos proteínas:

- Cdk1 (antes llamada cdc2), un miembro de la familia de las proteínas Cdk (quinasas dependientes de ciclinas), de 32 kDa.
- Ciclina B, un miembro de la familia de las ciclinas, que son reguladores fundamentales del ciclo celular. Las ciclinas se sintetizan como proteínas constitutivas; sin embargo, sus concentraciones durante el ciclo están controladas por la degradación mediada por la ubiquitina.

En la actualidad, se sabe que el complejo ciclina-Cdk actúa en diferentes fases del ciclo celular y tiene como diana distintas proteínas para controlar las funciones dependientes del ciclo. En la tabla I.3 se muestra la combinación de los diferentes tipos de ciclinas con los distintos tipos de Cdk y la forma en que las interacciones de estas dos proteínas afectan la progresión de las células a través del ciclo celular. El paso a través del mismo requiere un aumento de la actividad del complejo ciclina-Cdk en algunas fases seguido por la declinación de esa actividad en otras fases.

Tipo de ciclina	Proteinquinasa dependiente de la ciclina asociada	Fase del ciclo celular en la que actúan
Ciclina D	CDK4/6	Progresión de la fase G1
Ciclina E	CDK2	Entrada en la fase S
Ciclina A	CDK2	Progresión de la fase S
Ciclina A	CDK1	Fase S a fase G2 en entrada en la fase M
Ciclina B	CDK1	Progresión de la fase M

Tabla I.3 Complejo ciclina-CDK que participa en la regulación del ciclo celular humano (Ross 2007)

El aumento de la actividad del complejo ciclina-Cdk se logra mediante la acción estimuladora de las ciclinas y está equilibrado por la acción inhibidora de proteínas como, las Cip (proteínas inhibidoras de las CDK), las Ink (inhibidoras de las quinasas) y las Kip (proteínas inhibidoras de quinasas) (Ross 2007) .

4.3.3.1 Los inhibidores de las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKI)

Las quinasas dependientes de las ciclinas ejercen su actividad reguladora del ciclo celular fosforilando una serie de sustratos. La actividad de estas quinasas puede ser limitada por inhibidores específicos de las quinasas dependientes de las ciclinas (CDKIs), que pueden ser de origen endógeno o exógeno.

Hay dos grupos fundamentales de CDKIs de origen endógeno. El primer grupo incluye las proteínas Ink4 (inhibidores de CDK4), que inhiben las CDK4 y CDK6 específicamente durante la G1 fase. Son cuatro proteínas: p16^{Ink 4a}, p15^{Ink 4b}, p18^{Ink 4c}, p19^{Ink 4d}. Estas proteínas previene la transición de la fase G1 a la fase S formando un complejo inactivo Ink4-CDK4/6-cyclin D o Ink4-CDK4/6 (Jeffrey, Tong et al. 2000).

4.3.3.1.1 Familia de Kip/Cip CDK-inhibidores

A diferencia de los inhibidores Ink4, el grupo Cip/Kip (*CDK interacting protein/kinase inhibitory protein*) incluye las proteínas inhibidoras, que inactivan múltiples complejos de ciclinas D, E,A/CDK durante todas las fases de la división en el ciclo celular. Esta familia contiene tres proteínas inhibidoras: p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2} (Sherr 2001).

- p21^{Waf1/Cip1} es un miembro de la familia de Kip/Cip, una amplia clase de especificidad de CDKIs. Este inhibidor fue identificado simultáneamente por dos grupos de investigación independientes, y fueron nombrados como Waf1 (*wild-type p53-activated fragment 1*) y Cip1 (*CDK-interacting protein 1*). Como el nombre indica, el p21^{Waf1/Cip1} está regulado por p53, un supresor de tumores, que conduce células defectuosas en apoptosis. El papel principal de p21^{Waf1/Cip1} en la regulación del ciclo celular resulta de su capacidad de inhibir la actividad del complejo ciclina A, E/CDK2 requerido para la transición G1/S y por lo tanto, la detención en la fase G1 (Costanzi-Strauss, Strauss et al. 1998); (Niculescu, Chen et al. 1998). El p21^{Waf1/Cip1} ha sido

descrito también como regulador de la transición G2/M (Niculescu, Chen et al. 1998). Más allá del ciclo celular, $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ puede funcionar como un regulador negativo de apoptosis dependiente de p53. Cuando el DNA está dañado en las células, $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ es responsable de la detención en la fase G1 dependiente de p53 (Deng, Zhang et al. 1995).

- El segundo miembro de la familia de Cip/Kip y de CDKIs, es $p27^{\text{Kip1}}$, que inhibe el complejo ciclina E/CDK2 y regula la transición G1/S. Esta inhibición ocurre en células detenidas por TGF- β o por inhibición por contacto. La degradación de $p27^{\text{Kip1}}$ mediada por interleukina-2 es requerida para la entrada en el ciclo celular (Nourse, Firpo et al. 1994).
- El $p57^{\text{Kip2}}$, otro miembro de la familia de Kip/Cip de CDKs inhibidores, juega un mayor papel en el desarrollo del embrión y su pérdida conlleva a desordenes (Yan, Frisen et al. 1997).

4.3.3.1.2 La familia de inhibidores Ink4

El grupo de CDKIs Ink4 está caracterizado con una estrecha especificidad al sustrato centrada en CDK4 y CDK6. Un miembro de este grupo, el $p16^{\text{Ink4a}}$ está codificado con el gen p16, un supresor de tumores que se opone a la actividad de las quinasas dependientes de la ciclina D. Su efecto inhibitor está basado en la habilidad de formar complejos con CDK4/6 para prevenir el enlace CDK4/6-ciclina D y la entrada en la fase G1, respectivamente. Además, la interrupción del complejo CDK4/6-cyclinD mediado por $p16^{\text{Ink4a}}$ cancela la señal mitogénica de transducción

Rb-E2F (retinoblastoma-factor de transcripción esencial) y las células sigue en la fase G1 (Sherr 2001).

La pérdida de p16^{Ink4a} es funcionalmente equivalente a la pérdida de Rb mientras la pérdida de ARF está relacionada con la pérdida de p53 (James and Peters 2000); (Sherr 2001). Ink4/ARF codifica además al inhibidor p16^{Ink4a}, a la otra proteína de la familia de ink4 inhibidores, p15^{Ink4b} y también a otra proteína llamada p19^{Arf}. Los tres productos del locus participan en respuestas claves de la anti-proliferación celular, precisamente, la senescencia y la apoptosis. Mientras las proteínas p16^{Ink4a} and p15^{Ink4b} inhiben la actividad del complejo Cdk4,6/ciclina D quinasas induciendo la detención de la proliferación mediada por Rb (retinoblastoma, proteína supresora de tumores); p19^{Arf} inhibe la ubiquitin ligasa Mdm2, y por lo tanto estabiliza a p53 (Gil and Peters 2006); (Kim and Sharpless 2006).

Los otros miembros de la familia de inhibidores Ink4, p18^{Ink4c} y p19^{Ink4d} están expresados durante el desarrollo fetal y parecen tener un papel clave en la diferenciación terminal (Zindy, Quelle et al. 1997; Phelps, Hsiao et al. 1998). La expresión de estos inhibidores aumenta durante la transición G1/S, imitando la detención en fase G1 causada farmacológicamente por inhibición de las CDKs (Hirai, Roussel et al. 1995). El inhibidor p18^{Ink4c} juega un papel fundamental en el control del crecimiento celular. La pérdida de la función de p18 resulta en el acortamiento de la fase G1. La tabla I.4 presenta el papel de las ciclinas, las quinasas dependiente de las ciclinas y sus inhibidores en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la supervivencia de las células.

Moléculas	Función en el ciclo celular	Función en la apoptosis	Supervivencia/ Proliferación
Ciclina A	-Regula positivamente la transición G1/S (Girard, Strausfeld et al. 1991)	-Induce la apoptosis (Hoang, Cohen et al. 1994); (Meikrantz, Gisselbrecht et al. 1994)	-Induce la supervivencia celular (Hunter and Pines 1991)
Ciclina E	-Induce la progresión de la fase G1 (Koff, Cross et al. 1991)	-Un papel positivo durante la apoptosis (Mazumder, Gong et al. 2002)	-Necesaria para la supervivencia y la proliferación celular (Dobashi 2005)
Ciclina D1/D2/D3	-Inducen la entrada en la fase G1 (Schwartz and Shah 2005)	- Reguladores positivos y negativos de la apoptosis (Kranenburg, van der Eb et al. 1996); (Biliran, Wang et al. 2005)	-Inducen la supervivencia celular (Hinds, Dowdy et al. 1994)
Ciclina B1/B2	-Reguladores positivos de la transición G2/M (Pines and Hunter 1989)	-Regulan positivamente la apoptosis (Porter, Singh et al. 2000); (Borgne, Versteeg et al. 2006); (Huang, Kurose et al. 2006)	-Inducen la supervivencia y la proliferación celular (Coqueret 2003)
Ciclina G	-Posible papel positivo en la regulación de la transición G1/S.	-Un papel positivo en la apoptosis (Okamoto and Prives 1999)	-Regulador positivo del crecimiento celular (Smith, Kontny et al. 1997)

<p>CDKs</p> <p>CDK1</p> <p>CDK2</p>	<p>-Regulador positivo de las fases G1/M y G1/S (Morgan 1997)</p> <p>-Regulador positivo de la transición G1/S (Morgan 1997)</p>	<p>-Papel positivo en la apoptosis (Golsteyn 2005)</p> <p>-Papel positivo en la apoptosis (Golsteyn 2005)</p>	<p>-Induce la proliferación celular (Wolowiec, Deviller et al. 1995)</p> <p>-Induce la proliferación celular pero no es necesario para la supervivencia celular (Berthet, Aleem et al. 2003)</p>
<p>CDKIs</p> <p>INK (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d})</p> <p>Cip/Kip (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip1})</p>	<p>-Regula negativamente la transición G1/S (Carnero and Hannon 1998)</p> <p>-Regula negativamente la transición G1/S (Hengst and Reed 1998)</p>	<p>-Regula negativamente la apoptosis (Ivanchuk, Mondal et al. 2001)</p> <p>-Regulador positivo y negativo de la apoptosis (Gartel 2005); (Hiromura, Pippin et al. 1999)</p>	<p>-Inhibe la proliferación celular (Sherr 2001)</p> <p>-Inhibe la proliferación celular (Hengst and Reed 1998)</p>

Tabla I.4 Papel de las ciclinas, las quinasas dependiente de las ciclinas y sus inhibidores en la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la supervivencia de las células. (Maddika, Ande et al. 2007)

4.3.3.2 La MAP-quinasa p38

La MAP quinasa p38 es una de las principales MAP-quinasas que regulan múltiples procesos biológicos en mamíferos (Ono and Han

2000). Al principio fue identificada como un mediador clave de inflamación y respuestas frente a estrés oxidativo. Estudios posteriores también implicaron p38 en el ciclo celular y la proliferación, la diferenciación celular y la senescencia (Nebreda and Porras 2000); (Johnson and Lapadat 2002); (Han and Sun 2007). La forma activa de p38 es la p38 fosforilada (P-p38) y como hemos señalado se activa como un mediador clave en la respuesta inflamatoria y frente al estrés oxidativo.

En las células eucariotas, la MAPK p38 es una de las vías sensibles a los estímulos de estrés que causan daño al DNA y responden mediante la regulación de los puntos de control a nivel G1/S (Ito, Hirao et al. 2006) y G2/M (She, Chen et al. 2000) para permitir la reparación del DNA. Además de la regulación del ciclo celular, p38 está implicada en la regulación de la diferenciación celular, la senescencia y la apoptosis (Nebreda and Porras 2000); (Johnson and Lapadat 2002); (Han and Sun 2007); (Hui, Bakiri et al. 2007).

5. Radicales libres

5.1 Concepto de radical libre

Radical libre es aquella especie química que contiene uno o más electrones desapareados en su capa de valencia. La presencia de este tipo de electrones hace que estas especies presenten una gran reactividad. Se caracterizan por su gran poder oxidante y porque su vida media es normalmente muy corta. La tabla I.5 muestra ejemplos de la vida media de algunos radicales libres.

Radical	Sustrato^a	Concentración^b	Vida media (a 37°C)
HO[·]	LH ^c	1 M	10 ⁻⁹ seg.
RO[·]	LH	100 mM	10 ⁻⁶ seg.
ROO[·]	LH	1 mM	7 seg.
L[·]	O ₂	20 μM	10 ⁻⁸ seg.
Q^{··}	-	-	Días

Tabla I.5 Vida media de radicales libres

Estas especies químicas son abundantes en los sistemas vivos. Algunos autores como Denham Harman en su estudio sobre el origen y evolución de la vida (Harman 2001) proponen a los radicales libres como una de las causas del origen de la vida en nuestro planeta. Hace 3.500 millones de años las reacciones ionizantes provocadas por el sol, que formaban radicales libres, empezaron a producir reacciones espontáneas entre átomos y moléculas originando la formación de una serie de moléculas capaces de transmitirse información química entre sí.

Un momento culminante en el origen de la vida se produjo con la aparición de los procesos de recombinación y de escisión de moléculas, llegando al origen de la algas verdes hace 2.600 millones de años. A partir de este momento los organismos procariotas anaerobios evolucionaron a eucariotas, dominando la tierra. Otro salto evolutivo se produjo, hace 1.300 millones de años, con la simbiosis de una célula eucariota con una procariota con capacidad de reducir O₂ a H₂O₂. Es entonces cuando el oxígeno empezó a acumularse en la tierra formando

la capa de ozono, permitiendo la evolución de las futuras especies fuera del mar. El oxígeno se convirtió entonces en la molécula que proporcionaba la fuente primaria energética en los organismos aerobios, que son los que evolucionaron hasta los seres humanos entre los miles de especies actuales.

El oxígeno, por una parte da origen a la vida y por otra, por su capacidad de formar distintos radicales libres es capaz de dañar estructuras esenciales para el desarrollo de ésta, tales como DNA, proteínas, carbohidratos y lípidos (Sies 1983) (Halliwell and Gutteridge 1985). Además los radicales libres intervienen en procesos fisiopatológicos como la diabetes y algunos tipos de cáncer (Takada, Neil et al. 1982; Okamoto 1985). También intervienen en procesos fisiológicos como el envejecimiento (Pacifi and Davis 1991) y el ejercicio físico agotador (Davies, Quintanilha et al. 1982; Sastre, Asensi et al. 1992).

En la naturaleza los radicales libres son mayoritariamente compuestos derivados del oxígeno y se denominan especies reactivas del oxígeno (Doroshov and Hochstein).

5.2 El oxígeno

El oxígeno se encuentra en la naturaleza mayoritariamente en forma molecular o diatómica (O_2) y contiene 16 electrones distribuidos correspondientemente en sus distintos orbitales según la teoría de los orbitales moleculares (TOM) (Whitten, Gailey et al. 1992). La estructura termodinámicamente más estable de la molécula forma una distribución electrónica de forma que deja desapareados dos electrones en la capa de

valencia, por lo que le capacita para reaccionar eficazmente con radicales libres, aunque su velocidad de reacción con especies radicalarias suele ser baja (Cheeseman and Slater 1993). Esta configuración está considerada por algunos autores como un radical libre.

El oxígeno diatómico es una forma muy abundante en la naturaleza debido a que es una molécula estable. Sin embargo, existe un gran número de especies derivadas del oxígeno que, o bien son muy reactivas, o bien son capaces de dar lugar a especies reactivas (ver Tabla I.6). Algunas de estas especies son auténticos radicales libres derivados del oxígeno, como el radical hidroxilo. Otras como el peróxido de hidrógeno, no son en realidad radicales en el sentido estricto de su definición.

Además existen otras especies radicalarias no derivadas del oxígeno que están tomando interés en los últimos años, como las derivadas del nitrógeno (RNS).

ESPECIE	SÍMBOLO
Radical superóxido	$O_2^{\cdot -}$
Radical hidroperóxido	HO_2^{\cdot}
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2
Radical hidroxilo	HO^{\cdot}
Radical alcóxido	RO^{\cdot}
Radical peróxido	ROO^{\cdot}
Óxido nítrico	NO^{\cdot}
Dióxido de nitrógeno	NO_2^{\cdot}

Tabla I.6 Especies activadas del oxígeno y nitrógeno

Tal y como veremos a continuación, las especies clave en la fisiopatología del oxígeno y de los radicales libres son el mismo oxígeno, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno, los iones de metales de transición y el radical hidroxilo, entre otros. Éste último es producto de formación de una multitud de reacciones en las que participan los cuatro primeros compuestos mencionados.

5.3 Clases de Radicales libres

Existen muchas clases de radicales libres, tanto especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) como las especies reactivas del nitrógeno (RNS). Algunos de los radicales libres más importantes son:

- Anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)

Estado de reducción del oxígeno de un electrón, formado en reacciones catalizadas enzimáticamente, como producto en las reacciones de las deshidrogenasas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, etc. (Korycka-Dahi and Richardson 1981), en las oxidasas e hidroxilasas (diamino oxidasa, galactosa oxidasa, citocromo p450, etc.), también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína (Viña, Sáez et al. 1983) o la riboflavina (Barton and Parker 1970). Asimismo en la cadena respiratoria mitocondrial (Boveris, Oshino et al. 1972), siendo potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos.

Se ha estimado que una célula del cuerpo humano produce alrededor de unas 10^{10} moléculas de anión superóxido por día (Ames, Shigenaga et al. 1993). Sin embargo el 99% de las moléculas que se

producen se dismutan hacia peróxido de hidrógeno (Cheeseman and Slater 1993).

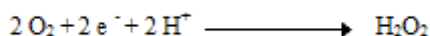


- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre como tal, pues no posee electrones desapareados en su capa de valencia. Es la forma menos activa de las especies reactivas del oxígeno. Su importancia recae en el hecho de que atraviesa fácilmente las membranas biológicas, con lo que puede dar lugar a reacciones de oxidación en puntos de la célula más alejados de su lugar de producción.

Se puede originar a partir de diversas fuentes:

- Por reducción directa de una molécula de oxígeno por dos electrones (Sawyer 1988; Fridovich 1997).

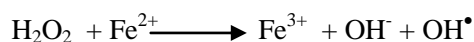


- Por dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ (Cheeseman and Slater 1993; Frei 1994).
- Como producto de algunas enzimas (glucosa oxidasa, uricasa, etc.) (Fridovich 1986).
- Por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi and Richardson 1981)

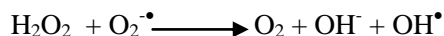
- Radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$)

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de

10^{-9} s (Liochev and Fridovich 1994). Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos γ) que puede provocar rotura homolítica del agua corporal. La luz UV no tiene suficiente energía como para escindir una molécula de agua, pero puede dividir el agua oxigenada en 2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton (Fenton 1894).



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la reacción de Haber-Weiss (Haber and Weiss 1934).



Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

- Radical peroxilo (ROO^\bullet)

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga, del orden de segundos, (ver tabla I.5)

- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre como tal. Se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10^{-6} segundos, dependiendo de la naturaleza de la matriz circundante. Puede interaccionar con otras moléculas transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose

químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas o en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintasa, entre otras (Kanofsky and Sima 1993).

- Óxido nítrico (NO^\bullet)

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble, cuya vida media es relativamente larga (3-5 s). Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina, dando como subproducto NO^\bullet en numerosos tipos celulares (Moncada, Palmer et al. 1991).

- Dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet)

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO^\bullet atmosférico (Postlethwait, Langford et al. 1995). Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica (Postlethwait, Langford et al. 1995).

- Radicales de átomos derivados de carbono (R^\bullet)

Los radicales centrados en un átomo de carbono (R^\bullet) surgen del ataque de un radical oxidante sobre una molécula biológica. En el primer paso se arranca un átomo de hidrógeno (H^\bullet) de un grupo metileno situado entre dos enlaces dobles. Este tipo de radicales es muy inestable y reacciona rápidamente con el oxígeno, dando lugar a un radical peróxido (ROO^\bullet). A su vez, estos radicales pueden participar en otras reacciones y generar otras especies radicales (Frei 1994).

- Radicales de átomos derivados de azufre (RS[•])

Los átomos de azufre también pueden ser el centro de un radical libre (RS[•]) formado, por ejemplo, a partir de la cisteína. Ésta se autooxida con facilidad dando lugar a la formación de radicales tiilo e hidroxilo (Estrela, Saez et al. 1983; Sparrow and Olszewski 1993).

5.4 Génesis de ROS

Todos los radicales libres descritos anteriormente corresponden a especies cuya formación es endógena, pero el organismo también está expuesto a radicales libres procedentes de fuentes externas como la dieta (en la que son ingeridos muchos compuestos de naturaleza prooxidante), el ozono, el humo del tabaco, la polución ambiental, etc. (Ames 1983). Las especies reactivas del oxígeno pueden tener un origen endógeno o exógeno (Freeman and Crapo 1982; Frei 1994). Algunas de ellas surgen como “accidentes químicos”, es decir, reacciones secundarias no deseadas entre las biomoléculas o en la detoxificación de xenobióticos, pero otras especies activadas de oxígeno se generan *in vivo* con un fin determinado, como en el caso de los fagocitos activados, que producen O₂^{•-} y H₂O₂ (Halliwell 1991).

5.4.1 Fuentes exógenas

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies activadas de oxígeno son:

➤ Muchos agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos (Doroshov and Hochstein 1982) que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han

atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

➤ La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X, γ) o debido a radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β) (Bielsky and Gebieki 1977).

➤ Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos. Estos agentes, o bien poseen radicales libres, como el humo del tabaco, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación (Mason 1982).

5.4.2 Fuentes endógenas

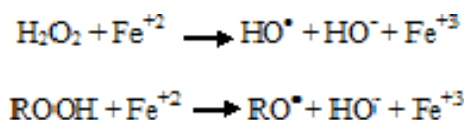
5.4.2.1 La cadena de transporte electrónico mitocondrial

La cadena de transporte electrónico mitocondrial es una de las principales fuentes generadoras de radicales libres en el interior de la célula. Está compuesta por una serie de proteínas con capacidad redox que reducen al oxígeno molecular hasta la formación de una molécula de agua. Esta reacción está acoplada a la fosforilación oxidativa, en la cual se produce energía en forma de ATP.

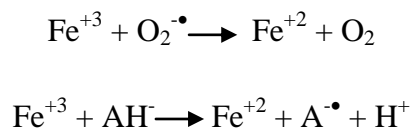
5.4.2.2 Reacción de Fenton-Haber-Weiss

Consiste en la reducción del H_2O_2 por iones de metales de transición, sobre todo el ion ferroso (Fe^{+2}) y, en menor medida, el cuproso (Cu^+) y otros iones. El agua oxigenada (H_2O_2) es una molécula

relativamente estable en ausencia de catalizadores que promuevan su descomposición. Fenton (Fenton 1894) descubrió, a finales del siglo pasado, que se podían oxidar moléculas orgánicas por mezclas de peróxido de hidrógeno y Fe^{+2} (reactivo de Fenton). Fueron Haber y Weiss los que posteriormente comprobaron cómo el Fe^{+2} reduce al H_2O_2 , que a su vez se descompone en radical hidroxilo e ión hidroxilo (Haber and Weiss 1932). Y en general,



Aunque esta reacción puede tener lugar con varios metales, el hierro parece ser el más importante en sistemas biológicos. El Fe^{+2} se oxida a Fe^{+3} con mucha facilidad, y éste es muy insoluble. Por ello, el hierro libre que pueda haber en los sistemas biológicos estará en muy pequeñas cantidades y en forma férrica (Halliwell and Gutteridge 1986). Pero el ion férrico puede ser reducido por el ascorbato (Rawley and Halliwell 1983; Sawyer 1988) y por el radical superóxido (Frei 1994), con lo que se genera un ciclo de producción continua de radicales hidroxilo:



5.4.2.3 Los sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico

Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados (Capdevila, Parkhill et al. 1981) y xenobióticos.

5.4.2.4 Fagocitos activados

Los fagocitos activados (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen diversas enzimas que les permiten generar O_2^{\bullet} y H_2O_2 como mecanismo de defensa frente a microorganismos (Babior 1978).

5.4.2.5 Microsomas o peroxisomas

Los microsomas o peroxisomas son una fuente importante de peróxido de hidrógeno. Poseen una concentración elevada de oxidasas, como la D-aminoácido oxidasa y la acetil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen peróxido de hidrógeno como producto de la reacción que catalizan (Boveris, Oshino et al. 1972).

5.4.2.6 Autooxidación de pequeñas moléculas

Existen en la célula una gran variedad de componentes solubles, capaces de producir reacciones de oxidación-reducción, tales como los tioles, hidroquinonas, catecolaminas, flavinas y tetrahidropterinas. En todos estos casos, el radical superóxido es el radical primario formado por la reducción del dioxígeno por estas moléculas (Baccarini 1978).

Asimismo, también se produce peróxido de hidrógeno como producto secundario, a partir de la dismutación del radical superóxido, bien espontánea, o bien catalizado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD).

5.4.2.7 Enzimas solubles y proteínas

Enzimas como xantina oxidoreductasa, óxido nítrico sintasa, aldehído oxidasa, flavinprotein deshidrogenasa y triptófano dioxigenasa, generan radicales libres durante su ciclo catalítico (Aleman and Handler 1967).

5.4.2.8 Membrana plasmática

La enzima NAD(P)H-oxidasa presente en la membrana plasmática de las células fagocíticas, es una importante fuente biológica de producción de radicales libres, debido a la activación de los leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que consumen gran cantidad de oxígeno, el cual será transformado en radical superóxido. Estos radicales libres de oxígeno pueden dañar a la propia célula que los origina y a células próximas a los fagocitos estimulados. También se ha visto que la NADH oxidasa es una importante fuente de radicales libres en células musculares lisas arteriales y endotelio (Jones, Wood et al. 1994).

Cabe destacar el papel de las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa, en la producción de radicales libres fruto del metabolismo de su producto, el ácido araquidónico, para dar potentes productos biológicos: prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (White 1990).

6. Estrés oxidativo

6.1 Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como una alteración del equilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies 1986).

A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell 1996).

La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable (Slater 1984), ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular. Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está provista de gran cantidad de mecanismos antioxidantes.

Cuando se produce un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas.

Así pues, el estrés oxidativo puede originarse por un exceso de sustancias prooxidantes, una deficiencia de agentes antioxidantes, o por ambos factores a la vez.

6.1.1 Estrés oxidativo y daño a biomoléculas

6.1.1.1 Daño oxidativo a lípidos

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres (Cheeseman and Slater 1993) siendo el radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), el peróxido ($\text{ROO}\bullet$), el alcoxilo ($\text{RO}\bullet$) y el alquílico ($\text{R}\bullet$) los principales generadores de daño oxidativo a lípidos

El proceso de ataque oxidativo a lípidos (Figura I.3), denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, y se forma un radical alquílico (Halliwell 1994; Krinsky 1994). Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos contiguos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados, con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria (Halliwell 1994).

De esta manera, un sólo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonenal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano (Cheeseman and Slater 1993); (Freeman and Crapo 1982; Halliwell 1991; Halliwell 1994). Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el ADN, y producen daños estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas (Krinsky 1994).

La peroxidación lipídica se considera un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas (Lippman 1985). El daño oxidativo a los lípidos de membrana constituye, muy probablemente, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas (Shigenaga, Hagen et al. 1994)

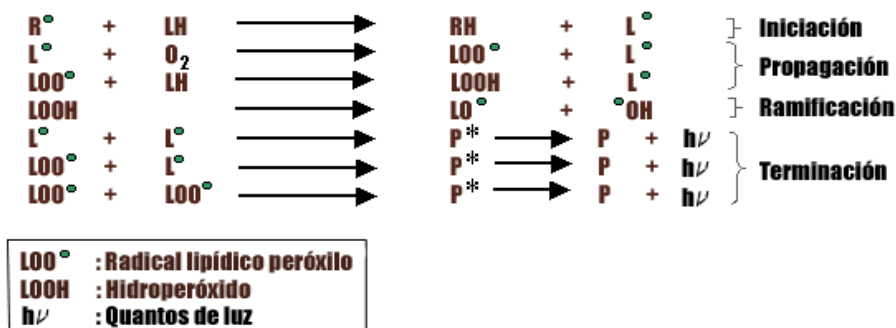


Figura I 3 Mecanismo de peroxidación lipídica

6.1.1.2 Daño oxidativo a proteínas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadman 1992). Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los que más procesos oxidativos sufren (Davies, Delsignore et al. 1987). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica (Stadman 1992).

En la Tabla I.7 se resumen los sistemas fisiológicamente más importantes que producen la oxidación de proteínas.

ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICOS
<ul style="list-style-type: none"> • NADPHoxidasas/NADPH/Fe(III)/O₂ • Xantina Oxidasa/Hipoxantina/Fe(III)/O₂ • CitocromoP450 reductasa/CitocromoP450 /NADPH/Fe(III)/O₂ • CitocromoP450reductasa/redoxina/ CitocromoP450/ NADH/Fe(III)/O₂ • Nicotinato hidroxilasa/NADPH/Fe(III)/O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Ascortato/Fe(III)/O₂ • RSH/Fe(III)/O₂ • Fe(II)/O₂ • Fe(II)/H₂O₂ (reactivo de Fenton)

Tabla I.7 Sistemas más importantes que generan la oxidación de proteínas

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadman 1992). El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína (Dean, Giese et al. 1993).

Se ha propuesto que la oxidación de enzimas mediada por radicales libres es un paso de marcaje dentro del recambio proteico (Stadman 1992).

6.1.1.3 Daño oxidativo al DNA

El DNA también es susceptible de daño oxidativo en todos sus componentes. El oxígeno es capaz de atacar tanto a las bases como al azúcar.

Podemos encontrar más de 20 subproductos tras un ataque oxidativo al DNA. Entre ellos, la oxidación de la 2-desoxiguanosina a 8-hidroxi 2-desoxiguanosina es una de las lesiones más frecuentes, y reviste gran importancia por su alto efecto mutagénico, ya que durante la replicación producirá transversiones de purinas (Kasai and Nishimura 1984; Shibutani, Takeshita et al. 1992).

El daño oxidativo asociado a proteínas y DNA no debe ser considerado de manera independiente. La acumulación de formas inactivas de enzimas reparadoras puede aumentar la acumulación de daño oxidativo en el DNA, por lo que se pueden potenciar uno a otro. Cuando la replicación del DNA dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un DNA dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (Halliwell and Auroma 1991; Breen and Murphy 1995). Por ello, las lesiones oxidativas al DNA parecen estar implicadas no sólo en el envejecimiento celular, sino también en la patogénesis de las enfermedades asociadas a la edad avanzada. El DNA dañado es reparado por enzimas que cortan la parte afectada, que es entonces excretada por la orina (Viguie, Shigenaga et al. 1993).

Puesto que las enzimas reparadoras no llegan a eliminar todas las lesiones se acumulan, con lo que el número de mutaciones aumenta con la edad (Viguie, Shigenaga et al. 1993).

El DNA mitocondrial sufre mucho más daño oxidativo que el nuclear (Richter, Park et al. 1988), ya que presenta ciertos rasgos que le hacen especialmente susceptible de ser atacado por agentes oxidantes: carece de histonas que puedan recibir el ataque en lugar del DNA (Donald and Johns 1995); el sistema de reparación es menos efectivo (Shen, Wertelecki et al. 1995; Suter and Richter 1999) y, por último, se encuentra muy cerca de la cadena de transporte mitocondrial, uno de los sistemas principales de producción de especies reactivas del oxígeno (Giulivi and Davies 1993). Otro factor distintivo del DNA mitocondrial es que no posee intrones, de manera que la modificación de cualquier base afecta usualmente a una zona de DNA codificante (Linnane, Marzuki et al. 1989; Ames, Shigenaga et al. 1993) y su repercusión suele ser, por tanto, más importante.

6.1.1.4 Daño oxidativo a glúcidos

Los glúcidos reaccionan con facilidad con el radical hidroxilo. Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares (Albertini, Rindi et al. 1996).

El daño oxidativo a los glúcidos reviste importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Borel, Monboisse et al. 1988) dando lugar a procesos degenerativos. Un caso especial es el del ácido

hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial.

6.1.1.5 Indicadores de estrés oxidativo.

Dada la importancia del daño que el estrés oxidativo puede producir en las células y en el organismo, en los últimos años se ha intentado encontrar índices que nos permitan medirlo. Entre los indicadores propuestos, uno de los más relevantes es el cociente glutatión oxidado/glutatión reducido (GSSG/GSH) característico de estrés oxidativo, de modo que un aumento en la concentración de glutatión oxidado produce una alteración del estado redox celular (Sies 1986).

Además como indicadores de daño oxidativo a lípidos, el malondialdehído y el hidroxinonenal son los más empleados, aunque también se pueden considerar los niveles de pentano y de etano. La 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina es un indicador de daño oxidativo al DNA, los grupos carbonilo y la 2-oxohistidina se utilizan como marcadores de daño en oxidativo en proteínas (Hageman, Bast et al. 1992), etc.

7. Defensas frente al estrés oxidativo

7.1 Antioxidantes

Ya que los seres vivos han evolucionado en presencia de sustancias oxidantes, la evolución ha ido dotando a estos organismos de sistemas capaces de hacer frente a este tipo de sustancias tan reactivas. Halliwell en 1995 definió como antioxidante a cualquier sustancia que,

cuando está presente en bajas concentraciones comparado con el sustrato oxidable, disminuye significativamente o inhibe la oxidación de este sustrato (Sies 1993; Halliwell and Gutteridge 1995; Halliwell 1996).

De modo que pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de ROS
- Interceptando el ataque de ROS
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por ROS
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.

Bajo el punto de vista de la fisiología celular, los podemos dividir en antioxidantes primarios, secundarios y terciarios.

Los *antioxidantes primarios* previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluye a la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina) que limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH^\bullet (Halliwell and Gutteridge 1989).

Los *antioxidantes secundarios* son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay

superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (Halliwell and Gutteridge 1990).

Los *antioxidantes terciarios* reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos intracelulares, que actúan degradando proteínas dañadas oxidativamente, evitando de este modo su acumulación (Davies, Delsignore et al. 1987; Pacifi and Davis 1991). También podemos destacar las enzimas reparadoras de DNA, la metionina sulfóxido reductasa y la fosfolipasa A2 que corta los fosfolípidos oxidados de la membrana (Sevanian, Davies et al. 1985).

Otra forma de clasificar a los antioxidantes, muy utilizada en la literatura, es desde un punto de vista bioquímico. Así, podríamos clasificarlos en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

7.1.1 Antioxidantes enzimáticos

7.1.1.1 Superóxido dismutasa

Su actividad fue descrita por primera vez por McCord y Fridovich en 1969 (McCord and Fridovich 1969). La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa (McCord, Keele et al. 1974).

Hay descritas cuatro formas diferentes de superóxido dismutasas (Fridovich 1974), según el grupo prostético metálico ligado al enzima (Tabla I.8).

ENZIMA	GRUPO PROSTÉTICO	LOCALIZACIÓN CELULAR
Cu,Zn-SOD	Cu,Zn	Citosol y Núcleo
Mn-SOD	Mn	Matriz mitocondrial y Citosol
Mn-SOD	Mn	Bacterias
Fe-SOD	Fe	Bacterias

Tabla I.8 Tipos de SOD y localización celular mayoritaria

7.1.1.2 Glutación peroxidasa

La glutación peroxidasa (GPx) es también un antioxidante primario. Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos en moléculas inofensivas (Chance, Sies et al. 1979).

Hay dos tipos de glutación peroxidasa, y ambas requieren glutación reducido como dador de equivalentes reductores: Glutación peroxidasa selenio dependiente (Ketterer 1986) y glutación peroxidasa no selenio dependiente: sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos (Ketterer 1986).

7.1.1.3 Catalasa

La catalasa participa en la eliminación de peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance, Sies et al. 1979).

También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H₂O₂, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos (Chance, Sies et al. 1979).

7.1.2 Antioxidantes no enzimáticos

7.1.2.1 El glutatión

Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 (Hopkins 1921) y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere ciertas características que hacen que el glutatión tenga una funcionalidad amplia e importante en la célula.

Se puede encontrar en 2 formas según su estado de óxido-reducción: como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas.

El GSH participa en gran cantidad de procesos fisiológicos:

1. Papel en la síntesis del DNA (Holmgren 1979)
2. Papel protector frente al estrés oxidativo (Sies 1986); (Kosower and Kosower 1983).

3. Papel en la regulación de la síntesis de proteínas (Ochoa 1983).
 4. Colabora en la detoxificación de xenobióticos (Orrenius and Moldeus 1984)
 5. Contribuye a la captación de aminoácidos en algunos tejidos (Vina 1990.).
 6. Constituye un reservorio de cisteína (Tateishi, Higashi et al. 1974)
 7. Modula actividades enzimáticas (Pajares, Durán et al. 1992).
 8. Juega un papel en la homeostasis del calcio (Bellomo, Jewel et al. 1982)
 9. Participa en la regulación de la proliferación celular (Bellomo, Jewel et al. 1982).
- Papel antioxidante del glutatión: ciclo redox

El GSH puede reaccionar directamente con los radicales libres, sin intervención enzimática alguna y detoxificarlos, o bien puede reducir los peróxidos formados por medio de la glutatión peroxidasa (Cheng, Siow et al. 2011)

7.1.2.2 Vitamina E

Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas. Es

probablemente el antioxidante más potente del organismo, en cuanto a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación.

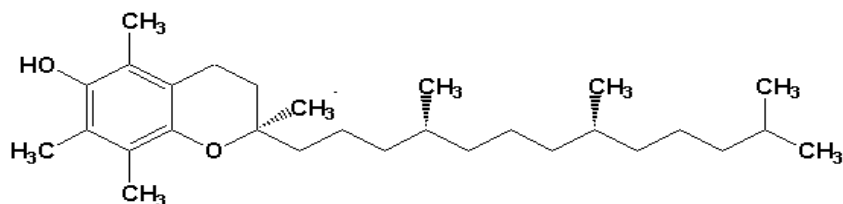


Figura I.4 Estructura de la vitamina E

La vitamina E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona.

El alfa-tocoferol es el antioxidante más eficiente de la fase lipídica (Niki 1987). Contiene grupos metilo adyacentes a los grupos hidroxilo fenólicos y están óptimamente posicionados en las membranas. Los tocoferoles además tienen capacidad de captar energía del oxígeno singlete y de interaccionar con peroxinitritos.

Los niveles de vitamina E en plasma en humanos son de alrededor de 22 μ moles/L; se encuentra en tejidos como el hígado, el riñón, tejido adiposo o adrenal.

7.1.2.3 Vitamina C

Se considera uno de los más poderosos y quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales (Bendich, Machlin et al. 1986). Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno,

el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana.

La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular (Frei 1994), aunque no ha podido demostrarse su efecto prooxidante *in vivo*.

7.2 La vía de defensa celular del factor nuclear de transcripción

Nrf2

La función normal de la célula requiere un balance estable de oxidación–reducción, por lo que las células eucariotas han elaborado unas defensas antioxidantes endógenas para enfrentar el estrés oxidativo. Entre ellas, la vía Nrf2/ARE (*electrophile response element*) ha surgido como un mecanismo de transcripción importante que participa en la regulación de genes antioxidantes y el mantenimiento de la homeostasis en el estado redox celular (Motohashi and Yamamoto 2004).

ARE es un cis-elemento colocado en los genes que codifican las enzimas detoxificantes y las enzimas antioxidantes de la fase II, incluyendo NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), GST, las subunidades de la glutamato-cisteín ligasa (GCL), hemo oxigenasa 1 (HO-1), y el transportador de cisteína/glutamato (xCT) (Hayes, Chanas et al. 2000); (Mann, Bonacasa et al. 2009); (Motohashi and Yamamoto 2004).

Nrf2 se degrada en condiciones basales gracias a la proteína citosólica *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap1) (ver figura I.5).

El exceso en la producción de ROS y los agentes electrofílicos conllevan a alteraciones espaciales en el complejo Nrf2-Keap1 (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (Katoh, Iida et al. 2005); (McMahon, Itoh et al. 2003), y como resultado se produce la acumulación nuclear de Nrf2 y la regulación de la expresión de genes asociados a ARE. La activación de la vía Nrf2/ARE está modulado por la tensión de oxígeno, ya que en las células microvasculares humanas, la actividad de Nrf2 está elevada con la hiperoxia (Godman, Chheda et al. 2010).

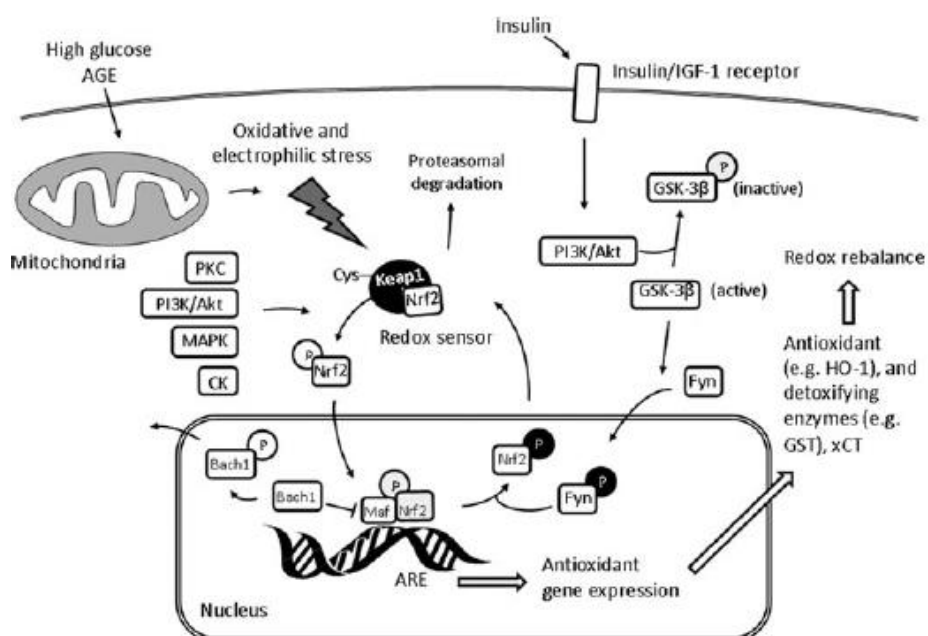


Figura I.5 Regulación de la vía de defensa Nrf2-Keap1 (Cheng, Siow et al. 2011)

7.2.1 Hemo oxigenasa 1 (HO-1)

La proteína inducible hemo oxigenasa 1 (HO-1) cataliza la oxidación del hemo a monóxido de carbono (CO) y biliverdina, que ejerce un efecto protector frente al estrés oxidativo y modula la proliferación celular y la diferenciación (Otterbein and Choi 2000). Previamente, se ha demostrado que la vía HO-1 es un mecanismo clave para la adaptación de las células de la pulpa dental humana (HDPCs) y las células del ligamento periodontal (PDLCS) a condiciones de estrés y para su recuperación de acontecimientos perjudiciales (Min, Hwang et al. 2006); (Min, Kwon et al. 2006); (Pi, Kim et al. 2007); (Lee, Pi et al. 2007); (Lee, Min et al. 2008); (Kook, Hwang et al. 2009); (Kook, Lee et al. 2009). Además, la expresión de HO-1 está relacionada con la adipogénesis en células madre mesenquimales humanas (hMSCs) (Kim, Burgess et al. 2008), la diferenciación a osteoblastos en PDLCS (Lee, Min et al. 2008); (Lee, Choi et al. 2009), y la diferenciación neuronal en MSCs (Barbagallo, Tibullo et al. 2008). Una terapia combinada para enfermedad cardiaca usa las CMMs y HO-1 con un vector adenoviral lo que mejora la supervivencia de las CMMs, el tamaño del infarto y el funcionamiento cardiaco (Zeng, Chen et al. 2008).

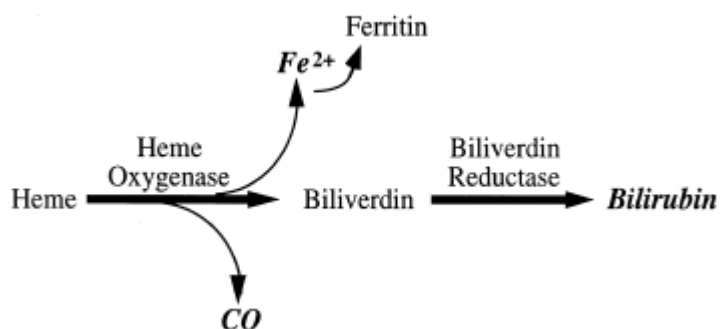


Figura I.6 Reacción enzimática de la hemo oxigenasa 1

7.2.2 NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1)

Las propiedades catalíticas de NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) fueron descritas por primera vez por Ernster y Navazio en 1958 (Ernster 1958). NQO-1 es una enzima citosólica (>90%), caracterizada por su capacidad de utilizar tanto NADH como NADPH como un cofactor reductor y también por su inhibición por dicoumarol (Ernster 1967). NQO-1 reduce las orto- y para-quinonas a hidroquinonas en un solo paso. Además de las quinonas, esta enzima reduce otros sustratos como: *quinone-imines*, *glutathionyl* *naphthoquinones*, *dichlorophenolindolphenol*, *methylene blue*, *azo* y *nitro* compuestos (Lind, Cadenas et al. 1990); (Ernster 1967).

Las propiedades químicas de las hidroquinonas formadas después de su reducción por NQO-1 determinan si NQO-1 cataliza su activación o desactivación. No todas las hidroquinonas son químicamente estables, en algunos casos, el metabolismo por NQO-1 da lugar a productos más activos, los cuales se pueden autooxidar para formar especies reactivas de oxígeno o generan especies alquiladas.

En un estudio reciente, NQO-1 está descrito como una enzima antioxidante. Este estudio demuestra que el ubiquinol formado por la reducción con NQO-1, es un antioxidante eficaz para la protección de los fosfolípidos de la membrana frente al daño oxidativo (Beyer, Segura-Aguilar et al. 1996).

Un papel adicional de NQO-1 en el metabolismo de α -tocopherol es el de mantener los niveles fisiológicos de α -tocopherol mediante la reducción de los α -tocopherones (Cadenas, Hochstein et al. 1992).

II. OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general de la presente tesis es determinar el efecto de la concentración de oxígeno (21% O₂ vs 3% O₂) sobre los parámetros de estrés oxidativo y la proliferación de las células madre de la pulpa dental humanas.

2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos de la tesis son:

1. Optimizar el tiempo de obtención de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂.
2. Caracterizar las células madre de la pulpa dental.
3. Determinar parámetros de estrés oxidativo, concretamente daño oxidativo a proteínas y a lípidos, en las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ o 21% O₂.
4. Determinar la tasa de proliferación de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ o 21% O₂.
5. Determinar el papel del estrés oxidativo sobre la proliferación de células madre de la pulpa dental.
6. Determinar el papel de las proteínas reguladoras del ciclo celular p38 y p21 en la proliferación de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ o 21% O₂.
7. Determinar si la vía del factor nuclear de transcripción Nrf2 está implicada en la defensa frente al estrés oxidativo de las células madre de la pulpa dental al 21% O₂ con respecto al 3% O₂.

Estos objetivos son los que fundamentalmente perseguimos en el desarrollo de la presente tesis, y cuyas observaciones mostramos en los siguientes apartados de la misma.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1 Aparatos

- Balanzas

- Balanza de precisión SARTORIUS, modelo TECATOR 6110, con una sensibilidad de ± 0.0001 g.
- Balanza de precisión SARTORIUS, modelo Aculab con una sensibilidad de ± 0.0001 g

- Centrífugas

- Las centrifugaciones a alta velocidad se realizaron en una centrífuga refrigerada marca SORVALL HERAEUS, modelo MULTIFUGE 3SR+, Thermoscientific
- Centrífuga refrigerada HERMLE Z216MK

- Espectrofotómetro Rango de onda

- Se utilizó un espectrofotómetro de la marca KONTRON modelo Uvikon 810 termostatzado.

- Sistema de purificación de agua

- Marca MILLIPORE, modelos Milli-Q y Milli-RO.
- Marca Elga, purelab flex

- pH metro

- El pH metro empleado es de la marca CRISON, modelo Microph 2001, con un electrodo incorporado INGLOD.

- Autoclave

- Marca Selecta, modelo Autester-G.

- **Cubetas de electroforesis**
 - Cubeta de la casa SIGMA- ALDRICH.
- **Fuentes de alimentación de electroforesis**
 - Marca SIGMA, modelo PS 250-2, y marca BIO-RAD, modelo 200/2.0 Power Supply.
- **Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**
 - Cromatógrafo modelo ULTIMATE 3000 de DIONEX y la técnica de cromatografía fue realizada en condiciones isocráticas siendo la fase móvil una mezcla de KH_2PO_4 50mM (pH 6.8) y acetonitrilo (70:30). Columna: C16 $5\mu\text{m}$ 120Å (4,6x150mm)
- **Campana de gases: Tipos de filtros**
 - Marca Crumair, 1100-G A
 - Marca Burdinola, OR-ST 1200
- **Agitador magnético**
 - Marca Stuart, Hotplate stirrer, SB 162-3
- **Campana de flujo laminar vertical**
 - Marca CULTAIR modelo B100
- **Campana de entorno fisiológico**
 - Marca Don Whitley HA500. 5% O_2 , 5% CO_2 , 37°C, 85% humedad
- **Estufa termostatzada de cultivos**
 - Thermoscientific HERAcell 150i CO_2 Incubator
 - BINDER CB150 5 % CO_2 , 3% O_2 Incubator
- **Microscopios:**
 - Microscopio óptico NIKON SE. x10 x20 x40
 - Microscopio óptico invertido ZEISS Modelo ID03

- Microscopio óptico BX51, Olympus, Ballerup, Denmark.
- Microscopio electrónico: Transmission electron microscope (Tecnai Spirit G2; FEI, Eindhoven, The Netherlands) by using a digital camera (Morada, Soft Imaging System; Olympus, Tokyo, Japan)
- Microscopía confocal unidad de barrido láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica SA, Mannheim) con un láser de argón y otro de neón-helio unido a un microscopio invertido de Leica DM1RB.
- **Baño ultrasonidos**
 - PSELECTA ULTRASONOS Frecuencia 50Hz, Amplitud 1,6
- **Baño seco**
 - Marca Stuart, Block heater, SBH 130 D
- **Congeladores**
 - Tanque de nitrógeno ARPEGE 140 Air Liquide -160°C
 - -80°C marca Revco, modelo ultima II
 - -80°C marca Platinum 500
 - -20°C marca Liebherr, modelo Comfort Nofrost
 - 4°C Nevera Lynx
- ❖ **Baño caliente**
 - Baño PSELECTA PRECISTERM
- ❖ **Materiales para la extracción de la pulpa**
 - Turbina Kavo®
 - Fresa cilíndrica diamantada
 - Sonda Hu-Friedy
 - Pinzas Hu-Friedy

1.2 Reactivos

- Determinación de proteínas

- Se empleó el “Protein ASSAY Kit” de Sigma-Aldrich Química, que contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin.

- Proteínas carboniladas

- Kit OxyBlot protein oxidation detection kit de Millipore.

- Enzimas

- Colagenasa tipo I SIGMA®, Dispasa tipo II SIGMA®, Termolisina (Vitacyte, Indianapolis, IN), Tripsina (Invitrogen)

- Medios de cultivo

- Dulbecco’s modified Eagle® (DMEM), GIBCO, con suplemento bajo de glucosa (1mg/mL), Invitrogen
- Suero bovino fetal (SBF). (GIBCO), Invitrogen
- Tampón fosfato sódico (PBS) 5 mM pH 7.4, NaCl 9 g. por litro (GIBCO), Invitrogen
- Antibióticos: Penicilina y Estreptomicina, GIBCO, Invitrogen

- Antioxidantes

- Trolox (Sigma Aldrich)

- “ECL Prime Western Blotting Detection Reagent” (Amersham Pharmacia, USA)

Es un kit que posee alta sensibilidad quimioluminescente para la

detección de antígenos conjugados con anticuerpos marcados con peroxidasa (HRP).

- **Otros reactivos químicos**

- MDA, EDTA, MOPS, NaCl, KCl, NaHCO₃, NaH₂PO₄, HEPES, TRIS, Glucosa, MgCl₂, NaOH, acrilamida/bisacrilamida, ácido acético, sacarosa, ácido clorhídrico, SDS, azul de bromofenol, azul de comassie, azul tripano, etc. El resto de reactivos se obtuvieron de los laboratorios: Sigma-Aldrich Química (España)

2. Métodos

2.1 Selección de pacientes y obtención de la muestra (pulpa dental)

Se realizó un estudio prospectivo, *in vitro*, no controlado. Los dientes fueron extraídos por odontólogos del Departamento de Cirugía de la Clínica Odontológica. Facultad de Medicina y odontología. Universidad de Valencia, entre Mayo 2008 y Noviembre 2010.

Todos los pacientes fueron informados de las características del estudio, y aceptaron libremente colaborar con el mismo, aportando el diente extraído, el cual fue siempre exodonciado por motivos ajenos a este estudio. Fueron convenientemente informados y firmaron un consentimiento informado que adjunto en el anexo I junto con la hoja de información al paciente. Durante todo el estudio se mantuvo el anonimato del paciente y la protección de datos del mismo.

De todas las pulpas recogidas se seleccionaron los siguientes datos: diente extraído, sexo y edad del paciente, fecha de la exodoncia y del cultivo y método del cultivo realizado. El cultivo de células madre de la pulpa dental se realizó en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia durante las fechas citadas previamente.

En el estudio se usaron pulpas dentales de dientes permanentes de 110 pacientes, hombres (31) y mujeres (79) entre 14 y 67 años. De los 110 pacientes, de 10 de ellos se recogieron pulpas por duplicado de 2 dientes distintos.

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron para el cultivo de células madre de pulpa dental, aquellas pulpas de dientes que no presentasen clínica y/o radiológicamente ningún signo o síntoma de inflamación y/o infección.

- **Criterios de exclusión**

Se excluyeron todas aquellas pulpas de dientes que clínica y/o radiológicamente presentasen alguno de los siguientes cuadros clínicos: pulpitis, periodontitis apical, enfermedad periodontal, fracturas que afectaran a la pulpa dental y aquellos dientes en los que durante la exodoncia se produjera una fractura del diente o se realizara la odontosección del mismo.

- **Extracción de la pulpa dental**

Se realizó la extracción de la pulpa dental cortando el diente exodonciado a nivel de la línea amelocementaria con una turbina y una

fresa diamantada. Una vez despegada de la cámara pulpar, se extrajo con unas pinzas (Figura III.1).

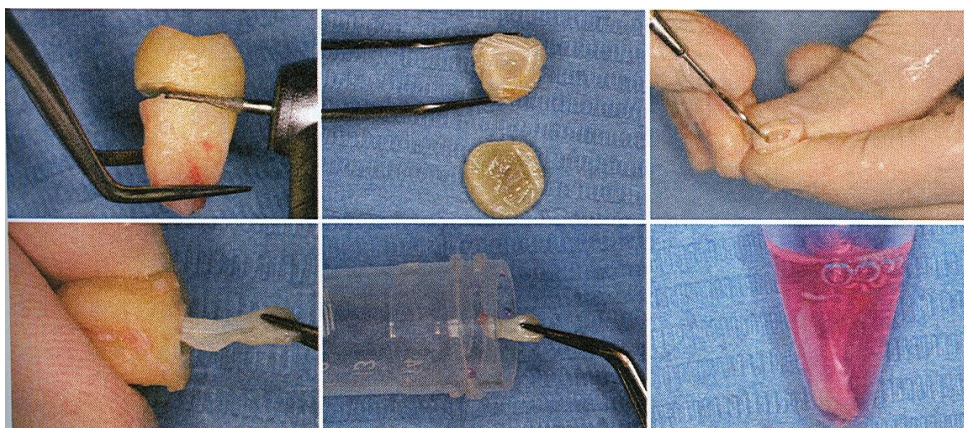


Figura III.1 Extracción de la pulpa dental

- Almacenamiento y transporte

Una vez extraída la pulpa dental, se almacenó en tubos con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle® con suplemento bajo de glucosa (1g/L) y antibióticos (Penicilina 100U/mL y Estreptomicina 100 µg/mL). Entre la extracción de la pulpa y su cultivo hubo un rango de tiempo de entre 1h y 24h. Durante este tiempo se guardó a 4°C.

2.2 Cultivos celulares

Cultivos celulares son el producto de la colección de células animales de diferentes órganos, mantenidas en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, con lo que conservan todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped. Los cultivos celulares pueden ser primarios o secundarios.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido obtenidas a partir del tejido de un organismo pluricelular, recibe el nombre de cultivo primario.

En nuestro estudio, empleamos las células madre mesenquimales provenientes de pulpas dentales humanas, por tanto realizamos cultivos primarios.

2.2.1 Condiciones de cultivo

Las células madre de la pulpa dental se cultivaron según indicaciones de la AMERICAN TYPE CELL CULTURE (ATCC).

El procedimiento es el siguiente: se prepara el medio de cultivo en frascos de poliestireno de 75 ó 25 cm², suministrados por Falcon Labware, USA, para un volumen final de 15 y 5 mL respectivamente, la composición del medio de cultivo completo es la siguiente:

- Dulbecco's modified Eagle® (DMEM), GIBCO, con suplemento bajo de glucosa (1g/L), Invitrogen pH 7.4.....90% (v/v)
- Suero bovino fetal.....10% (v/v)

Una vez preparado el medio de cultivo, se añaden las células en una proporción de 10⁵ células / cm² y se introduce la mezcla (0.2mL medio completo/cm²) en los diferentes frascos. Se incuban a 37°C en una estufa incubadora bajo una atmósfera con un 5 % de CO₂, 3-5% de O₂ ó 21% de O₂.

Para los experimentos de la curva de crecimiento de las células, se dejó crecer los cultivos en frascos de poliestireno de 25 cm² hasta los

puntos deseados de la curva y se procedió a contar las células o a recoger muestras para medir los parámetros de estrés oxidativo.

Para todos los otros experimentos, se dejó crecer el cultivo hasta alcanzar la confluencia deseada, después se procedió a la recogida de muestras de las células.

2.2.2 Métodos empleados para la optimización de la obtención de células madre de pulpas dentales al 3% O₂

❖ Reactivos

- EDTA (Sigma)
- Colagenasa I (Sigma)
- Dispasa II (Sigma)
- Termolisina (Vitacyte, Indianapolis, IN)
- Tripsina (Invitrogen)
- Dulbecco's modified Eagle® (DMEM), con suplemento bajo de glucosa (1g/L), Invitrogen (GIBCO Lab. USA)
- Suero bovino fetal (SBF) con complemento inactivado (Invitrogen)

Las células madre de pulpa dental fueron aisladas siguiendo el protocolo:

- 1- Cortar la pulpa dental mecánicamente con una hoja de Bisturí N°10.
- 2- Recoger los fragmentos y aplicar uno de los 9 métodos de digestión empleados en condiciones de humedad, a 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂.
- 3- Centrifugar a 1000 g durante 2 minutos, recoger el pellet y cultivar en medio de cultivo completo en incubador húmedo a 37°C, 5% CO₂ y 3% O₂.

Para la disgregación con EDTA se empleó como medio Krebs y para las enzimas un medio de cultivo DMEM sin suero con antibióticos (Penicilina 100U/mL y Estreptomicina 100 µg/mL). Se emplearon 9 métodos para la digestión de la pulpa dental:

1. Disgregación mecánica de la pulpa dental
2. EDTA 2mg/mL 30 minutos,
3. Colagenasa I 2mg/mL 90 minutos,
4. Colagenasa I 1mg/mL 13 horas,
5. EDTA 2mg/mL 10 min y Colagenasa I 2mg/mL 90 minutos,
6. EDTA 2mg/mL 10 minutos; [Colagenasa I 2mg/mL + Dispasa II 4mg/mL] 40 minutos,
7. EDTA 2mg/mL 10 minutos; [Colagenasa I 4mg/mL + Dispasa II 4mg/mL] 40 minutos; sonicar en baño a 37°C 1 minuto,
8. EDTA 2mg/ml 10 minutos; [Colagenasa I 4mg/mL + Dispasa II 4mg/mL + termolisina 13ng/mL 40 minutos]; sonicar en baño a 37°C 1 minuto,

9. Termolisina 13ng/mL 40 minutos

El medio de cultivo fue cambiado a los 7 días. Cuando el cultivo primario llega a la confluencia, se hacía el pase. Las CMPD se consideran como aisladas cuando se observaban desde el microscopio óptico células pegadas con forma de fibroblastos (Friedenstein, Chailakhjan et al. 1970).

2.3 Caracterización de las células madre mesenquimales de la pulpa dental mediante microscopía confocal

El estudio de microscopía confocal lo realizamos con una unidad de barrido láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica SA, Mannheim) con un láser de argón y otro de neón-helio unido a un microscopio invertido de Leica DM1RB. Utilizamos placas Lab-Tek de la empresa Nalge Nunk International, previamente tratadas con poly-L-lisina (Sigma Aldrich Química).

Se coloca la poly-L-lisina al 0,01% previamente 6h horas antes de la siembra manteniendo las placas en estufa a 37°C. Posteriormente se realizan dos lavados con PBS previo a la siembra de las células madre de la pulpa dental. La poly-L-lisina (PLL) es un polímero que proporciona una óptima densidad de sitios de adhesión para las células (Mazia, Schatten et al. 1975). Este aminoácido catiónico se extiende como una monocapa sobre la superficie del plástico o de vidrio y cambia su carga de una negativa a positiva, la cual está disponible para la atracción de entidades negativamente cargadas, en este caso las células (Pachmann and Leibold 1976).

Usamos 20.000 células/cm² que se incuban en 2mL de medio. Los anticuerpos primarios usados para caracterizar las células madre mesenquimales de la pulpa dental son:

- Anti-CD133 (Prominin-1) (Sigma)
- Anti STRO-1 (MILLIPORE)
- Anti-POU5F1 (Oct4) (Sigma)
- Anti-Nestina, (Sigma)
- Anti-CD34 (Cells Signaling)
- Anti-CD45 (Cells signaling)

Los fluorocromos usados son:

- Anti-Rabbit IgG TRITC conjugado (Sigma)
- Anti-Mouse IgG FITC conjugado (Sigma)

❖ **Reactivos**

- PBS pH 7.4, (Invitrogen)
- Formaldehido al 3.7% (Panreac)
- Glicina 50 mM (sigma)
- Tritón X-100 al 0.25% (FLUKA Biochemika)
- Albumina de suero Bovino (BSA) al 3% (Roche)
- Igepal 0.1% (Sigma)

❖ **Preparación de las muestras**

Todo el proceso se hace a temperatura ambiente excepto las incubaciones con los anticuerpos.

- 1- Lavar las células con PBS atemperado a 37°C.
- 2- Fijar las células con 3,7% Formaldehido en PBS durante 10 minutos
- 3- Lavar 10 min con PBS, neutralizar 10 minutos con 50mM Glicina en PBS y permeabilizar con 0.25% Triton X-100 en PBS 10 minutos.
- 4- Bloquear con 3% BSA en PBS 10 minutos
- 5- Incubar con anticuerpo primario diluido en 3% BSA disuelto en PBS durante 3 horas a 37°C.
- 6- Lavar con 0.1% Igepal en PBS 3 veces (10 minutos cada lavado)
- 7- Incubar con anticuerpo secundario diluido en 3% BSA en PBS durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda y en oscuridad.
- 8- Lavar con PBS 3 veces (10 minutos cada lavado).

2.4 Proliferación de células madre de pulpa dental (CMPD) al 3% ó 21% de O₂

2.4.1 Curva de crecimiento

Se procedió a cultivar las células según lo expuesto en el apartado

2.2.1, condiciones de cultivo, de la presente tesis.

2.4.1.1 Contaje de células

Para contar las células, se procedió de la manera siguiente:

- 1- Lavar la placa 2 veces con PBS pH 7.4 previamente atemperado a 37°C.
- 2- Añadir tripsina (aproximadamente 1mL) a la placa de 25cm² para levantar las células.
- 3- Parar el efecto de la tripsina con medio de cultivo completo y recoger las células levantadas.
- 4- Centrifugar a 1500g durante 3 minutos a temperatura ambiente y resuspender el pellet en medio de cultivo completo DMEM para contar las células usando la cámara de Neubauer.

2.4.1.2 Viabilidad celular

La viabilidad celular es la determinación simultánea de células vivas y muertas mediante marcadores que reconocen uno de los 2 parámetros de viabilidad celular: la actividad de la esterasa intracelular y la integridad de la membrana.

Se emplearon 2 métodos distintos y complementarios: la tinción por exclusión y el ensayo MTT.

➤ Tinción por exclusión

Para determinar la viabilidad en las curvas de crecimiento de las células, utilizamos un colorante básico, el azul tripano. El azul tripano es una diamina, derivada de la toluidina, una de las diversas bases isómeras de fórmula $C_{14}H_{16}N_2$, derivadas del tolueno. Éste reacciona con los grupos aniónicos de los componentes texturales, que son los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), los grupos sulfato de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilo de las proteínas. Las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana; sin embargo, el azul tripano atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio en una cámara Neubauer. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión.

Para determinar la viabilidad de las células, se siguió el mismo protocolo de contar las células, se recogió una alícuota de 20 μ L y se diluyó 1:1 con el azul tripano (Fluka Chemika) 0,01% (p/v).

El porcentaje de viabilidad de las células se determina según la siguiente fórmula:

$$\%viabilidad = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ total de células}} \times 100$$

El número total de las células es igual al número de las células vivas más el número de las células muertas.

➤ Ensayo MTT para la viabilidad celular

El MTT es un ensayo que mide la conversión de MTT (*dimethylthiazol-diphenyl tetrazolium bromide*), la sal amarilla e hidrosoluble, en formazán, cristales púrpuras insolubles mediante las NAD-deshidrogenasas presentes en las células.

Las células se incuban con el reactivo MTT 4-6h, durante este tiempo se forman los cristales de púrpura de formazán por las células viables. El producto insoluble se solubiliza por dimethylsulfoxido y la actividad deshidrogenasa se mide espectrofotométricamente mediante la absorbancia a 570nm.

- **Reactivos**

Reactivo MTT al 10%

5mg/mL MTT en PBS, filtrar con filtro con diámetro 0.2mm.
Guardar a -20°C

- **Preparación de las muestras**

- 1- Sembrar las células en placa de 96 pocillos en grupos de: controles, controles positivos (H₂O₂) y tratamientos.
- 2- Cuando las células alcanzan un estado de confluencia, aplicar los tratamientos de las células en el medio de cultivo completo 1g/L con 10% de SBF.

- **Procedimiento**

- 1- Recoger el medio con los tratamientos y añadir 100 µL del reactivo MTT 10%, dejar incubar 4h en un incubador al 5% CO₂, 37°C.
- 2- Recoger el reactivo MTT y añadir 50 µL DMSO.

3- Dejar agitar durante 10 minutos hasta que se disuelvan los cristales purpura de formazán.

- **Cálculos**

Este ensayo no tiene una curva estándar. Se usa la absorbancia obtenida para calcular el porcentaje de viabilidad celular de los tratamientos aplicados a las células frente a los controles asumiéndolos cómo el 100% de viabilidad.

2.4.1.3 Elaboración de la curva de proliferación

Para la construcción de la curva de proliferación de las CMPD, se contó el número total de las células por cada frasco y se determinó la viabilidad celular a 6h, 1, 2, 3, 5, 7 y 8 días de cultivo. Los datos se introdujeron en una página “Excel”, en la cual se combinaron la media del número total de las células por cada frasco con los días de cultivo correspondientes.

2.5 Parámetros de estrés oxidativo

2.5.1 Determinación de MDA

❖ Fundamento

El malondialdehído (MDA) es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos principalmente en las membranas biológicas y que es capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez y, por tanto, un aumento de su rigidez y, por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica. En la reacción del ensayo una molécula de MDA reaccionará con 2 moléculas de ácido

tiobarbitúrico (TBA) produciendo un cromógeno rosado con un máximo de absorción entre 535nm. Los resultados obtenidos se expresarán por mg de proteína total.

❖ **Recogida de muestras**

Como mínimo 3×10^5 células debe suspenderse en 1 ml de Kpi 0.1M, EDTA 1 mM, pH=7.0. No hay que centrifugar esta solución.

❖ **Reactivos**

- Tampón Acetato Sódico anhidro 2M, pH 3,5, con TBA 0.2%. Para preparar 1L se toman 119 mL de ácido acético glacial (pureza 98%) y se le añaden a unos 600 mL de agua “mili-Q”. Se ajusta el pH hasta 3,5 con NaOH 10 M. A continuación se añade a la solución 2 g de ácido tiobarbitúrico y se mantienen en agitación, a 50-60°C, hasta la total disolución del TBA. Se comprobará que el pH se mantiene y, si no es así, se volverá a ajustar. Finalmente se afora el volumen a 1litro y se guarda protegido de la luz a 4°C.
- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 6,8: Para 500 mL se pesan 3,4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con KOH (1 M) hasta 6,8 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará a 4° C.
- Tampón KH_2PO_4 50 mM, pH 3,5: Para 500 ml se pesan 3,4 g de KH_2PO_4 y se añaden a unos 400 mL de agua; se ajusta el pH con HCl (1 M) hasta 3,5 y se afora con agua hasta el volumen final. Se guardará también a 4° C.

❖ **Preparación de los patrones:**

Dado que la identificación y cuantificación del MDA de las muestras analizadas se llevará a cabo gracias a una curva patrón, previamente al ensayo habrá que proceder a prepararla:

1 - Partimos de una solución comercial de MDA-bis (Merck) que está a una concentración de 12,2 M y la diluimos para obtener una solución inicial 10 mM.

2 - Diluimos la solución anterior 1:2, para obtener una solución 5 mM, a partir de la cual conseguimos los siguientes puntos para nuestra “Recta patrón”:

- 50 μ M (diluimos 1:100 la solución 5mM de MDA)
- 25 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- 12,5 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- 5 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- 2,5 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- 1,25 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- 0,625 μ M (diluir 1:2 la solución anterior)
- Blanco: (sólo agua mili-Q)

❖ **Procedimiento de derivatización:**

Todas las muestras las preparamos en tubos eppendorf.

1. A 500 μL del tampón acetato Sódico anhidro 2M, pH 3,5, con TBA 0.2%, se le añaden 20 μL de la suspensión de células y de la misma forma se trata a cada uno de los patrones. Hay que destacar que las muestras de cultivos celulares deben de resuspender previamente en 25 μl de Kpi 50 mM, EDTA 0,1 mM y pH 7,4
2. Incubar durante 60 minutos a una temperatura de 95°C. Es en este paso donde se produce la hidrólisis de los lipoperóxidos y la consiguiente liberación de moléculas de malondialdehido que se conjugan con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), por tanto, lo que se determinará es el aducto MDA-TBA₂, como índice de peroxidación lipídica.
3. Al sacarlas, las muestras deben mantenerse en hielo.
4. Añadir 500 μL del tampón de KH₂PO₄ a pH 6,8 a cada muestra. vortear. Este paso es crítico ya que el aducto MDA-TBA₂ es inestable en el rango de pH neutro-básico, por lo que debe hacerse con rapidez.
5. Centrifugar durante 5 minutos a 13000 g, a 4°C.
6. A 200 μL del sobrenadante añadirle 200 μL del tampón KH₂PO₄ 50 mM, pH 3,5 y vortear.
7. Tomar 300 μL y colocarlos en un vial para realizar el análisis por HPLC.

❖ Preparación de las fases móviles para HPLC

Este es un método isocrático y necesitamos 2 fases diferentes: la “fase de lavado” y la “fase de elución”:

- *Fase de lavado (Fase B)*: está constituida por una mezcla de acetonitrilo/agua al 70%, y el agua del tipo “mili-Q”.

- *Fase de elución (Fase A)*: La sal que contiene esta fase es KH_2PO_4 50mM, pH 6,8. La relación es de 83:17 (sal / acetonitrilo). El modo de preparación es el siguiente:

1. Pesar 13,6g de KH_2PO_4 y disolverlos en unos 1800 ml de “agua mili-Q”

2. Ajustar el pH de esta disolución con KOH 1M.

3. Enrasar hasta 2000 mL.

4. Añadir 410 mL de acetonitrilo. Esta solución debe homogenizarse bien. La solución debe filtrarse, mediante bomba de vacío y filtro de 0,22 μm (Millipore).

Antes de pasar por el HPLC, ambas fases deben desgasificar por baño de ultrasonidos unos 20 minutos.

❖ Condiciones cromatográficas

- Flujo de las fases: 1.0 mL/min

- Detección en HPLC: se utiliza el detector UV-vis a 532 nm.

- Columna: C16 5 μm 120Å (4,6x150mm)

❖ Método cromatográfico

Al ser un método isocrático, sólo necesitamos programar el tiempo que va a estar pasando cada una de las fases líquidas correspondientes. Un cromatograma conlleva unos 30 minutos y la secuencia de las fases móviles a través del HPLC es la siguiente:

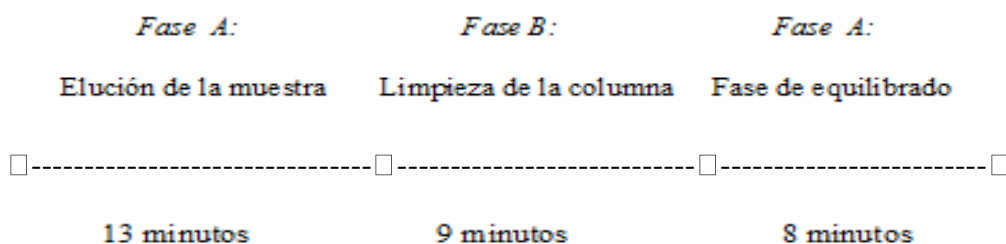


Figura III.2 Programación de la duración (minutos) de las Fases A y B, durante un cromatograma del análisis de Malondialdehído (MDA)

2.6 Determinación de proteínas carboniladas por western blotting

❖ Fundamento

Las proteínas son uno de los objetivos principales de las especies reactivas de oxígeno y de otras especies reactivas. El estrés oxidativo modifica características bioquímicas de las proteínas como la actividad enzimática, la actividad de los factores de transcripción, y la susceptibilidad a la degradación proteolítica. La oxidación de las proteínas por estrés oxidativo modifica la cadena de la metionina, histidina, tirosina y forma puentes disulfuro en cisteína, además al ser catalizada por metales introduce grupos carbonilo (aldehídos y cetones) en los residuos de la lisina, arginina, prolina de manera específica.

La oxidación de las proteínas por las especies reactivas de oxígeno y otras especies reactivas como el hidroxinonal, ocurre en procesos fisiológicos como patológicos. Como consecuencia de esta oxidación, los grupos carbonilos están introducidos en la cadena proteica de manera específica.

El kit Oxy Blot provee una sensible inmunodetección de estos grupos carbonilo lo cual es un marcador del estatus oxidativo de las proteínas. Para ello, estos grupos se derivatizan para formar *2,4-dinitrophenylhydrazone* (DNP-*hydrazone*) mediante la reacción con *2,4-dinitrophenylhidrazine* (DNPH). Las proteínas derivatizadas se pueden detectar posteriormente mediante un anticuerpo específico por Western Blotting.

2.6.1 Extracción de proteínas

❖ Reactivos

Al cultivo celular en una placa de T-25 se le añade 237 μ L el siguiente tampón de lisis:

- 83 mL TRIS (76,5mM)/ 10mL glicerol / 2g SDS.
- 3,766 mL del tampón anterior + 40 μ L IP (cóctel inhibidor de proteasas de Sigma)
- Agente reductor DL-*Dithiothreitol* (DTT) 50 mM (Sigma)

❖ Procedimiento

1. Lavar la placa 2 veces con PBS a 4°C.
2. Añadir en cada placa, una vez lavada y sin líquido, 237.5 μ L del tampón de lisis.
3. Incubar en hielo durante 10 minutos.

4. Levantar las células de la placa con un rascador y recoger el volumen en un tubo eppendorf.
5. Incubar durante 10 minutos a 90°C.
6. Recoger una alícuota para la determinación de la concentración de proteínas.
7. Vortear la mezcla y congelar a -20°C.

2.6.2 Preparación de las muestras para medir proteínas oxidadas

Para preparar las muestras, usamos el Kit de Proteínas oxidadas (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit), el cual lleva los reactivos para derivatizar las muestras y los anticuerpos usados en el Western Blotting.

❖ Derivatización

1. Añadir el volumen necesario de la muestra para tener 20 µg de proteína. Si el volumen es inferior ajustar a 5 µl con agua MILLI-Q.
2. Añadir 5 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 12% para una concentración final de 6%. En el caso de que el volumen de la muestra exceda los 5 µl, se corrige añadiendo menor volumen de SDS a mayor concentración.
3. Añadir 10 µl de DNPH a cada muestra. También se prepararán muestras como controles negativos, a los que se añade solución de derivatización control.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Añadir 7,5 µl de la solución de neutralización. Si no se había añadido un agente reductor a la muestra, añadir 1-1.5 µl de 2-mercaptoetanol.

En este punto se carga el gel de poliacrilamida y se sigue con el procedimiento de un western blotting normal. (Ver apartado 2.8 de la presente tesis).

2.7 Cuantificación de proteínas. Método Lowry

En los extractos citosólicos se utilizó el “Protein ASSAY Kit” de la firma Sigma-Aldrich Química. Este kit contiene el reactivo de Lowry y el reactivo de Folin (Lowry, Rosenbrough et al. 1951) (Lowry y Peterson, 1977). El método se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin, dando un complejo coloreado. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molbidoato sódico en ácido fosfórico y clorhídrico.

El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^+ . Este ión, así como los grupos R de los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin, produciéndose inicialmente un producto inestable que se reduce para formar un compuesto coloreado.

La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y es proporcional a la concentración de proteínas de la disolución.

❖ Cálculos

La concentración de una disolución no conocida se calcula extrapolando en una recta patrón de BSA de concentraciones entre 0,01 y 10mg/mL, la absorbancia obtenida a $\lambda=660\text{nm}$.

2.8 Western Blotting

❖ Fundamento

La electroforesis es un transporte bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida, se utiliza para la separación de proteínas. Concretamente se utilizó el PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida) en condiciones desnaturalizantes. Para la realización de esta técnica es imprescindible que las proteínas se encuentren completamente desnaturalizadas. Para ello, utilizamos dos agentes desnaturalizantes, el dodecilsulfato sódico (SDS) como detergente y el β -mercaptoetanol como agente reductor, que provoca la rotura de los puentes disulfuro. De este modo obtenemos proteínas en su estructura primaria.

En presencia de una concentración de SDS superior a 8 mM, las proteínas unen 1.4 g de SDS por gramo de proteínas, lo que equivale a la unión de una molécula de SDS por cada 2 aminoácidos. Las cargas propias de las proteínas quedan así enmascaradas o anuladas. Como cada molécula de SDS proporciona una carga negativa (del grupo SO^-) los complejos proteína/SDS están cargados negativamente de forma uniforme, de forma que la separación depende de la carga y masa molecular de las distintas proteínas.

❖ Condiciones del gel y transferencia

Para detectar las distintas proteínas de ensayo se cargaron 40 μg de proteínas celulares totales en geles al 10 % de Acrilamida (29:1

Acrilamida:Bisacrilamida) con un 0,1% de SDS, sobre los que se aplicó un campo eléctrico de voltaje constante de 20 mAmpérios durante al menos 2 horas en tampón Tris-Glicina (25 mM Tris, 200 mM Glicina, 0,1% SDS, pH 8,3).

Una vez finalizado el desplazamiento electroforético, el gel se transfirió (Blotting) a una membrana de PVDF (*Polyvinylidene difluoride*) (Schelider & Schuel, USA), mediante electrotransferencia en condiciones húmedas, por medio del sistema Mini-protean II (Bio-Rad, USA). El proceso se mantuvo durante 1 hora, a una temperatura de 4°C y una intensidad constante de 280 mAmpérios, en tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM Glicina, Metanol 20% v/v, pH 8,3).

❖ **Marcaje y revelado**

- 1- Tras la transferencia las membranas se incuban 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo: 1% p/v seroalbúmina bovina (BSA).
- 2- Incubar las membranas con el anticuerpo primario, Rabbit Anti-DNP (dilución indicada en el kit) en agitación orbital durante 1 hora. El anticuerpo se disuelve en tampón de bloqueo (BSA 1%; 0.05% Tween-20 en PBS) a la concentración especificada por el Kit.
- 3- Se lavan las membranas con 10mL PBS-Tween 20 al 0.05% durante 5 min 3 veces.
- 4- Las membranas se incuban 1 hora con el anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG (HRP-conjugado). El anticuerpo se

disuelve en tampón de bloqueo a la concentración especificada por el Kit.

- 5- Se realizan 3 lavados de 5 minutos con 10 mL de PBS-T en agitación.
- 6- La membrana se incuba 1 minuto con el reactivo ECL (Amersham Pharmacia, USA) (Figura III.3) e inmediatamente se revela con una detector quimioluminiscente, mediante el programa Image Reader V4.0 de FUJIFILM.

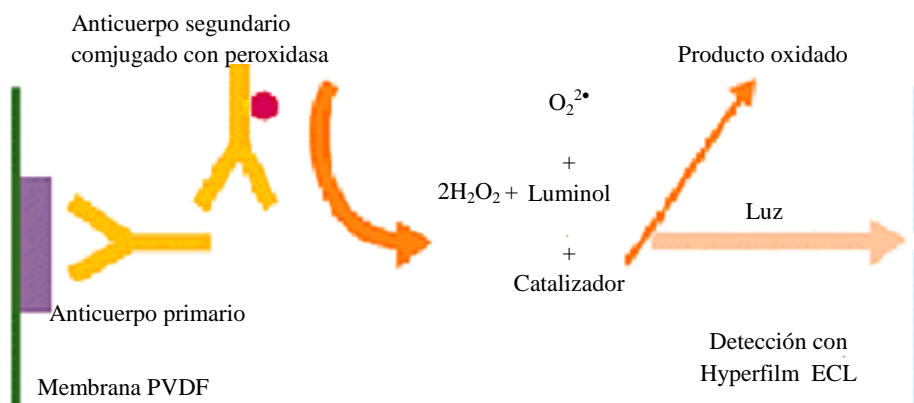


Figura III.3 Mecanismo de acción del reactivo ECL La membrana se empapa brevemente en el reactivo de detección. Esto induce una oxidación de luminol catalizada por la peroxidasa y una posterior chemiluminiscencia.

❖ Cuantificación de los resultados

Se realizó la densitometría de las imágenes obtenidas utilizando el software de Image Gauge V4.0.

2.9 Aspectos morfológicos mediante microscopía electrónica

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra la muestra, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones.

El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características. Por último, todos los microscopios electrónicos cuentan con un sistema que registra o muestra la imagen que producen los electrones.

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) permite la observación de muestra en cortes ultrafinos. Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de angstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada.

Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

2.9.1 Preparación de las muestras

- 1- Se coloca la poly-L-lisina al 0,01% previamente 6h horas antes de la siembra manteniendo las placas en estufa a 37°C. Usamos 10.000 células/cm² que se incuban en 2mL de medio.
- 2- Una vez las células alcanzan la confluencia, se procede a la fijación de las células.

2.9.2 Fijación

❖ Procedimiento

1. Sacar el cultivo del incubador y retirar el medio, sustituyéndolo por PB 0,1M atemperado y cambiar a los 2 minutos. Repetir tres veces. Lavamos así el medio completamente que normalmente precipita con el fijador.
2. Añadir glutaraldehido al 3.5% en PB 0.1 M atemperado y meter en estufa (no en el incubador, que los vapores del glutaraldehido son muy tóxicos y pueden dañar los cultivos) a 37 °C durante 35 a 40 minutos. Tapar la placa de cultivo y sellar con parafilm.
3. Retirar el glutaraldehido y lavar con PB 0,1M, dos o tres veces.
4. Retirar el PB y añadir unas gotas de AGAR al 0.5-1% (para que se deposite una capa fina de agar, como protector).
5. Una vez solidificado (2 minutos o menos) añadir PB 0.1M
6. Cambiar el PB 0.1M por PB 0.1M azida 0.05%.

2.9.3 Inclusión en araldita

1. Lavar en PB 0,1M (5X5min)
2. Fijación y contraste (1 h 30min): osmio 1% en oscuridad y agitación.
3. Lavar con H₂O (3X5min)
4. Deshidratar: Alcohol 30° (5 min)
Alcohol 50° (5 min)
Alcohol 70° (10 min)
5. Lavar en acetato de uranilo 2% en alcohol de 70° (2h) a 4°C (se disuelve con ultrasonidos)
6. Deshidratar: Alcohol 70° (2x5 min)
Alcohol 96° (2x5 min)
Alcohol 100° (2x5 min)
Alcohol 100° seco (10 min)
7. Mezclar EtOH 100° con araldita en proporción 3:1 (30 min)
8. Mezclar EtOH 100° con araldita en proporción 1:1 (30 min)
9. Mezclar EtOH 100° con araldita en proporción 1:3 (30min)
10. Realizar varios cambios de araldita pura. Dejar toda la noche y al día siguiente realizar otros 2 cambios de araldita pura. Polimerizar.

2.10 Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico se ha usado el programa IBM SPSS statistics, en su versión 19. Se ha tomado un intervalo de confianza al 95% ($p= 0.05$) para aceptar que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos.

Se ha usado la prueba T de Student para comparar 2 medias, y el análisis de varianza (ANOVA) en el caso de que se comparen más de 2

medias con un factor de variación. Si la n de los grupos a comparar no es igual en todos ellos se ha usado la comparación de Scheffé. En el caso de que la n de los grupos a comparar sea igual en todos ellos dependerá de la prueba de homogeneidad de las varianzas (Prueba de Levene). Si no es significativa se ha usado la comparación post-hoc de Tukey, si es significativa la de Games-Howell.

ANEXO I

Clínica Odontológica, Unidad de Cirugía

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Le invitamos a participar en el presente estudio sobre la obtención de células madre de pulpa dental que se está llevando a cabo en la Universidad de Valencia. Podrá hablar con el investigador para aclarar sus dudas y si decide no participar en el estudio, esto no afectará de ninguna manera a la calidad de su tratamiento odontológico.

Objetivos del estudio:

- Obtener células madre de pulpa dental.
- Mejorar el método de obtención de estas células.
- Estudiar la interacción de las células con biomateriales de regeneración ósea.

Tratamiento del estudio: Durante el estudio, se registraran datos referentes a su historia médica (edad, sexo), así como a las características clínicas del diente a extraer.

Posibles riesgos: No existen riesgos para el paciente asociados a este estudio

Participación voluntaria: Puede retirarse del estudio en cualquier momento sin tener que ofrecer explicación alguna sobre sus razones. El abandono del estudio no condicionara en absoluto los tratamientos odontológicos en el futuro.

Confidencialidad: Todos los datos referentes a su participación en el estudio se almacenaran y analizarán en una base de datos electrónica, sin mención expresa de su nombre.

Clínica Odontológica, Departamento de Cirugía

Facultad de Medicina y Odontología

Universidad de Valencia

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre y apellidos.....

Edad.....

Sexo.....

He sido informado/a y acepto libremente entregar mi diente, extraído por motivos ajenos a este estudio, para el cultivo y análisis de las células de la pulpa dental.

Fecha:

Firma:

IV. RESULTADOS

1. Obtención de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ y optimización del método de obtención

En nuestro estudio, hemos conseguido aislar células madre de la pulpa dental (CMPDs) de un total de 110 pacientes, entre 14 y 67 años (31 hombres y 79 mujeres). En 10 de ellos se recogieron pulpas de 2 dientes distintos.

Con el objetivo de mejorar la eficiencia del aislamiento de CMPDs, hemos probado varios métodos de digestión de la pulpa dental, hemos comprobado sus efectos sobre la obtención de las CMPDs en un entorno fisiológico de oxígeno (3% O₂). Las enzimas usadas para la digestión de la pulpa requieren la presencia de zinc y calcio. Por ello, usamos un medio de cultivo DMEM con calcio, bajo suplemento de glucosa 1g/L, sin suero y con antibióticos. Empleamos las siguientes enzimas:

- Colagenasa I: es una metaloproteinasa con la habilidad de hidrolizar el colágeno nativo de triple hélice.
- Dispasas II: es una proteasa que hidroliza la caseína en las tirosinas.
- Termolisina: es una metaloendopeptidasa que hidroliza las proteínas en el terminal N de los residuos de aminoácidos hidrófobos.

Además, usamos EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) como un quelante de cationes bivalentes en tampón de Krebs antes de digerir el tejido pulpar con las enzimas.

Durante el tiempo de la digestión de la pulpa dental especificado en cada método, la suspensión de los trozos cortados de la pulpa fue guardada en un incubador al 5% CO₂, 3% O₂ a 37°C con agitación periódica.

Los cultivos sembrados después de la digestión de la pulpa dental fueron observados diariamente en el microscopio durante 2 semanas para determinar el tiempo de la obtención de las células madre.

Consideramos que se obtiene un resultado positivo cuando se observan células pegadas con forma de fibroblastos.

1. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con disgregación mecánica

Se cultivaron 6 pulpas con este método. Los cultivos fueron observados cada 3 días durante 3 semanas. No se observó crecimiento de CMPDs durante este periodo. Por lo cual, el porcentaje de obtención fue del 0 %.

2. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con EDTA 2 mg/mL durante 30 minutos

Se cultivaron 4 pulpas y en 2 casos se observó crecimiento de células madre en 7 días (Figura IV.1.A). Sin embargo, no hubo crecimiento de células madre de pulpas de 2 pacientes. El porcentaje de obtención de CMPDs fue por lo tanto del 50 %.

3. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con colagenasa I 2mg/mL durante 90 minutos

Se cultivaron 34 pulpas y se observó crecimiento de CMPDs en 26 casos, entre el día 7 y el día 14 (Figura IV.1.B). En 7 casos, no hubo crecimiento y en un caso, hubo contaminación del cultivo. El porcentaje de obtención de CMPDs fue del 76.4 %.

4. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con colagenasa I 1mg/mL durante 13 horas

Se cultivaron 13 pulpas y se observó crecimiento de CMPDs en 11 casos entre el primer día y el día 10 (Figura IV.1.C). El porcentaje de obtención de CMPD fue del 84.6 %.

5. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con EDTA 2mg/mL durante 10 minutos y colagenasa I 2mg/mL durante 90 minutos

Se cultivaron 7 pulpas y se observó crecimiento de CMPDs en todos los casos entre el día 5 y el día 7 (Figura IV.1.D). El porcentaje de obtención fue del 100 %.

6. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con EDTA 2mg/mL durante 10 minutos, colagenasa I 2mg/ml y dispasa II 4mg/mL durante 90 minutos

Se cultivaron 13 pulpas y se observó crecimiento de CMPDs en 10 casos entre el segundo y el séptimo día (Figura IV.1.E). El porcentaje de obtención fue del 76 %.

7. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con EDTA 2 mg/mL durante 10 minutos, colagenasa I 2mg/mL,

dispa II 4mg/mL durante 40 minutos y sonicar en baño a 37°C durante 1 minuto.

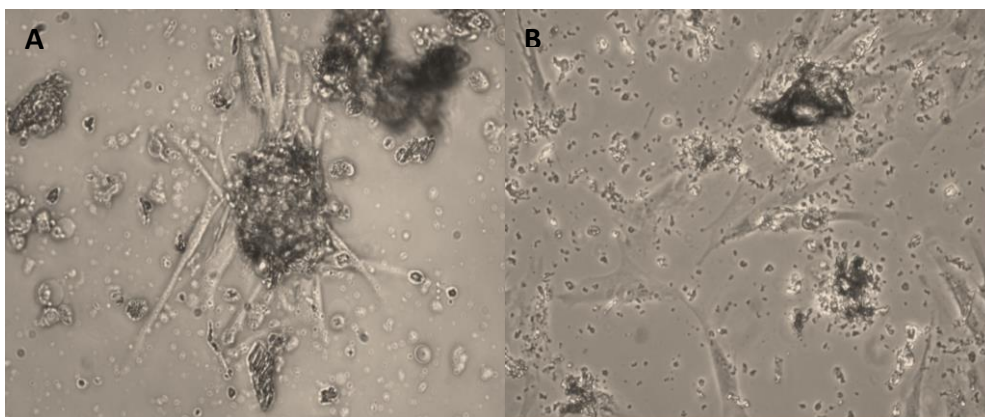
Se cultivaron 24 pulpas y hubo crecimiento de CMPDs en todos los casos entre 13 horas y el séptimo día (Figura IV.1.F). El porcentaje de obtención de CMPDs fue del 100 %.

8. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con EDTA 2mg/mL durante 10 minutos, colagenasa I 2mg/mL, dispa II 4mg/mL, termolisina 13ng/mL durante 40 minutos y sonicar en baño a 37°C durante 1 minuto.

Se cultivaron 16 pulpas y se observó crecimiento en todos los casos entre las 8 horas y las 23 horas (Figura IV.1.G). El porcentaje de obtención fue del 100 %.

9. Obtención de CMPDs realizando la digestión de la pulpa con termolisina 13ng/mL durante 40 minutos

Se cultivaron 3 pulpas y hubo crecimiento de CMPDs en 1 caso a las 20 horas. El porcentaje de obtención de CMPDs fue del 33%.



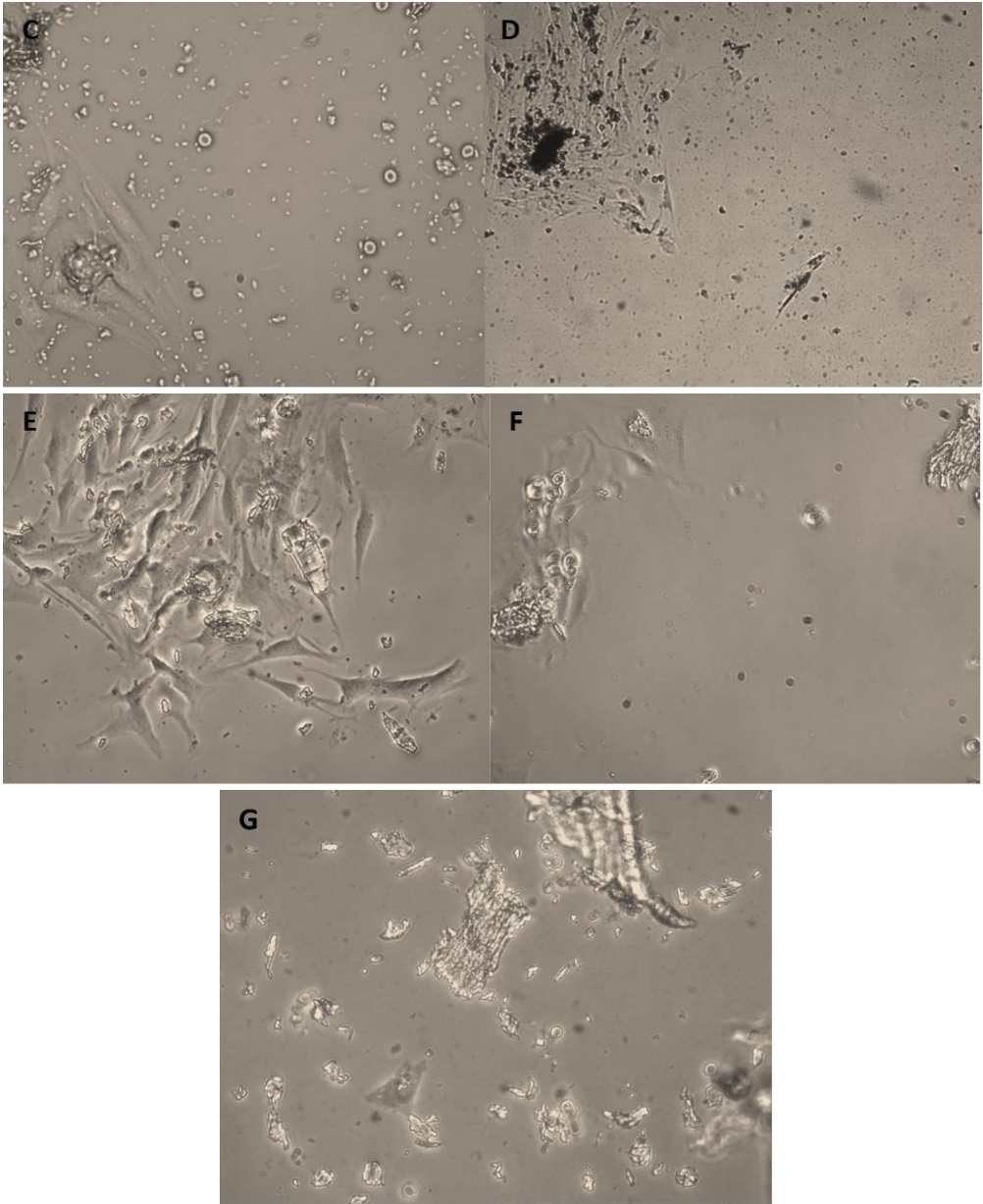


Figura IV. 1 Fotos de cultivos primarios de células madre de la pulpa dental (CMPDs) (40x) obtenidas con cada método empleado.

En nuestro estudio, hemos conseguido reducir el tiempo de obtención de CMPDs de una media de 11 ± 2 días a una media de 15 ± 4 horas.

La tabla IV.1 es el resumen de los métodos empleados para la optimización de la obtención de las CMPDs e incluye: el número del método (detallado debajo de la tabla), el número de las pulpas dentales (N), el tiempo de la digestión de la pulpa en minutos y el porcentaje de obtención de las CMPDs con cada método.

Nº del método	Número de las pulpas dentales (N)	Tiempo de digestión (min)	Tiempo de obtención de CMPDs en días	% de obtención de CMPDs
1	6	---	---	0%
2	4	30	7	50%
3	34	90	11 ± 2	76%
4	13	780	6 ± 4	84%
5	7	100	6 ± 1	100%
6	13	100	5 ± 2	76%
7	24	50	$3,8 \pm 2$	100%
8	16	50	$0,6 (15h) \pm 0,16$	100%
9	3	40	$0,8 (20h)$	33%

Tabla IV.1 Resumen de los métodos empleados para la optimización de la obtención de las CMPDs.

Método 1: Disgregación mecánica.

Método 2: EDTA 2mg/mL 30 min

Método 3: Colagenasa I 2mg/mL 90 min

Método 4: Colagenasa I 1mg/mL 13h

Método 5: EDTA 2mg/mL 10 min + Colagenasa I 2mg/mL 90 min

Método 6: EDTA 2mg/mL 10min + [Colagenasa I 2mg/mL+ Dispasa II 4mg/mL] 90min

Método 7: EDTA 2mg/mL 10 min+ [Colagenasa I 4mg/mL+ Dispasa II 4mg/mL] 40 min + sonicar 1 min a 37°C

Método 8: EDTA 2mg/mL 10 min + [Colagenasa I 4mg/mL+ Dispasa II 4mg/mL+ Termolisina 13ng/mL] 40 min +sonicar 1min a 37°C.

Método 9: Termolisina 13ng/mL 40 min

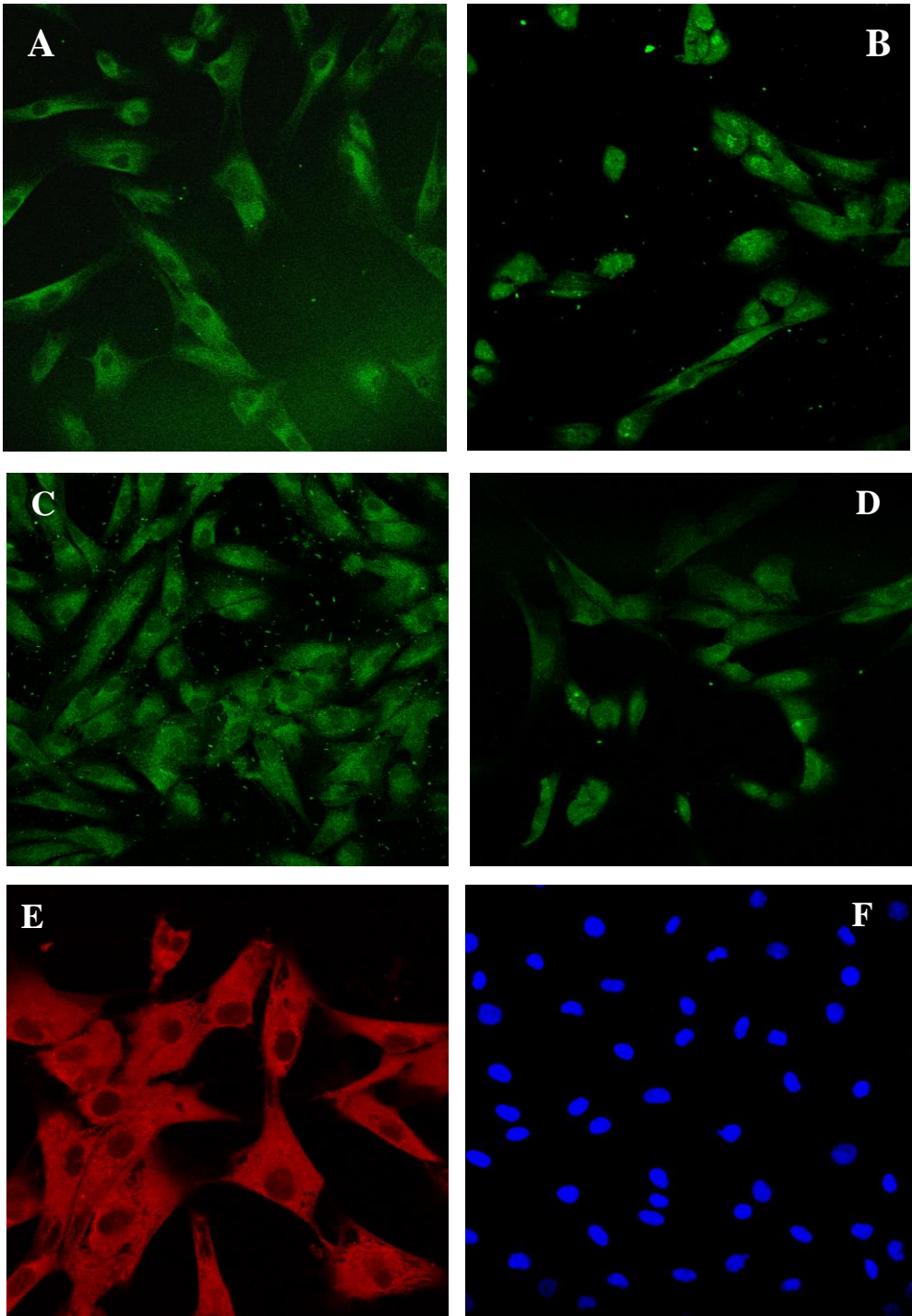
- ✓ Los 9 métodos empleados para optimizar la obtención de CMPDs en la condición fisiológica de oxígeno (3% O₂), mostraron que el método N° 8 usando colagenasa I, dispasa II, termolisina y sonicar, es el método más apropiado. De hecho, este método reduce a un mínimo el tiempo de obtención de las CMPDs (15h ± 4), con un mínimo tiempo de digestión (50 min) y máximo rendimiento (100%). Por tanto ese fue el método de aislamiento utilizado para obtener las células empleadas en la presente tesis.

2. Caracterización de las células madre de la pulpa dental

Con el propósito de comprobar que las células madre obtenidas de la pulpa dental (CMPDs) cumplen los requisitos mínimos para que se puedan llamar células madre mesenquimales, las caracterizamos con una serie de marcadores. Hay que señalar que no existe ningún marcador que caracterice exclusivamente las CMPDs.

En la presente tesis, se ha confirmado el fenotipo de las células madre de la pulpa dental con 5 marcadores en células de 4 a 6 pases en dos líneas distintas de diferentes pacientes.

Así pues, estas células fueron caracterizadas para los marcadores: STRO1 (Gronthos, Graves et al. 1994), OCT4 (Kerkis, Kerkis et al. 2006); CD34 (Laino, d'Aquino et al. 2005); CD133 (Meregalli, Farini et al. 2010), Nestina (Honda, Hirose et al. 2007) y CD45 (Zhang, Niu et al. 2003) y fueron positivas para los marcadores STRO1, OCT4, CD34, CD133, Nestina y negativas para el marcador CD45 (Ver figura IV.2). Ello concuerda con el hecho de que en la bibliografía se encuentran resultados similares.



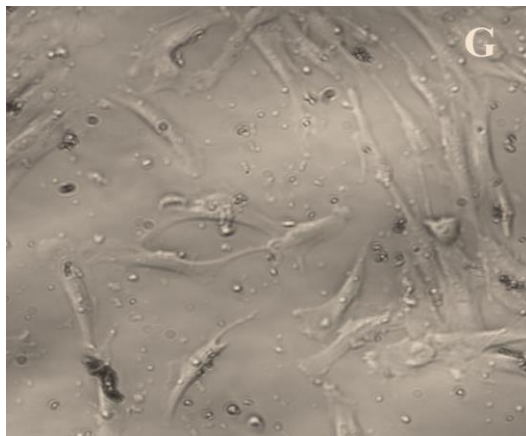


Figura IV. 2 Caracterización de las células madre de pulpa dental mediante la microscopía confocal. (A) Imagen (40x) del marcador STRO-1 B) Imagen (40x) del marcador OCT-4 (C) Imagen (40x) del marcador CD-34 D) Imagen (40x) del marcador Nestina (E) Imagen (40x) del marcador CD-133 F) Imagen (40x) del marcador CD45. (G) Imagen (40x) de las células control.

- ✓ Dados los resultados obtenidos, confirmamos que el fenotipo de las células madre de la pulpa dental que usamos en la presente tesis es de células madre mesenquimales según los datos bibliográficos de los marcadores empleados.

3. Parámetros de estrés oxidativo

Es una práctica común cultivar las células madre en presencia de oxígeno ambiental (~21% O₂), mientras el nivel de oxígeno observado en el entorno fisiológico es a menudo mucho más inferior (3-7% O₂) (Lavrentieva, Majore et al. 2010). En la bibliografía está descrito que las altas concentraciones de oxígeno pueden causar estrés oxidativo vía producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)- los radicales libres que pueden dañar a lípidos, proteínas y DNA, cambiando el metabolismo de la célula en general (Wiseman and Halliwell 1996).

Nos propusimos el objetivo de estudiar los parámetros de estrés oxidativo en la curva de crecimiento de las CMPDs a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo al 3% O₂ o al 21% O₂ en cuanto al daño a proteínas y a los lípidos.

Incluimos también un grupo de células cultivadas al 21% O₂ pero tratadas con un homólogo hidrosoluble de la vitamina E, el trolox a la concentración de 50 μM.

3.1 Daño a proteínas mediante la medición de las proteínas carboniladas

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo (Stadman 1992). Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica.

La figura IV.3 representa la carbonilación de las proteínas en la curva de crecimiento de las CMPDs al 3% O₂, al 21% O₂ o al 21% O₂ con trolox al 50 μM en los tiempos de 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Como podemos observar, la carbonilación de las proteínas es significativamente mayor al 3% O₂ a los 3 y 7 días de cultivo comparada con las células cultivadas al 21% O₂.

Este mismo patrón se repite en los mismos puntos de la curva en la condición de 21% O₂ con trolox al 50 μM. En cuantos a los puntos 1 y 5 días de cultivos, vemos que hay diferencias significativas solo entre las células cultivadas al 3% O₂ y al 21% O₂ con trolox 50 μM.

Por otra parte, podemos observar que en todas las condiciones hay un aumento de la carbonilación proteica que alcanza su máximo a los 5 días de cultivo para las células al 3% O₂ y al 21% O₂, y a los 3 días de cultivo para las células al 21% O₂ con trolox al 50 μM, después vemos que hay una disminución de la carbonilación de las proteínas en estado de confluencia en todas las condiciones (Ver figura IV.3).

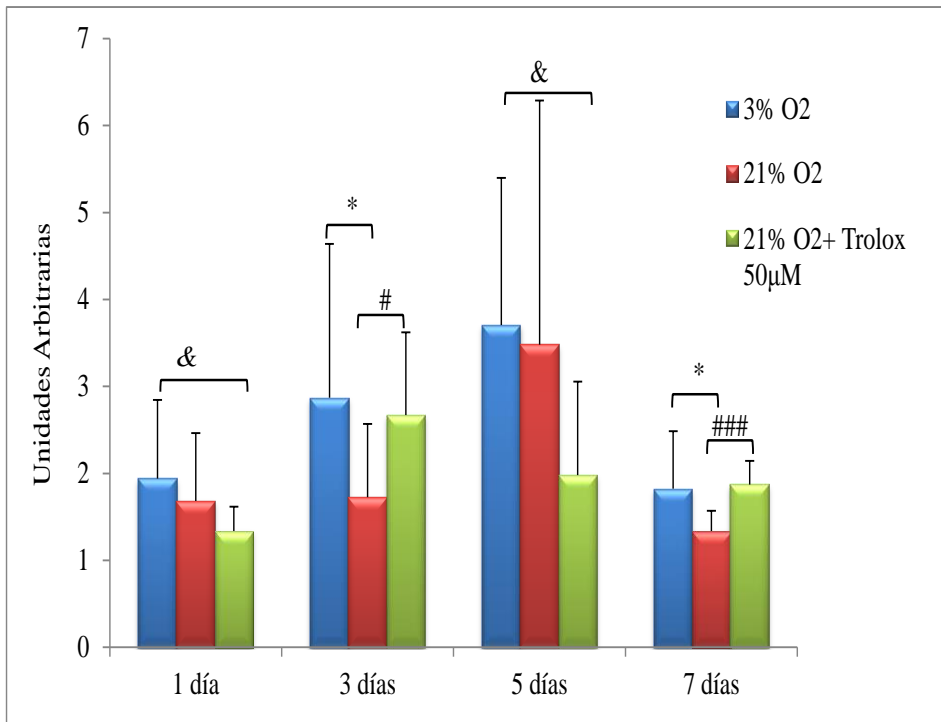


Figura IV. 3 Proteínas carboniladas de CMPDs cultivadas al 3% O₂, 21% O₂ ó 21% O₂ +Trolox al 50 µM a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Los valores de los resultados están representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05; ***p<0.001.

- ✓ Por lo tanto, podríamos concluir que las proteínas carboniladas en las CMPDs son significativamente mayores al 3% O₂ o al 21% O₂ con Trolox al 50 µM en comparación con el 21% O₂ a los 3 y 7 días de cultivos. También, concluimos que las proteínas carboniladas aumentan con la proliferación celular y disminuyen con la confluencia.

3.2 Daño a lípidos mediante la medición de malondialdehído (MDA)

El malondialdehído es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos principalmente en las membranas biológicas. Es capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez, por tanto, un aumento de su rigidez, y por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica.

Como podemos observar en la figura IV.4, los niveles de MDA son significativamente mayores en las CMPDs cultivadas al 21% O₂ con respecto a aquellas cultivadas al 3% O₂ a los 7 días de cultivo. También, los niveles de MDA son significativamente mayores en las CMPDs cultivadas al 21% O₂ en comparación con el 21% O₂ con Trolox (50 μM).

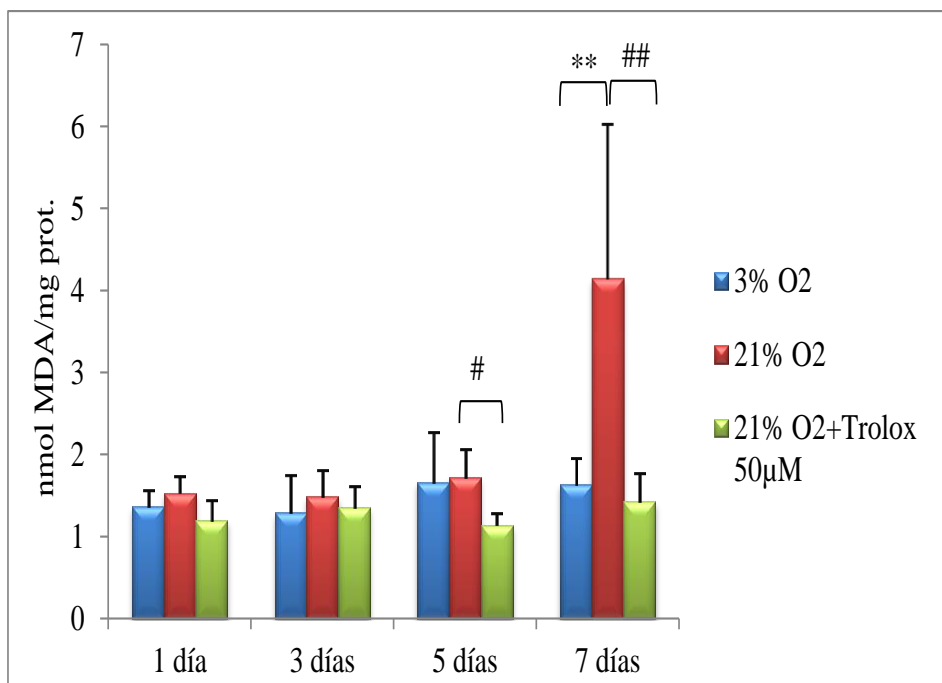


Figura IV. 4 Peroxidación lipídica de CMPDs cultivadas al 3% O₂, 21% O₂ o 21% O₂ +Trolox al 50 μM a 1, 3, 5 y 7 días de cultivo. Los valores de los resultados de la curva de (CMPDs) al 3% O₂, 21% O₂ y 21%O₂+Trolox 50 μM representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se expresa cómo (#) p<0.05; (**) p<0.01

- ✓ Como conclusión, hay diferencias significativas entre la peroxidación lipídica de las CMPDs cultivadas al 3% O₂ o al 21% O₂ a los 7 días de cultivo. A los 5 y 7 días de cultivo, los niveles de MDA son significativamente mayores en las CMPDs al 21% O₂ con respecto al 21% O₂ con Trolox (50 μM).

4. Proliferación de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ o al 21% O₂

4.1 Adhesión de las CMPDs al 3% O₂ o al 21% O₂

La adhesión de las células a la superficie *in vitro* es un parámetro importante a la hora de elaborar una curva de crecimiento de células en general. Sin embargo, hasta ahora, se han estudiado las células madre en distintas presiones parciales de oxígeno en cuanto a la proliferación, pero no en cuanto a la adhesión celular.

La tasa de adhesión celular se puede considerar como la capacidad de recuperación de las células tras el pase de las mismas en condiciones de cultivo y la posterior expresión de las proteínas de adhesión.

En la presente figura IV.5, se puede observar que la tasa de adhesión de las células madre de la pulpa dental al 21% O₂ es significativamente menor (30%) comparada con la condición de oxígeno fisiológica de las células (3% O₂).

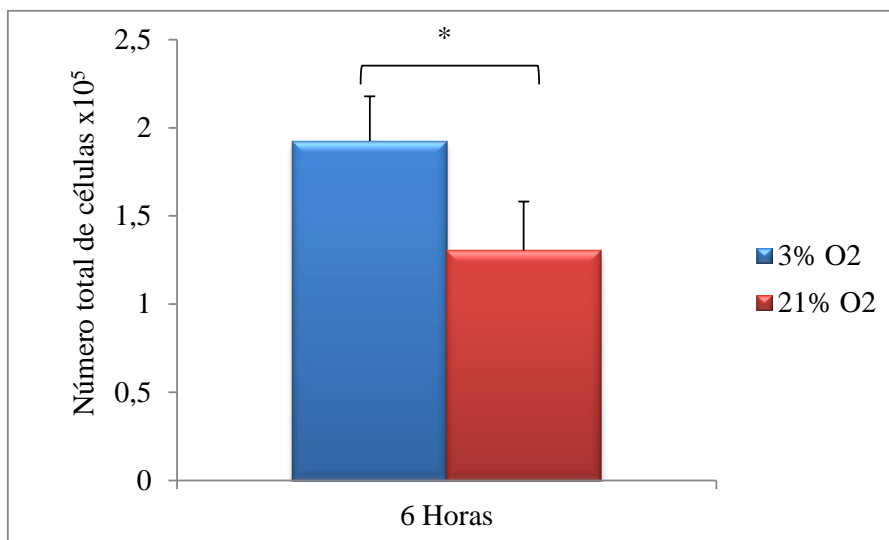


Figura IV. 5 Adhesión de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ o al 21% O₂. Los valores de los resultados de adhesión de CMPDs al 3% O₂ ó 21% O₂ representados como la media del número total de células ± SEM. Cada punto es la media de 4 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05 frente al control (3% O₂).

- ✓ Así pues, podemos decir que la adhesión de las células madre de la pulpa dental está disminuida en condiciones de 21% O₂ al compararla con 3% O₂.

4.2 Curva de proliferación de las CMPDs al 3% O₂ y al 21% O₂

Después de haber estudiado los parámetros de estrés oxidativo en las CMPDs bajo las distintas condiciones de oxígeno, nos propusimos el objetivo de comparar la tasa de proliferación de estas células en estas mismas condiciones.

Con el fin de partir de la misma cantidad de células desde el punto de adhesión (6h), se sembraron el 30% más de células al 21% O₂ y 21%

O₂ con Trolox al 50μM. La proliferación fue evaluada para 7 tiempos de cultivo: 6h, 1, 2, 3, 5, 7 y 8 días.

Como podemos observar en la figura IV.6, el crecimiento de las CMPDs fue significativamente mayor al 3% O₂ que al 21% O₂ en todos los tiempos de cultivo. El trolox revirtió el efecto del aumento de la presión parcial de oxígeno a los días 3, 5, 7 y 8 días de cultivo. La viabilidad de las células fue más del 90% para todas las condiciones.

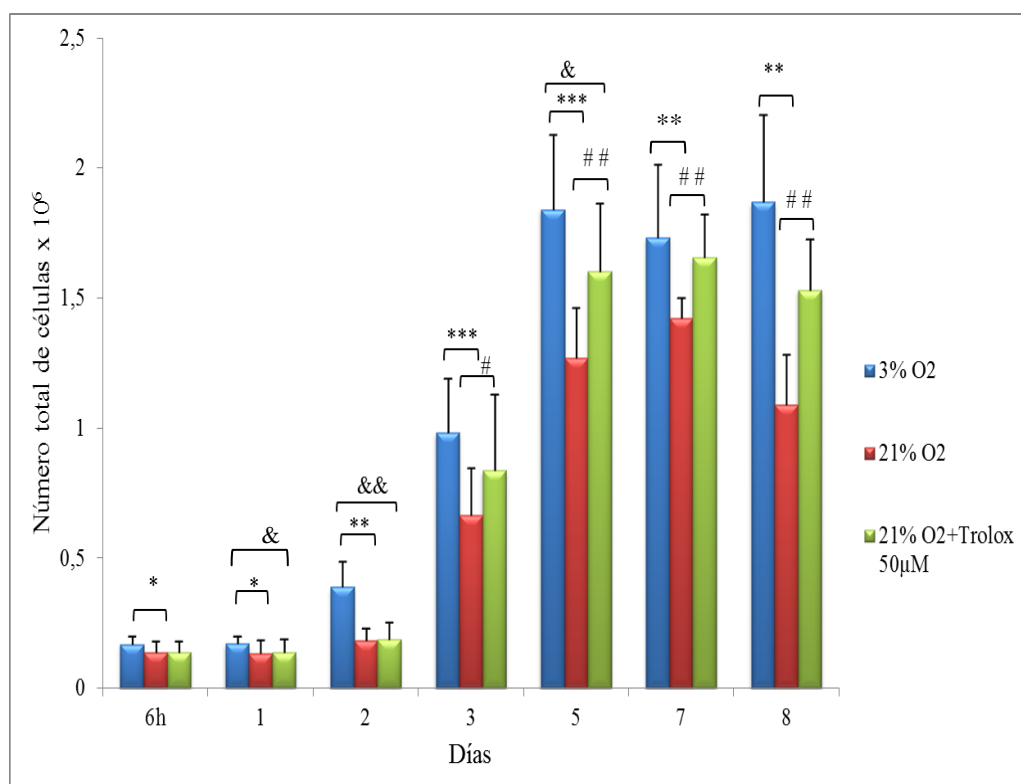


Figura IV. 6 Curva de proliferación de las células madre de la pulpa dental (CMPDs) al 3% O₂, al 21% O₂ o al 21% O₂ +Trolox al 50 μM. Los valores de los resultados de la curva de (CMPDs) al 3% O₂, 21% O₂ y 21%O₂+Trolox 50 μM representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 4 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

- ✓ Por lo tanto, las células madre de la pulpa dental tienen significativamente una mayor tasa de proliferación al 3% O₂ que al 21% O₂ y esta diferencia disminuye parcialmente con el empleo de Trolox al 50μM. Así, el estrés oxidativo juega un papel importante en el crecimiento celular bajo condiciones de hiperoxia.

5. Reguladores del ciclo celular

5.1 Expresión de pp38

La MAP quinasa p38 es una de las principales MAP-quinasas que regulan múltiples procesos biológicos en mamíferos (Ono and Han 2000). Al principio fue identificada como un mediador clave de inflamación y respuestas de estrés oxidativo. Estudios posteriores también implicaron p38 en el ciclo celular y la proliferación, la diferenciación celular y la senescencia (Nebreda and Porras 2000); (Johnson and Lapadat 2002); (Han and Sun 2007). La forma activa de p38 es la p38 fosforilada y como hemos señalado se activa como un mediador clave en la respuesta inflamatoria y frente al estrés oxidativo.

La figura IV.7 nos indica que la fosforilación de la proteína p38 es significativamente mayor al 21% O₂ en comparación con aquellas cultivadas al 3% O₂ y al 21% O₂ con el trolox al 50 μM a los 5 y 7 días de cultivo.

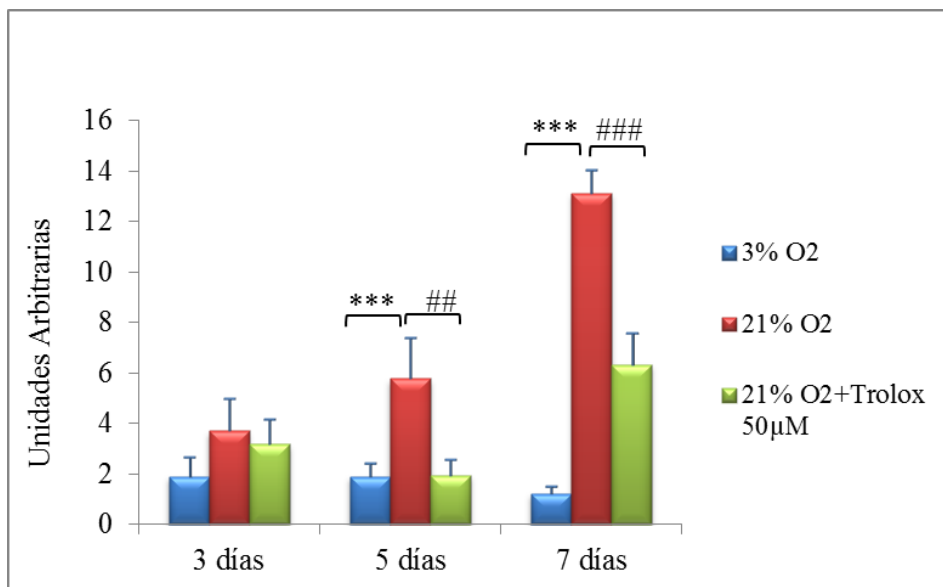


Figura IV. 7 Fosforilación de la proteína p38 en la curva de crecimiento de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂, al 21% O₂ o al 21% O₂ +Trolox al 50 μM a los 3, 5 y 7 días de cultivo. Los valores de los resultados son representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001

- ✓ Por lo tanto, podemos decir que pp38 es un posible mecanismo regulador del ciclo celular mediado por estrés oxidativo en las condiciones de 3% O₂, 21% O₂ y 21% O₂ con Trolox al 50 μM.

5.2 Expresión de la proteína p21^{Waf1/Cip1} mediante Western blotting

p21^{Waf1/Cip1} es una proteína que pertenece a la familia Cip/Kip de inhibidores de las quinasas dependiente de las ciclinas (CDKIs) (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip1}) (Ball 1997).

p21^{Waf1/Cip1} funciona como un punto de control en el ciclo celular inhibiendo las CDKs en las interfases G1/S y G2/M (Bates, Ryan et al. 1998), bloquea al complejo ciclina E-CDK2, previniendo la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Costanzi-Strauss, Strauss et al. 1998). Cuando esto ocurre, el E2F está bloqueado y el ciclo celular se detiene en la interfase G1/S (Dotto 2000).

Asimismo, p21^{Waf1/Cip1} regula varios procesos celulares aparte del ciclo celular, como la replicación y la reparación del DNA, la proliferación celular, la senescencia y la apoptosis (Dotto 2000); (Gartel and Tyner 2002); (Li, Waga et al. 1994); (O'Reilly 2005). En respuesta al estrés oxidativo, p21^{Cip1/WAF1} se sobre expresa para promover la supervivencia celular (Esposito, Cuccovillo et al. 1998); (Gartel and Tyner 2002); (O'Reilly, Staversky et al. 2001); (Poon and Hunter 1998).

En la figura IV.8 podemos observar, que la expresión de la proteína p21^{Waf1/Cip1} a los 5 días de cultivo es significativamente mayor en las células cultivadas al 21% O₂ o al 21% O₂ con Trolox al 50 μM con respecto a aquellas cultivadas al 3% O₂. Además, a los 3 días de cultivo, hay una diferencia significativa entre las condiciones 21% O₂ y 21% O₂ con Trolox al 50 μM.

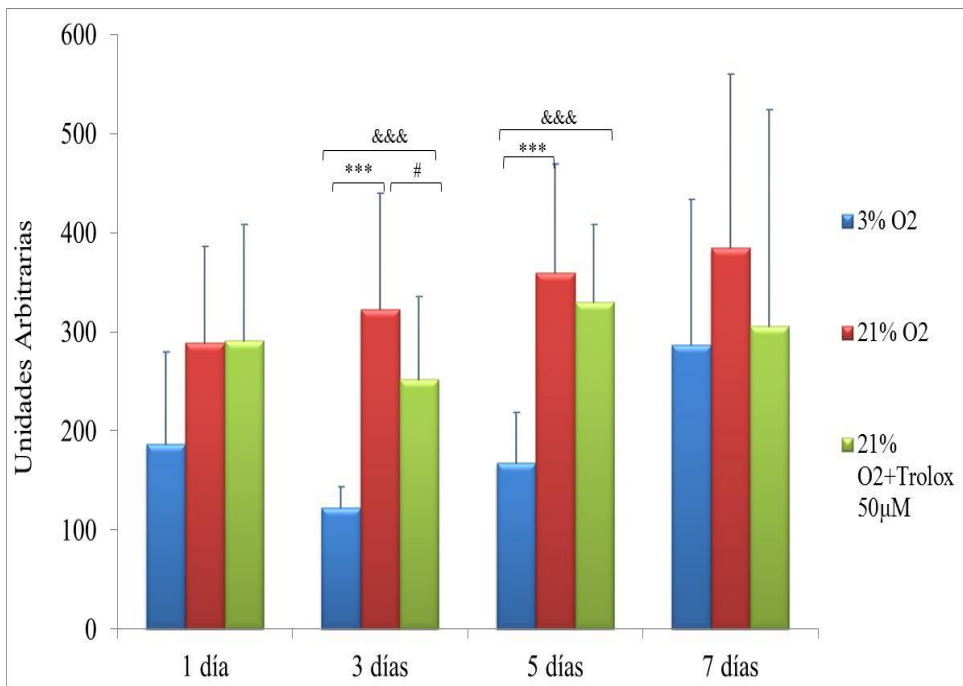


Figura IV. 8 Expresión de p21^{Waf1/Cip1} en la curva de crecimiento de las CMPDs al 3% O₂, al 21% O₂ o al 21% O₂ +Trolox al 50 μM a 1,3, 5 y 7 días de cultivo.

Los valores de los resultados son representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 4 experimentos realizados La significación estadística se expresa como *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

- ✓ Así pues observamos que la expresión de la proteína p21^{Waf1/Cip1} en CMPDs es significativamente mayor al 21% O₂ y al 21% O₂ con Trolox al 50 μM a los 3 y 5 días de cultivo al compararlas con el 3% O₂ y el Trolox al 50 μM no revierte la expresión de p21 en CMPDs al 21% O₂.

6. Defensas frente al estrés oxidativo

6.1 La vía del factor nuclear de transcripción Nrf2

La función normal de la célula requiere un balance estable de oxidación-reducción, por lo que las células eucariotas han elaborado unas defensas antioxidantes endógenas para prevenir el estrés oxidativo. Entre ellas, la vía Nrf2/ARE (*electrophile response element*) ha surgido como un mecanismo de transcripción importante que participa en la regulación de genes antioxidantes y el mantenimiento de la homeostasis en el estado redox celular (Motohashi and Yamamoto 2004). La activación de la vía Nrf2/ARE está modulado por la tensión de oxígeno, ya que en las células microvasculares humanas, la actividad de Nrf2 está elevada con la hiperoxia (Godman, Chheda et al. 2010), (Papaiahgari, Zhang et al. 2006). ARE es un cis-elemento colocado en los genes que codifican las enzimas detoxificantes y las enzimas antioxidantes de la fase II, incluyendo NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1, (NQO1), Glutatión-S-Transferasa (GST), las subunidades del glutamato-cisteína ligasa (GCL), la hemooxigenasa (HO-1), y el transportador de cisteína-glutamato (xCT).

6.1.1 Expresión de la proteína hemo oxigenasa-1 en CMPDs mediante Western Blotting

La proteína inducible hemo oxigenasa-1 (HO-1) cataliza la oxidación del hemo a monóxido de carbono (CO) y biliverdina, que ejerce un efecto protector frente al estrés oxidativo y modula la proliferación celular y la diferenciación (Otterbein and Choi 2000).

Previamente, se ha demostrado que la vía de la HO-1 es un mecanismo clave para la adaptación de las células de la pulpa dental humana y las células del ligamento periodontal a condiciones de estrés y para su recuperación de acontecimientos perjudiciales (Min, Hwang et al. 2006); (Min, Kwon et al. 2006); (Pi, Kim et al. 2007); (Lee, Pi et al. 2007); (Lee, Min et al. 2008); (Kook, Hwang et al. 2009); (Kook, Lee et al. 2009).

Para estudiar la expresión de la hemo oxigenasa como un mecanismo de defensa en las CMPDs, hemos inducido estrés oxidativo al 5% O₂ y al 21% O₂ mediante la disminución de los niveles del glutatión reducido (GSH) en las células. Para conseguir este objetivo tratamos las células en confluencia al 5% O₂ y al 21% O₂ con dietilmaleato (DEM) en concentraciones de 50µM y 100 µM durante 8 horas y 24 horas de cultivo.

La figura IV.9 (A) y (B), nos muestra una mayor expresión de la hemo oxigenasa al 21% O₂ con respecto al 3% O₂ estadísticamente significativa a las 24 horas de incubación con el tratamiento, tanto en las condiciones de control así como con el tratamiento con DEM al 100 µM.

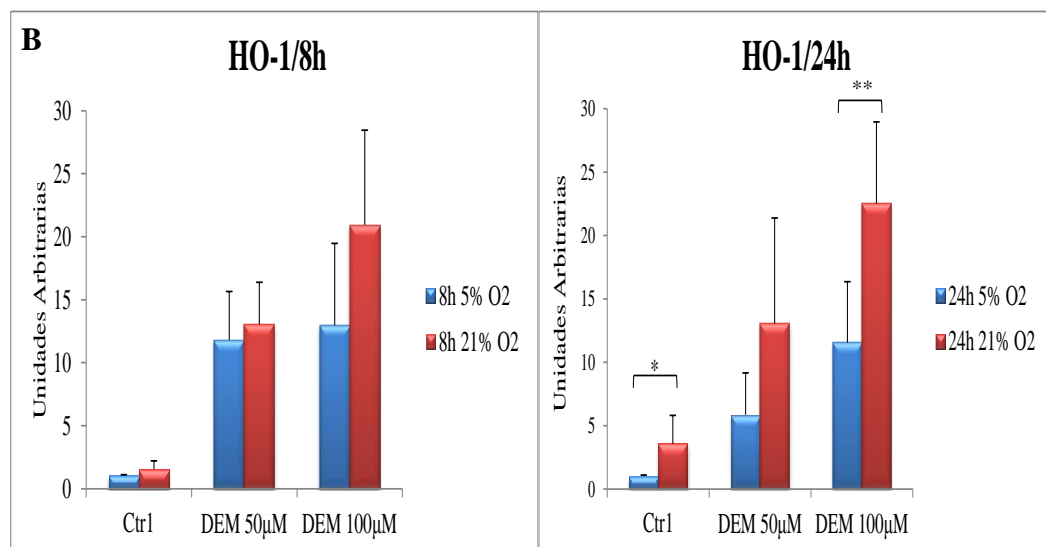
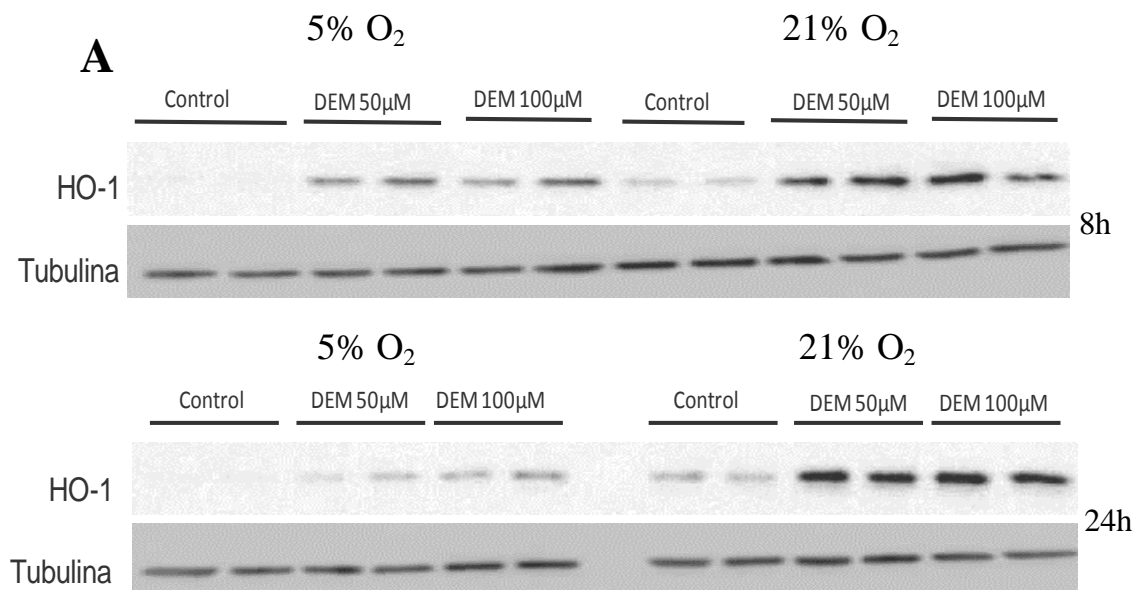


Figura IV. 9 Expresión de HO-1 en las CMPDs al 5% O₂ o al 21% O₂ después del tratamiento con DEM 50µM o 100 µM durante 8h y 24h de cultivo. (A) Imagen representativa (B) Gráfica de la densitometría de los resultados. Los valores de los resultados son representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p < 0.05; **p < 0.01.

- ✓ Por lo tanto, se puede concluir que la expresión de la hemo oxigenasa 1 a las 24h en las CMPDs es significativamente mayor al 21% O₂ que al 5% O₂ tanto a nivel basal como con tratamiento con DEM al 100 μM.

6.1.2 Expresión de la proteína NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1) en CMPDs mediante Western Blotting

Otra proteína que está regulada por la vía Nrf2 es la proteína NQO-1. Esta enzima cataliza la reducción de las quinonas a hidroquinonas, involucrados en la detoxificación de xenobióticos y en la protección de los fosfolípidos de la membrana del daño oxidativo mediante la reducción de la coenzima Q (Kwak, Kensler et al. 2003); (Ross, Kepa et al. 2000); (Venugopal and Jaiswal 1996).

Para estudiar la expresión de la NQO1 como un mecanismo de defensa en las CMPD, también inducimos estrés oxidativo al 5% O₂ y al 21% O₂ tratando las células en confluencia con dietilmaleato (DEM) en concentraciones de 50μM y 100 μM durante 8 horas y 24 horas de cultivo.

La figura IV.10 (A) y (B), nos muestra una mayor expresión de la proteína NQO-1 al 21% O₂ con respecto al 5% O₂ estadísticamente significativa a las 8 horas de incubación en las células control y a las 24 horas tanto en las células control así como con tratamientos con DEM al 50μM y 100μM.

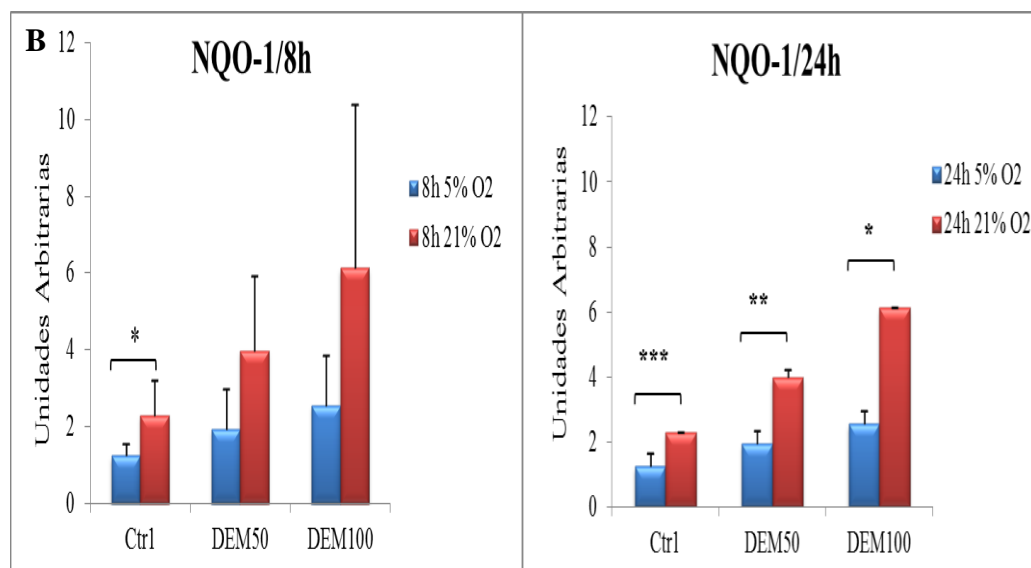
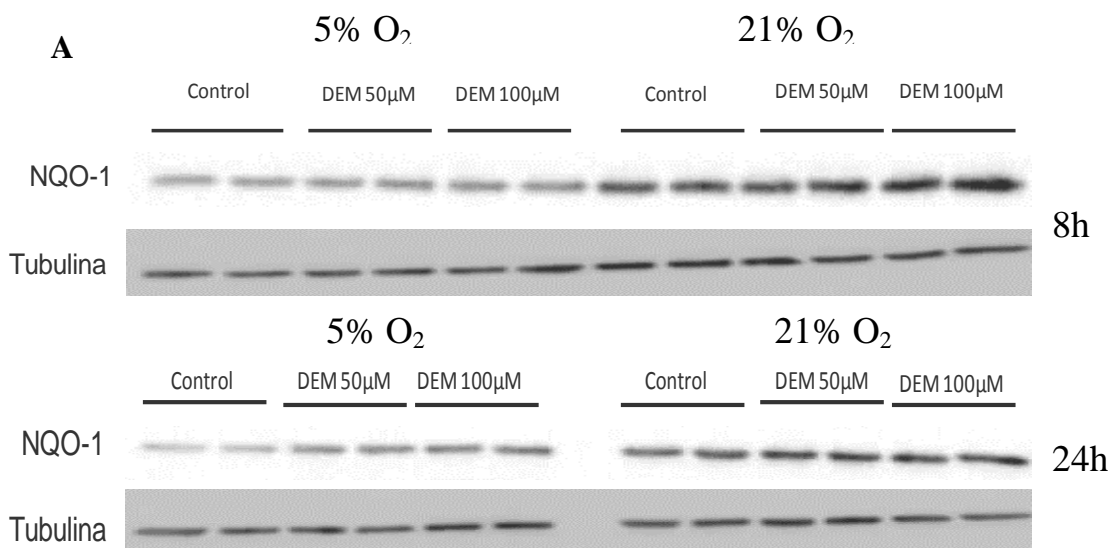


Figura IV. 10 Expresión de la proteína NQO-1 por western blotting en las CMPDs al 5% O₂ o 21% O₂ después del tratamiento con DEM 50µM o 100 µM a las 8h y 24h de cultivo. (A) Imagen representativa (B) Gráfica de la densitometría de los resultados. Los valores de los resultados son representados como la media ± SEM. Cada punto es la media de 3 experimentos realizados. La significación estadística se expresa como *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001.

- ✓ Como conclusión, podemos decir que la expresión de la proteína NQO1 en las CMPDs es significativamente mayor al 21% O₂ que al 5% O₂ tanto a nivel basal como con tratamiento con DEM (50 μM y 100 μM).

6.1.3 Ensayo de viabilidad MTT

El MTT es un ensayo que mide la conversión de MTT (*dimethylthiazol-diphenyl tetrazolium bromide*), la sal amarilla e hidrosoluble, en formazán, cristales púrpuras insolubles mediante las NAD-deshidrogenasas presentes en las células.

Las células se incuban con el reactivo MTT 4-6h, durante este tiempo se forman los cristales de púrpura de formazán por las células viables. El producto insoluble se solubiliza por dimethylsulfóxido y la actividad deshidrogenasa se mide espectrofotométricamente mediante la absorbancia a 570nm.

En la figura IV.11, podemos observar que los tratamientos de las CMPD al 21%O₂ con DEM al 50μM y 100 μM no influyen en la viabilidad de las células en comparación con los controles.

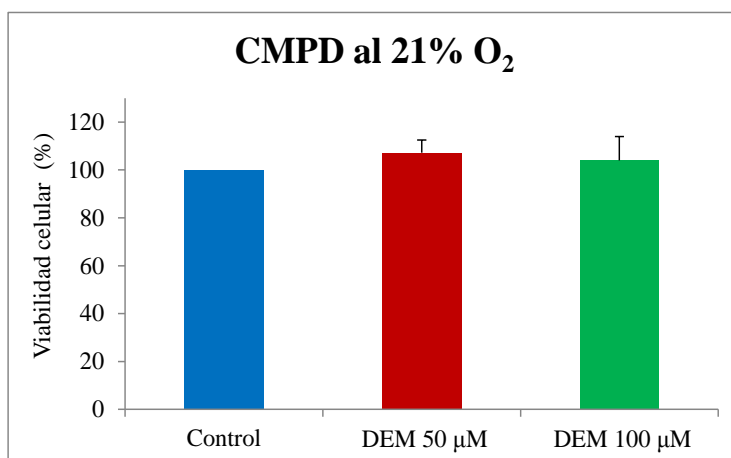


Figura IV. 11 Ensayo de viabilidad MTT en CMPD al 21% O₂ tratadas con DEM al 50μM o 100μM durante 24 horas de cultivo. Cada punto es la media de 3 experimentos. Los valores de los resultados son representados como la media ± SEM.

- ✓ Como conclusión, los tratamientos de las CMPD al 21%O₂ con DEM al 50μM y 100μM no influyen en la viabilidad de las células en comparación con los controles al 21% O₂.

7. Aspectos morfológicos

7.1 Microscopía óptica

Las CMPDs cultivadas al 3% O₂, 21% O₂ o 21% O₂ + trolox al 50 μM fueron estudiadas mediante la microscopía electrónica con respecto a su morfología general. Al cabo de 5 días de cultivo en las distintas condiciones de oxígeno, las células madre fueron fijadas e incluidas para su posterior procesamiento. Los resultados fueron los siguientes:

7.1.1 Células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O₂

En el cultivo de atmósfera a 3% de oxígeno, las células son de un tamaño más reducido que las crecidas en atmósfera al 21% O₂. La membrana plasmática de estas células presenta abundantes expansiones confiriéndole un borde irregular a la célula. En líneas generales, estas células contienen menos vesículas densas (cuerpos densos) que las células cultivadas a 21% O₂. El núcleo de estas células es ovalado y su cromatina laxa. No encontramos mitosis, ya que el cultivo ha llegado a confluencia y el crecimiento se ha paralizado (ver figura IV.12 (A)). En este cultivo encontramos frecuentemente células cuyo citoplasma presenta abundantes expansiones (flechas) y gotas lipídicas en su interior (cabezas de flecha), (ver figura IV.12 (B)). En este caso, y solo para estas células, el núcleo presenta un borde muy irregular. Estas características son frecuentes en los cultivos envejecidos. Ocasionalmente encontramos células de gran tamaño que contienen numerosas vesículas densas (ver figura IV.12 (C)), su núcleo generalmente presenta una forma irregular. Muy ocasionalmente hemos encontrado células binucleadas, es decir, no llevan a cabo la citocinesis. La mayoría, más del 95% son uninucleadas (ver figura IV.12 (D)).

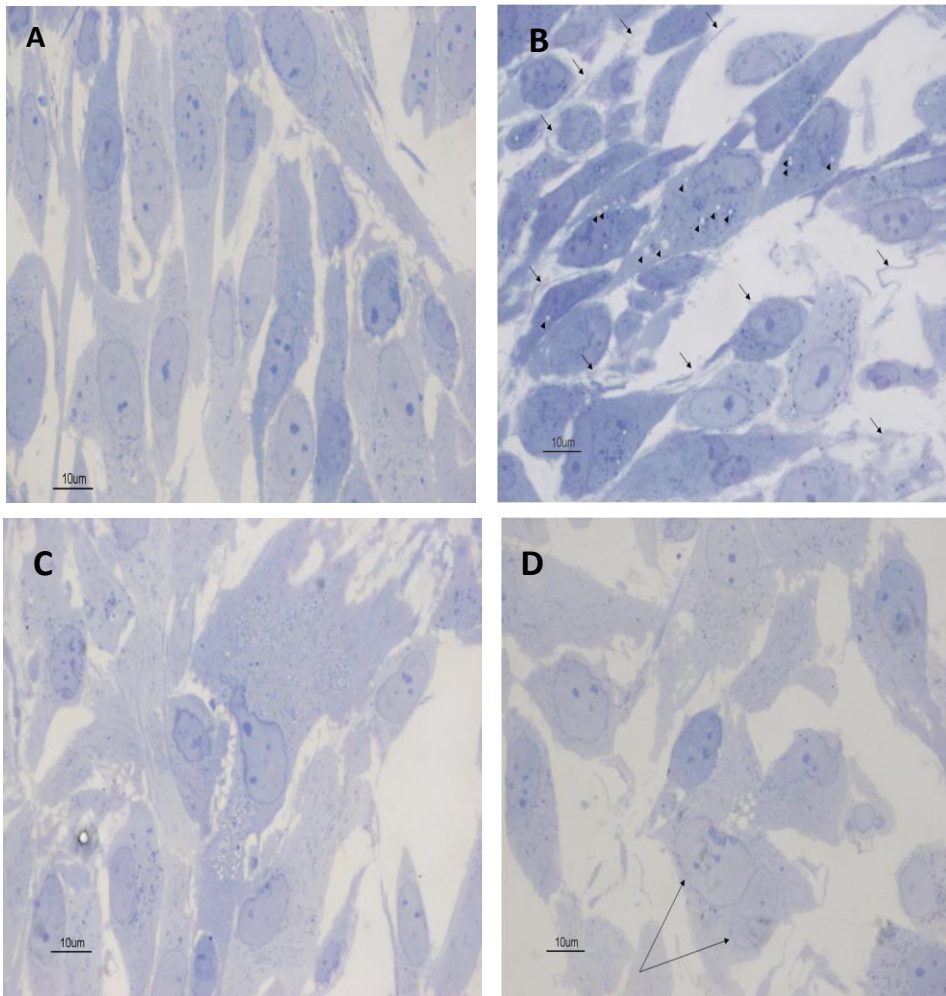


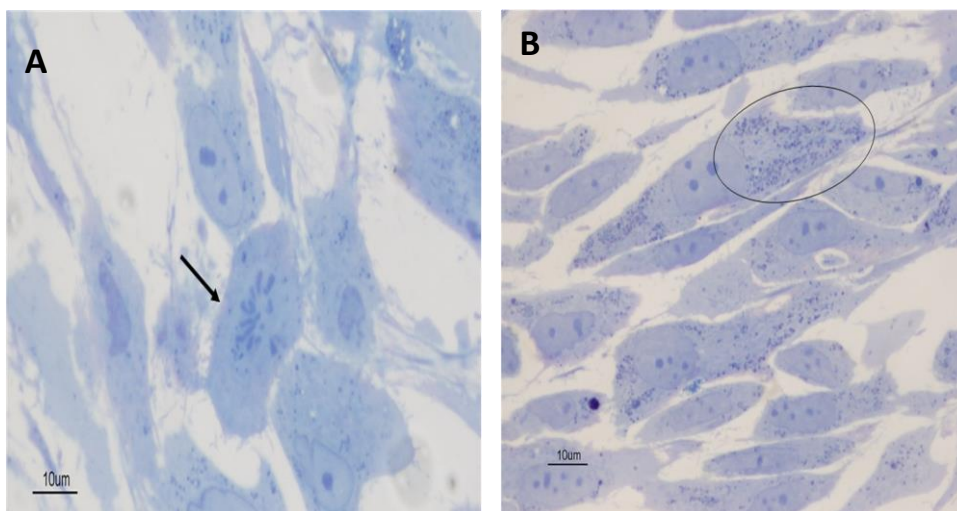
Figura IV. 12 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 3% O₂

7.1.2 Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O₂

En el cultivo en atmósfera al 21% O₂, encontramos numerosas mitosis (flecha negra) (ver figura 13 (A)), ya que todavía no ha llegado a confluencia y se encuentra en fase exponencial del crecimiento. El hecho

de que no se vean mitosis en el 3% es porque su tasa de crecimiento es mayor que a 21% de oxígeno y ya ha llegado a confluencia, se ha saturado el cultivo y el crecimiento se ralentiza indicativo de óptimas condiciones de cultivo.

En el cultivo en atmósfera a 21% O₂, las células alcanzan un mayor tamaño que las células al 3% O₂. En su citoplasma abundan las vesículas densas de pequeño tamaño (ver figura 13 (B)). Sus bordes celulares son regulares, mostrando una menor densidad de expansiones citoplasmáticas que las células al 3% O₂. Los núcleos son ovalados y la cromatina es laxa, pero a diferencia del cultivo al 3% O₂, los núcleos de las células al 21% O₂ presentan bordes regulares. Encontramos más frecuentemente que al 3% O₂, células grandes de citoplasma claro. Éstas son multinucleadas en numerosas ocasiones (ver figura 13 (C)), (flechas). Además, es frecuente encontrarlas envolviendo a otras células (círculo).



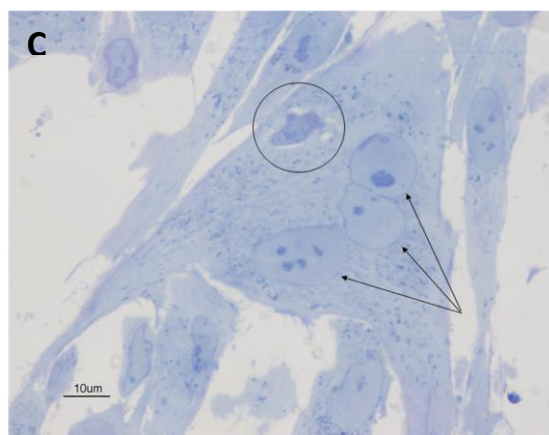


Figura IV. 13 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 21% O₂

7.1.3 Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O₂ con trolox al 50μM

Las células en esta condición también presenta un tamaño mayor a las células cultivadas a 3% O₂. Además, presenta numerosas vesículas densas en su citoplasma. Los núcleos son ovalados de bordes lisos también (ver figura IV.14 (A)). Como en el cultivo al 21% O₂, encontramos más frecuentemente que al 3% de oxígeno, las células grandes de citoplasma claro con abundantes vesículas densas y frecuentemente multinucleadas (ver figura IV.14 (B)). El cultivo en estas condiciones se encuentra en crecimiento exponencial (ver figura IV.14 (C)).

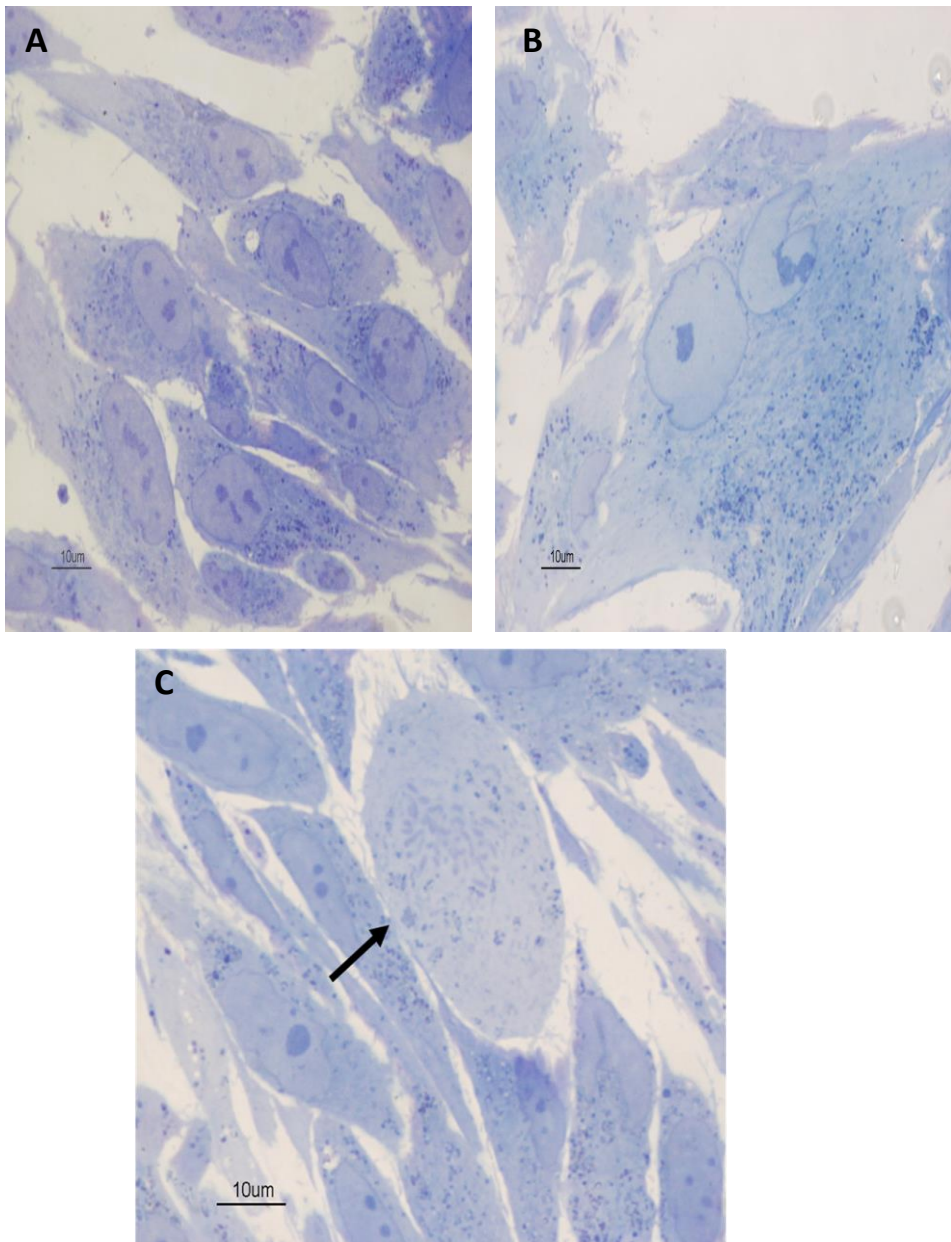


Figura IV. 14 Microscopía óptica de las CMPDs cultivadas al 21% O₂ con trolox al 50µM

7.2 Microscopía electrónica

7.2.1 Células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O₂

Las células madre de la pulpa dental al 3% O₂ presentan un elevado número de gotas lipídicas en sus citoplasmas, característico de los cultivos envejecidos (ver figura IV.15, flechas blancas).

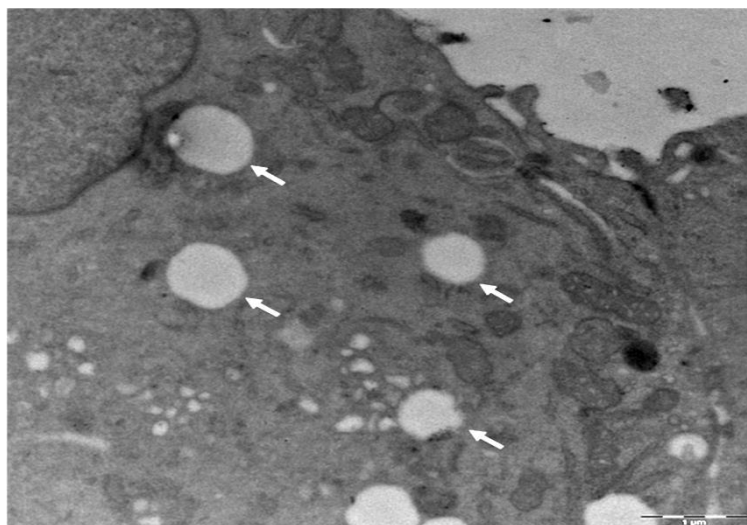


Figura IV. 15 Microscopía electrónica de las CMPDs al 3% O₂

7.2.2 Células madre de la pulpa dental cultivadas al 21% O₂

Las células cultivadas en atmósfera al 21% O₂ contienen en su citoplasma mitocondrias aberrantes, es decir, presentan bordes irregulares y sus crestas se encuentran dilatadas (ver figura IV.16 (A)), flechas blancas). Además, presentan retículos endoplásmicos rugosos muy dilatados (ver figura IV.16 (B), flechas negras). Son abundantes las células que presentan en su citoplasma gran cantidad de lisosomas (ver figura IV.16 (C)).

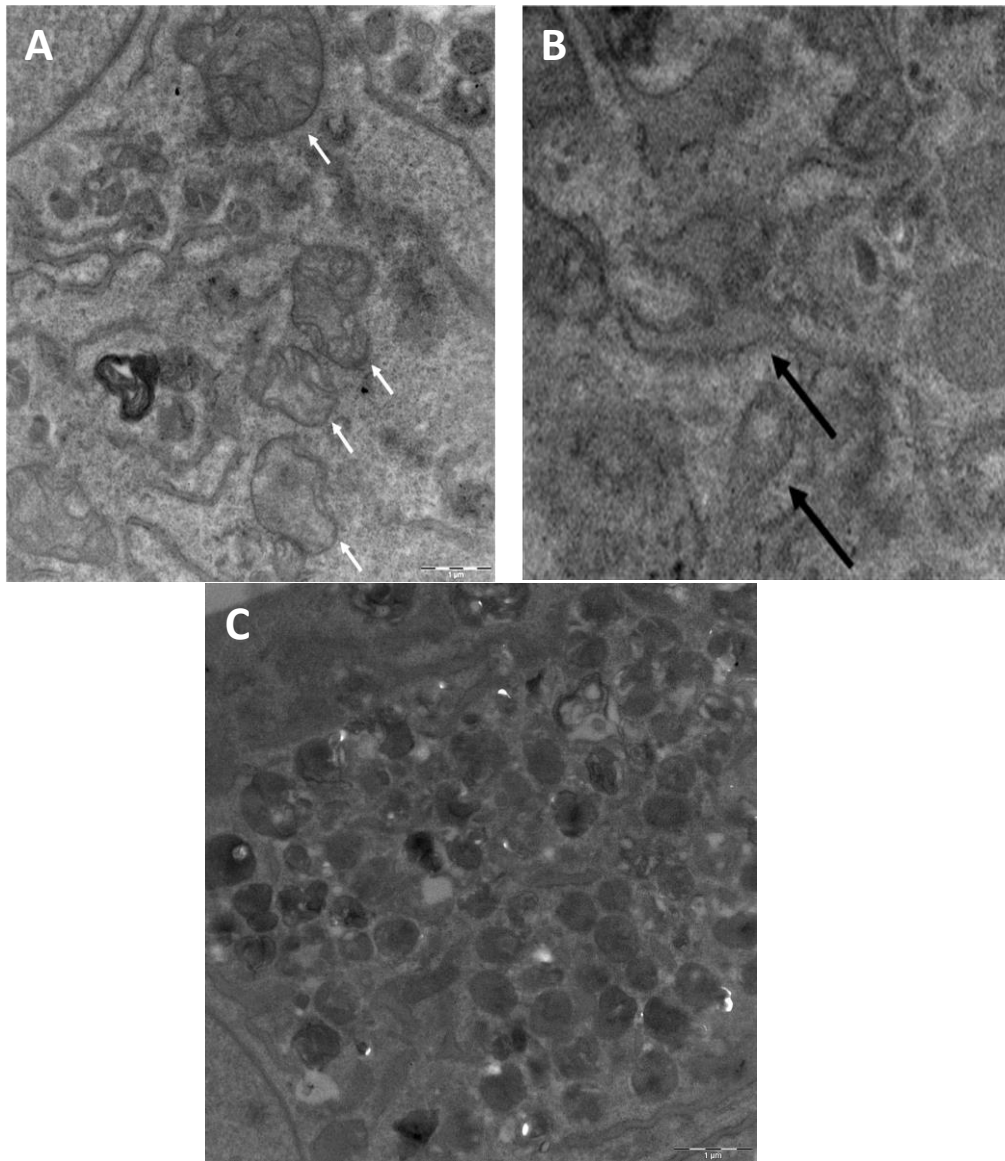


Figura IV. 16 Microscopía electrónica de las CMPDs al 21% O₂

- ✓ El cultivo de células madre de la pulpa dental al 3% O₂ tras 5 días de cultivo *in vitro* presentan un fenotipo de cultivo envejecido en comparación con el cultivo al 21% O₂. Además las células madre de la pulpa dental al 21% O₂ con trolox al 50μM tienen un fenotipo similar al de cultivo en atmósfera de 21% O₂.

V. DISCUSIÓN

Justificación del estudio

La capacidad de los dientes para formar dentina reparativa en respuesta a la caries profunda y el trauma suave sugiere el importante papel de la pulpa dental en la regeneración tisular. Esto se debe a que las células madre mesenquimales residentes en la pulpa dental tienen la capacidad de diferenciarse y formar odontoblastos para dar lugar a una nueva dentina (Gronthos, Mankani et al. 2000). Por lo tanto, la obtención de las células madre mesenquimales (CMMs) de la pulpa dental ha sido el objetivo de interés de varios estudios en la medicina regenerativa tisular (Zhang, Walboomers et al. 2006).

Además uno de los retos en las cirugías odontológicas es la regeneración ósea, especialmente del hueso alveolar para el implante dental, y de las células madre de pulpa dental también se pueden obtener por diferenciación osteoblastos hueso (Laino, Graziano et al. 2006); (Zhang, Walboomers et al. 2006)

Actualmente, las CMMs se usan como suspensiones de células en ensayos clínicos en animales y en humanos (Giordano, Galderisi et al. 2007), en combinación con matrices; materiales compatibles que sirven de soporte para las células madre y que se reabsorben gradualmente por la degradación enzimática e hidrolítica (Pieri, Lucarelli et al. 2009). Pero para tales usos clínicos, existen factores que todavía limitan su uso: el gran tiempo requerido para la obtención de estas células madre y el gran número de células que se necesita, supone que el cultivo debe mantenerse

durante semanas antes de poder ser combinado con el biomaterial e implantado en el paciente.

En esta tesis se pretende como objetivo primordial optimizar el tiempo de aislamiento y de cultivo de las células madre, con tal de subsanar, en parte, la limitación del número de células y el tiempo requerido que es necesario actualmente para los ensayos de regeneración ósea. Por ello, nos planteamos estudiar distintos protocolos para aislar las células y disminuir el tiempo de obtención, pero también optimizar las condiciones del cultivo, para asemejarlas lo máximo posible a las condiciones fisiológicas, con el fin de preservar sus propiedades originales de proliferación y diferenciación.

El exceso en la presión parcial de oxígeno ha sido descrito como un factor importante que puede desestabilizar la homeostasis redox celular y producir estrés oxidativo (Fan, Cai et al. 2008). Por otra parte, la falta de oxígeno puede también tener efectos citotóxicos perjudiciales (Chandel, Vander Heiden et al. 2000). Se ha demostrado que el cultivo de células bajo condiciones fisiológicas de oxígeno (3-6%) es el más adecuado para su proliferación y el mantenimiento de sus propiedades originales (Hall E. J. 2005). Así pues, y con el fin de mejorar e incrementar la velocidad de crecimiento de las células madre de pulpa dental, estudiamos sus posibles diferencias de proliferación bajo condiciones de oxígeno fisiológico (3%) en comparación con oxígeno ambiental (21%), y el mecanismo molecular por el cual acontecen estas posibles diferencias.

1. Optimización de la obtención de las células madre de la pulpa dental al 3% O₂

El primer tipo de células madre dentales fueron aisladas de la pulpa dental por Gronthos (Gronthos, Mankani et al. 2000). El método usado fue la digestión de la pulpa dental, fragmentada previamente, con colagenasa tipo I a la concentración 3 mg/mL y dispasa 4mg/mL durante 60 min a 37°C. Muchos autores usaron este protocolo para aislar CMPDs (Takeda, Tezuka et al. 2008); (Liu, Li et al. 2005). Otros métodos descritos en la literatura fueron usar colagenasa/dispasa ambos a 4 mg/mL durante 1 hora (Waddington, Youde et al. 2009); efectuar la digestión con colagenasa tipo I a 3 mg y dispasa a 4 mg (Suchanek, Visek et al. 2010); (Karamzadeh, Eslaminejad et al. 2012), usar solo la colagenasa tipo I a 3 mg/mL (Zhang, Walboomers et al. 2008), o fragmentar la pulpa sin la aplicación de ningún tipo de digestión (Pierdomenico, Bonsi et al. 2005); (Karamzadeh, Eslaminejad et al. 2012) . En otro estudio, cultivaron 40 pulpas realizando la digestión con colagenasa tipo I y tipo II en combinación con la termolisina durante 40 minutos a 37° C (Perry, Zhou et al. 2008).

Para llevar a cabo nuestro objetivo de la optimización del tiempo de digestión de la pulpa dental y del tiempo de obtención de las células madre de la pulpa dental, elegimos un entorno fisiológico de 5% CO₂, 37°C y medio húmedo, además de una concentración de oxígeno de 3% O₂, ya que en los últimos años se ha demostrado que la concentración de oxígeno convencional (20-21% O₂) empleada en la mayoría de los estudios *in vitro*, puede causar un desequilibrio en el estado redox celular

por un exceso en la formación de las ROS (Fan, Cai et al. 2008), lo que conlleva a un daño a las proteínas, los lípidos, el DNA y como consecuencia al metabolismo de la célula en general.

En nuestro estudio, usamos pulpas dentales de dientes permanentes de pacientes entre 14 y 67 años (31 hombres y 79 mujeres). En 10 de ellos se recogieron pulpas de 2 dientes distintos.

Primero procedimos a la disgregación mecánica por sí sola, con la cual no conseguimos aislar células madre, probablemente porque no se han llegado a liberar las células madre del tejido pulpar.

A continuación, además de la disgregación mecánica, que se utilizó en todos los métodos para facilitar la descomposición del tejido y el aislamiento de las células, añadimos ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a 2mg/mL durante 30 min. en el incubador con condiciones de 3% O₂, 5%CO₂, 37°C. El EDTA es un quelante de cationes bivalentes (como el calcio) y se emplea porque estos cationes favorecen la adhesión celular, ya que el calcio forma parte de las uniones intercelulares de cadherinas. Con este método obtuvimos células madre después de 7 días de cultivo con un porcentaje de 50% de éxito. Por lo tanto, el hecho de romper las estructuras que unen a las distintas capas del tejido y a las células entre sí, favorece la liberación de las células madre y por lo tanto su adhesión y crecimiento.

El siguiente método que usamos fue la digestión enzimática del tejido pulpar. Las enzimas de disgregación en general, son proteínas que rompen las uniones intercelulares o las estructuras del tejido conjuntivo que proporcionan soporte a los tejidos, liberando de este modo las

células. Para ello, empleamos la enzima colagenasa tipo I a 2 mg/mL durante 90 min como ya se describió (Takeda, Tezuka et al. 2008); (Liu, Li et al. 2005); (Zhang, Walboomers et al. 2008). La colagenasa por su parte, es una metaloproteinasas intersticial que degrada el colágeno, uno de los principales componentes de la matriz extracelular (MEC), en fragmentos, que por sí solos son fácilmente desnaturalizados y transformados en gelatina. Con este método obtuvimos células madre en una media de 11 ± 2 días con un porcentaje de 76% de éxito. Por lo tanto con respecto al método anterior no se mejoró el tiempo de obtención pero si el porcentaje de éxito.

Con el objetivo de comprobar la eficacia de la acción de la colagenasa por sí sola en el método, nos planteamos disminuir la concentración y aumentar el tiempo de digestión, siendo las condiciones colagenasa a 1mg/mL durante 13 horas. Los resultados fueron una reducción del tiempo de obtención de células madre a 6 ± 4 días con un porcentaje de 84% de éxito. Sin embargo, aunque fue más eficaz el método, el tiempo de digestión nos parecía demasiado largo. Esto nos demostraba que la digestión enzimática del tejido era un factor clave para la optimización del método ya que al observar al microscopio el tejido se veía más disgregado.

Dado los resultados obtenidos nos planteamos combinar diferentes estrategias de disgregación del tejido. Por ello, empleamos EDTA 2mg/mL durante 10 min además de la colagenasa tipo I a 2mg/mL durante 90 min. El tiempo de obtención de las células madre fue 6 ± 1 día con un porcentaje del 100% de éxito. Un hecho que nos confirmaba que la disgregación era clave en la optimización.

En el siguiente método introdujimos otra enzima para la digestión, combinando la enzima dispasa II a 4mg/mL con la colagenasa 2mg/mL durante 90 min después de la disgregación con EDTA 2mg/mL durante 10min. Obtuvimos células madre en una media de 5 ± 2 días con un porcentaje de 76% de éxito. La dispasa corta la fibronectina y el colágeno IV que son componentes de la lámina densa y las fibrillas de anclaje de la membrana basal y degrada en menor extensión, el colágeno I. Redujimos el tiempo de obtención un día pero el porcentaje de éxito también se redujo.

Dado que los resultados nos hacían entender que la disgregación podría ser la clave para optimizar al máximo el método, nos planteamos aumentar la concentración de la colagenasa, disminuir el tiempo de incubación enzimática y además añadir otro método físico que consistía en sonicar la muestra después de todas las incubaciones. La sonicación favorece la disgregación del tejido por las vibraciones intermoleculares. Con el método EDTA 2mg/mL 10 min., colagenasa I 4mg/mL+ dispasa II 4mg/mL 40 min. y sonicar 1 min a 37°C, llegamos a obtener células madre en una media de 4 ± 2 días con un porcentaje del 100% de éxito.

Los resultados fueron muy favorables, pero aun así nos planteamos mejorar el método incidiendo en la disgregación enzimática. Para ello, antes de añadir una tercera enzima probamos la eficacia por sí sola de la enzima termolisina a 13ng/mL (Perry, Zhou et al. 2008). La termolisina es una metaloendopeptidasa que hidroliza las proteínas en el terminal N de los residuos de aminoácidos hidrófobos. Obtuvimos células madre en 20h con un porcentaje de 33% de éxito. En el método

descrito por Perry y cols en el cual utilizaron colagenasa, dispasa y termolisina, obtuvieron células madre de la pulpa dental a las 24 horas.

Por último probamos combinar la disgregación mecánica con bisturí, EDTA a 2mg/mL durante 10 min., colagenasa I a 4mg/mL, dispasa II a 4mg/mL, termolisina a 13ng/mL durante 40 min. y la posterior sonicación durante 1min. a 37°C. Con este método obtuvimos células madre en una media de 15± 4 horas con un porcentaje de 100% de éxito.

Así pues, el mejor método empleado para la obtención de las células madre, fue: primero disgregamos mecánicamente la pulpa dental cortándola manualmente en trozos diminutos, luego procedemos a su disgregación con EDTA, quelando el calcio que une a los enlaces de cadherina intercelulares. Después aplicamos una digestión enzimática usando 3 enzimas: la colagenasa, para degradar el colágeno I; la dispasa para cortar la fibronectina, el colágeno IV y las fibrillas de anclaje de la membrana basal y la termolisina para hidroliza las proteínas en el terminal N de los residuos de aminoácidos hidrófobos. Por último, aplicamos la disgregación física por sonicación para acabar de aislar las células con las vibraciones intermoleculares.

Así conseguimos reducir el tiempo de obtención de las células madre de la pulpa dental de una media de 11 ± 2 días a una media de 15 ± 4 horas con un mínimo tiempo de digestión de la pulpa dental (50 min) y un máximo rendimiento (100%).

Perrys y cols consiguieron obtener CMPDs realizando la disgregación enzimática con colagenasa I, II y termolisina durante

40min. y obtuvieron las primeras células madre a las 24 horas en condiciones de 21% O₂ y 5% CO₂ (Perry, Zhou et al. 2008), pero después la células llegan a confluencia al cabo de 10 días. Karamzadeh y cols consiguieron obtener CMPDs entre los 3 y 5 días de cultivo (con digestión enzimática colagenasa/disypasa) y a los 5 días de cultivo sin ningún tipo de disgregación (Karamzadeh, Eslaminejad et al. 2012). En la presente tesis, conseguimos obtener CMPDs en un mínimo tiempo de 15 horas realizando la disgregación enzimática y el cultivo en la condición fisiológica de O₂ (3%). No conseguimos obtener CMPDs sin digestión enzimática.

Los estudios sobre la obtención de las CMPDs realizan los cultivos en la condición de oxígeno convencional (20-21% O₂/160 mm Hg), con el objetivo de aislar células madre del tejido pulpar, su posterior caracterización y su diferenciación (Zhang, Walboomers et al. 2008); (Rodriguez-Lozano, Insausti et al. 2012), su criopreservación (Collart Dutilleul, Thonat et al. 2012) o su empleo clínico (d'Aquino, De Rosa et al. 2009); (Pisciotta, Riccio et al. 2012). Para los mismos objetivos, la condición de oxígeno fisiológica (3-6 % O₂/ 20-40 mmHg) (Hall E. J. 2005) es un parámetro primordial que se debe de respetar no solo para obtener células en un mínimo tiempo posible sino también como un factor esencial para una máxima proliferación como comentaremos en los siguientes apartados. Casi no hay estudios que se fijaron en minimizar el tiempo de obtención de las CMPDs, aunque es un factor limitante en la clínica odontológica como hemos mencionado previamente.

2. Caracterización de las células madre de la pulpa dental

Para confirmar que las células madre aisladas son células madre de origen mesenquimal, los autores las caracterizan con una serie de marcadores positivos o negativos, ya que no existe un marcador que caracterice exclusivamente las células madre de la pulpa dental. El grupo de Kerkis et al. 2006, cultivaron células madre de dientes deciduos positivas para marcadores de células madre embrionarias como OCT-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, implicando la pluripotencialidad de estas células (Kerkis, Kerkis et al. 2006). Recientemente, en otro estudio se aislaron CMPDs de ratas mediante distintos protocolos de cultivo (Waddington, Youde et al. 2009). Cultivaron células madre derivadas de cresta neuronal y positivas para STRO-1, CD31 (marcador de células madre adultas), LANGFR (marcador de células derivadas de cresta neural), CD105 y Notch-2 (marcadores de superficie de células endoteliales). Por otra parte, cultivaron células madre derivadas de médula ósea, y solo positivas para STRO-1, CD31 y fibronectina (Waddington, Youde et al. 2009).

Las CMPD diferenciadas a osteoblastos siguen siendo positivas para STRO-1 pero negativas para CD34 y CD117. También son positivas para alcalina fosfatasa (una enzima hidrolizante que se encuentra particularmente alta en hueso), calceína, osteonectina (fosfoglicoproteína, receptor en la membrana de los osteoblastos), CD54, CD44 y RUNX-2 (otro marcadores de células madre) (Papaccio, Graziano et al. 2006).

En nuestro estudio, para confirmar el fenotipo de células madre mesenquimales en las células aisladas de la pulpa dental, empleamos una serie de marcadores positivos descritos en la bibliografía para células madre mesenquimales: STRO1, un marcador putativo de células madre (Gronthos, Graves et al. 1994); OCT4, necesaria para el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias expresado en células madre embrionarias murinas y humanas (Nichols, Zevnik et al. 1998); (Donovan 2001); CD133, expresado en células madre capaces de dar lugar a células madre de origen hematopoyético, endotelial y miogénico (Meregalli, Farini et al. 2010); Nestina, un marcador de células madres neuronales (Lendahl, Zimmerman et al. 1990), también de células madre odontoblásticas y dientes germinales (Kenmotsu, Matsuzaka et al. 2010); (Terling, Rass et al. 1995); (About, Laurent-Maquin et al. 2000) y recientemente demostrado en células madre de la pulpa dental (Honda, Hirose et al. 2007); CD34, expresado dentro del sistema hematopoyético humano y murino sobre células madre, células progenitoras (Andrews, Singer et al. 1986); (Baumheter, Singer et al. 1993), (Wood, May et al. 1997) y células madre embrionarias humanas (Vazao, das Neves et al. 2011).

También empleamos un marcador negativo para células madre mesenquimales, CD45: expresado en células hematopoyéticas, principalmente precursores de leucocitos (Barclay, Jackson et al. 1988); (Pittenger, Mackay et al. 1999); (Zhang, Niu et al. 2003).

Finalmente, analizamos las células que obtuvimos en los cultivos mediante microscopía confocal con anticuerpos específicos para los distintos marcadores y los resultados fueron: positivos para STRO1;

OCT1; CD133; CD34; Nestina y negativos para CD45, confirmando por lo tanto que estas células correspondían a células madre mesenquimales.

3. Parámetros de estrés oxidativo en células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O₂ o al 21%O₂

Las células se mantienen en un equilibrio constante entre sustancias prooxidantes y antioxidantes. Cuando se produce un desequilibrio entre estas sustancias a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo (Sies 1986), que puede afectar a diversas moléculas, y que puede reflejarse en sus funciones fisiológicas (Csete 2005).

El exceso en la presión parcial de oxígeno ha sido descrito como un factor importante que puede desestabilizar la homeostasis redox celular y producir estrés oxidativo (Fan, Cai et al. 2008). Desde los inicios de los cultivos celulares *in vitro* todos los investigadores han utilizado condiciones de cultivo con oxígeno ambiental, es decir, al 20-21% O₂ (160 mmHg). Estas condiciones no se acercan, en absoluto, a las condiciones fisiológicas de las células en el organismo y entre ellas de las células madre de la pulpa dental. Estas células se encuentran en una zona de la pulpa que se llama zona rica en células y la cual se encuentra por la parte media de dicho tejido donde la presión parcial de oxígeno estaría entorno al 3-6% O₂ (20-40 mmHg) (Hall E. J. 2005); (Kozam 1967). Por ello, nos planteamos trabajar en las condiciones más fisiológicas posibles de este tipo celular de modo que pudiéramos optimizar el tiempo de obtención y crecimiento de las mismas.

Nos propusimos estudiar los parámetros de daño oxidativo en las células madre de la pulpa dental en la condición de oxígeno ambiental (21% O₂) frente a la condición fisiológica (3-6% O₂). Estudiamos el daño a proteínas mediante la medición de las proteínas carboniladas y el daño a lípidos mediante la medición de los niveles de malondialdehído (MDA). Además, introdujimos a la condición de oxígeno ambiental, trolox (un homólogo de la Vitamina E) para comprobar su efecto antioxidante sobre estos parámetros.

En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Stadman 1992). Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (Stadman 1992). Sin embargo, la carbonilación de las proteínas no se debe considerar siempre como un daño oxidativo. Efectivamente, García-Giménez y cols. descubrieron un aumento de la carbonilación de las histonas (las proteínas que compactan el DNA) junto con el aumento de la proliferación de fibroblastos NIH3T3 y la posterior bajada de la carbonilación con la confluencia celular (García-Giménez, Ledesma et al. 2012). Una posible explicación sería, la existencia de peptidil lisin oxidasas (LOXs) dentro del núcleo (Li, Nellaiappan et al. 1997), lo cual modificaría las histonas H1 *in vitro* (Kagan and Li 2003).

En nuestro estudio determinamos el daño oxidativo a las proteínas mediante la reacción de los grupos carbonilo con 2,4-dinitrophenylhidrazine cuyo producto (2,4-dinitrophenylhydrazone) se

detecta mediante un anticuerpo específico por Western Blotting. Los resultados obtenidos sobre el extracto total de proteínas, fueron por una parte, que las CMPDs cultivadas al 3% de O₂ y al 21% de O₂ con trolox (50µM), presentaban significativamente más carbonilación proteica que aquellas cultivadas en oxígeno ambiental, al contrario de lo esperado. Además, la carbonilación proteica en las 3 condiciones aumentaba al principio del ciclo celular y bajaba con la confluencia de las células. Este hecho nos hizo plantearnos la posibilidad de que el aumento de carbonilación proteica estaba relacionado, no con un daño oxidativo, sino con la proliferación celular, ya que como comentaremos en el apartado siguiente la tasa de proliferación está aumentada en condiciones de oxígeno de 3%, lo cual concuerda con una mayor carbonilación de proteínas bajo esta condición de oxígeno.

El malondialdehído es uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos principalmente en las membranas biológicas. Es capaz de provocar una alteración estructural en las mismas que desemboca en una pérdida de fluidez, por tanto, un aumento de su rigidez, y por ello, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación lipídica.

En la bibliografía, no hay estudios hasta ahora que se hayan centrado en la comparación del daño a los lípidos en las células cultivadas al oxígeno ambiental con respecto al fisiológico. Nuestros resultados sobre los niveles de peroxidación lipídica (MDA) en distintas tensiones de oxígeno, mostraron que, los niveles de MDA fueron significativamente mayores en las CMPDs cultivadas al 21% O₂ con respecto a aquellas cultivadas al 3% O₂ y 21% O₂ con Trolox (50 µM) a los 7 días de cultivo.

Ya está descrito el efecto protector de trolox frente al daño a lípidos (Maggio, Diplock et al. 1977); (Bissett, Chatterjee et al. 1990), nuestro estudio concuerda con ello.

4. Proliferación de las células madre de la pulpa dental cultivadas al 3% O₂ o al 21% O₂

La proliferación celular está altamente regulada por un conjunto de factores que permiten controlar el ciclo celular en función de las condiciones en las que se encuentran las células manteniéndolas en homeostasis (Ross 2007). La concentración fisiológica del oxígeno es una de las condiciones primordiales que se deben respetar. Actualmente, hay cada vez más estudios *in vitro* con células cultivadas en distintas condiciones de oxígeno.

Varios estudios demostraron la menor tasa de proliferación de estas células en la condición de oxígeno convencional (20-21% O₂) en comparación con la condición fisiológica (3-6% O₂). Este hecho se ha demostrado entre otras, en células madre neuronales (Rodrigues, Diogo et al. 2010), en células madre de la médula ósea (Dos Santos, Andrade et al. 2010); (Hung, Ho et al. 2012), en células madre del cordón umbilical (Lavrentieva, Majore et al. 2010), células madre de la grasa tisular (Efimenko, Starostina et al. 2011); (Kim, Song et al. 2012), fibroblastos embrionarios murinos (Parrinello, Samper et al. 2003) y fibroblastos humanos WI-38 (von Zglinicki, Saretzki et al. 1995). Este último estudio, explica la menor proliferación de los fibroblastos cultivados en la condición de oxígeno ambiental con el acortamiento de los telómeros

mientras que otro estudio la relaciona con el daño al DNA (Parrinello, Samper et al. 2003).

Otro parámetro estudiado en la condición de oxígeno ambiental fue la producción de ROS. En un estudio sobre las células de la sangre del cordón umbilical positivas para CD34, se observó la alta tasa de formación del anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en células cultivadas al 20% O_2 en comparación con aquellas cultivadas al 5% O_2 (Fan, Cai et al. 2008). Otro estudio demostró un incremento significativo en la formación de ROS en macrófagos cultivados al 20% O_2 con respecto al 5% O_2 (Pfau, Schneider et al. 2004). En mioblastos C2C12, también se observó un incremento significativo en la formación de ROS en células cultivadas al 20% O_2 en comparación con aquellas cultivadas al 5% y al 6% O_2 , respectivamente (Hansen, Klass et al. 2007).

Hung y cols demostraron que la diferenciación osteogénica está más inducida cuando las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea está cultivadas al 1% O_2 en comparación con aquellas cultivadas al 20% O_2 (Hung, Ho et al. 2012). También demostraron en las mismas células que la condición fisiológica de oxígeno estimula importantes genes como Oct4, Nanog, Sall4 y Klf4 (Hung, Ho et al. 2012). Además, el factor de transcripción inducible por hipoxia HIF 2α regula la expresión del factor de transcripción Oct-4, esencial para el mantenimiento de la pluripotencialidad (Covello, Kehler et al. 2006); (Forristal, Wright et al. 2010) y también para la expresión de Sox2 y Nanog que mantienen las características de las células madre e inhiben los genes promotores de la diferenciación (Boyer, Lee et al. 2005).

El consumo de oxígeno en células madre del cordón umbilical cultivadas al 21% O₂ se demostró que es casi 5 veces mayor que aquellas cultivadas al 2,5-5% O₂ (Lavrentieva, Majore et al. 2010).

La integridad cromosomal está directamente relacionada con el estrés oxidativo (Csete 2005); (Woo and Poon 2004). Hay un estudio que demostró que hay menos aberraciones espontáneas de cromosomas en células madre embrionarias humanas cultivadas al 2% O₂ en comparación con aquellas cultivadas al 20% O₂ (Forsyth, Musio et al. 2006).

En un estudio sobre las células madre de la médula ósea (Hung, Ho et al. 2012) y en otro en células madre del tejido adiposo (Kim, Song et al. 2012), se observó que la concentración del oxígeno influye sobre la motilidad fisiológica de las células, en las cuales la hipoxia fisiológica aumenta la habilidad de la migración celular y regula la expresión mesenquimal de genes como fibronectina y N-cadherina (moléculas de adhesión) y vimentina: marcador mesenquimático y una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células embrionarias (Fuchs and Weber 1994).

Y por último, está demostrado que las células madre neuronales de ratas cultivadas en condiciones de bajo oxígeno a concentraciones fisiológicas sufren menos apoptosis que aquellas cultivadas en oxígeno ambiental (Studer, Csete et al. 2000); (Bhandari, Choo-Wing et al. 2006).

Así pues, nos propusimos el objetivo de estudiar la proliferación celular de las CMPDs en la condición de oxígeno fisiológica (3% O₂) con respecto al ambiental (21% O₂) y bajo oxígeno ambiental con un

antioxidante (trolox 50 μ M), para estudiar el posible efecto del estrés oxidativo. Las primeras diferencias que observamos fueron a las 6 horas del inicio de la curva de proliferación, ya que después de contar el número de células, observamos cómo la adhesión de las CMPDs fue significativamente menor al 21% de O₂ (-30%) que al 3% O₂. Por lo tanto, para poder partir con el mismo número de células en las diferentes condiciones de O₂ tuvimos que sembrar un 30% más de células al 21% O₂. Y aun así, se produjo una proliferación significativamente mayor de las CMPDs en la condición fisiológica con respecto al oxígeno ambiental. Además, hubo también una mayor proliferación de las CMPD al 21% O₂ con trolox (50 μ M) en comparación con el 21% O₂ de forma significativa, lo que nos hacía pensar que el estrés oxidativo al 21% O₂ estaba afectando a la tasa de proliferación de estas células, siendo así una condición inadecuada para su normal funcionamiento.

Como conclusión, en la presente tesis, no sólo confirmamos la menor proliferación de las células madre en condiciones de oxígeno ambiental, sino que descubrimos la menor adhesión de estas células en dichas condiciones, lo cual no había sido estudiado hasta la fecha.

5. Reguladores del ciclo celular

El ciclo celular está compuesto por dos fases principales: la fase S (interfase) y la fase M (mitosis), caracterizada por la división del genoma. La interfase, a su vez, se subdivide en otras tres fases: la fase G₁ (gap₁), la fase S (síntesis del DNA) y la fase G₂ (gap₂), lo cual

normalmente comprende el 90 % o más del tiempo total del ciclo celular (Ross 2007).

La regulación del ciclo celular está mediada por proteínas que se sintetizan y se degradan de forma cíclica. Los complejos proteicos en los puntos de control a lo largo del ciclo celular pueden impulsar a la célula a que entre en el ciclo celular o a que salga de él, ya que estimulan el crecimiento y la división cuando las condiciones son favorables o detienen la división celular y reducen su ritmo cuando las condiciones son desfavorables (Ross 2007).

En respuesta a los estímulos de estrés que causan daño al DNA, las células se autorregulan por los puntos de control del ciclo celular para permitir la reparación del DNA. Dos puntos principales de control de ciclo celular han sido caracterizados: el punto G1/S, incluyendo la fase anterior y la misma fase de la síntesis del DNA y el punto G2/M antes de la división celular (Zhou and Elledge 2000). En la fase G1, existen 2 puntos de control que verifican la progresión de la célula: el punto de restricción, en el cual la célula autoevalúa su propia capacidad replicativa para entrar en la fase S y el punto de control del daño al DNA, en el que se comprueba la integridad del DNA recién duplicado. En la fase S, hay un punto de control de la calidad del DNA en proceso de duplicación. Por último, en la fase G2, hay 2 puntos de control que comprueban el daño al DNA y el DNA no duplicado para poder entrar o no en la fase M.

En las células eucariotas, la MAPK p38 es una de las vías sensibles a los estímulos de estrés que causan daño al DNA y responden mediante la regulación de los puntos de control a nivel G1/S (Ito, Hirao et al. 2006) y G2/M (She, Chen et al. 2000) para permitir la reparación

del DNA. Además de la regulación del ciclo celular, dicha proteína está implicada en la regulación de la diferenciación celular, la senescencia y la apoptosis (Nebreda and Porras 2000); (Johnson and Lapadat 2002); (Han and Sun 2007); (Hui, Bakiri et al. 2007)

Por otra parte, un estudio demostró que la MAPK p38 fosforila a p21^{Waf1/Cip1} (Kim, Mercer et al. 2002), una proteína de la familia de inhibidores Kip/Cip. p21^{Cip1/Waf1} funciona como un punto de control en el ciclo celular inhibiendo las ciclinas dependientes de las quinasas-CDKs en las interfaces G1/S y G2/M (Bates, Ryan et al. 1998), bloquea al complejo ciclina E-CDK2, previniendo la fosforilación de la proteína retinoblastoma (Rb) (Costanzi-Strauss, Strauss et al. 1998). Cuando esto ocurre, el factor de transcripción esencial (E2F) está bloqueado y el ciclo celular se detiene en la interfase G1/S (Dotto 2000).

Así pues, en nuestro estudio medimos la expresión proteica de p38 en su forma activa, la p38 fosforilada, en la curva de crecimiento de las CMPDs al 3% O₂ o al 21% O₂ a los 3, 5 y 7 días de cultivo. Como resultado, la expresión de la proteína pp38 fue significativamente mayor en las CMPDs cultivadas al 21% O₂ con respecto al 3% O₂ y al 21% O₂ con trolox (50µM) a los 5 y 7 días de cultivo, coincidiendo con la menor proliferación celular bajo estas condiciones de cultivo. La disminución de la expresión de pp38 en CMPDs cultivadas al 21% O₂ con trolox (50µM) con respecto a aquellas cultivadas al 21% O₂ confirma lo que está previamente descrito sobre el efecto de trolox sobre la MAPK p38 tras la inducción de estrés oxidativo (Peus, Meves et al. 2001).

Por otra parte, confirmamos que la proteína p21^{Waf1/Cip1}, que como ya hemos señalado regula negativamente el ciclo celular, sigue el mismo perfil que la MAPK p38 en la curva de crecimiento de las

CMPDs al 21% O₂ con respecto al 3% O₂ y al 21% O₂ con trolox (50μM) a los 5 y 7 días de cultivo, es decir que está aumentada en las condiciones de oxígeno ambiental. En un estudio sobre las células madre de músculos proveniente de rata, se observó la alta expresión génica y proteína de la proteína p21^{Waf1/Cip1} en células cultivadas al oxígeno ambiental en comparación con aquellas cultivadas al oxígeno fisiológico (Lees, Childs et al. 2008). Lo que se confirma en nuestros datos.

La expresión p21^{Waf1/Cip1} inducida por estrés oxidativo generalmente actúa a través de un mecanismo p53-dependiente (el-Deiry, Tokino et al. 1995); (Giono and Manfredi 2006); sin embargo, también está descrita la vía p53-independiente (O'Reilly 2005). En nuestro estudio, la expresión de la proteína pp53 no se correlaciona con la expresión de la proteína p21^{Cip1/Waf1} (datos no mostrados). Por otra parte, se ha documentado que la MAP-quinasa p38 fosforila p21^{Cip1/Waf1} en respuesta a un estímulo de estrés oxidativo (Kim, Mercer et al. 2002). Nuestros resultados sobre la expresión de las proteínas pp38 y p21^{waf1/Cip1} concuerdan con ello. De este modo, podríamos concluir que la regulación de la proteína p21 en las CMPDs cultivadas al 3% O₂ o al 21 % O₂ es p53-independiente y en este caso depende de pp38.

6. Defensa frente al estrés oxidativo a través de la vía Nrf2

La función normal de la célula requiere un equilibrio estable de oxidación–reducción, por lo que las células eucariotas han desarrollado defensas antioxidantes endógenas para hacer frente a un posible

desequilibrio (estrés oxidativo). Entre ellas, se ha destacado la vía Nrf2/ARE (factor nuclear de transcripción/elemento de respuesta antioxidante), como un mecanismo de transcripción importante que participa en la regulación de genes antioxidantes y el mantenimiento de la homeostasis en el estado redox celular (Motohashi and Yamamoto 2004). En condiciones basales, el factor nuclear de transcripción (Nrf2) se une a una proteína citosólica, *Kelch like associated protein 1* (Keap1), para ser luego degradado por el proteosoma (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (Kang, Kobayashi et al. 2004). Las ROS y los agentes electrofílicos modifican los residuos de la cisteína de keap1 (Katoh, Iida et al. 2005); (McMahon, Itoh et al. 2003), lo cual conlleva a alteraciones espaciales en el complejo Nrf2-keap1 (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (McMahon, Itoh et al. 2003); (Wakabayashi, Itoh et al. 2003) y como resultado la acumulación nuclear de Nrf2 y la regulación de la expresión génica asociada al ARE *in vivo* e *in vitro*, (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al. 2002); (Kobayashi, Li et al. 2009). El ARE es un cis-elemento localizado en los genes que codifican las enzimas detoxificantes y antioxidantes de la fase II, incluyendo la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1(NQO1), la glutatión S transferasa (GST), las subunidades de la glutamato-cisteína ligasa (GCL), la hemoxygenasa 1 (HO-1), y el transportador de cisteína/glutamato (xCT) (Hayes, Chanas et al. 2000); (Mann, Bonacasa et al. 2009); (Motohashi and Yamamoto 2004).

La activación de la vía Nrf2/ARE está modulada por la presión parcial de oxígeno, ya que en las células microvasculares humanas, se produce un aumento de la actividad de Nrf2 con la hiperoxia (Godman,

Chheda et al. 2010), (Papaiahgari, Zhang et al. 2006). En la presente tesis, estudiamos la vía de la defensa frente al estrés oxidativo-Nfr2/ARE mediante la expresión de las proteínas hemoxygenasa 1 (HO-1) y NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1(NQO-1).

La proteína inducible hemoxygenasa-1 (HO-1) cataliza la oxidación del grupo hemo a monóxido de carbono (CO) y biliverdina, la cual ejerce un efecto protector frente al estrés oxidativo e induce la proliferación celular y la diferenciación (Otterbein and Choi 2000); (Lee, Lee et al. 2010). Previamente, se ha demostrado que la vía HO-1 es un mecanismo clave para la adaptación de las células de la pulpa dental humana y del ligamento periodontal a condiciones de estrés y perjudiciales (Min, Kwon et al. 2006); (Lee, Pi et al. 2007); (Lee, Min et al. 2008); (Kook, Hwang et al. 2009); (Kook, Lee et al. 2009). Efectivamente, se demostró el efecto protector de la HO-1 en células de la pulpa dental humana sometidas a dosis tóxicas de NO (Min, Hwang et al. 2006) y también en células humana del ligamento periodontal sometidas a estrés inducido por H₂O₂ (Pi, Kim et al. 2007).

Para estudiar la expresión de la hemo oxygenasa 1 como mecanismo de defensa en las CMPDs, indujimos estrés oxidativo en dichas células al 5% O₂ y al 21% O₂ mediante la disminución de los niveles del glutatión reducido (GSH), tratándolas en confluencia con un potente deplector del (GSH) que es el dietilmaleato (DEM) en concentraciones de 50µM y 100µM durante 8 y 24 horas de cultivo. El resultado fue que hubo una expresión significativamente mayor de la hemoxygenasa 1 al 21% O₂ con respecto al 5% O₂, a las 24 horas de incubación con el tratamiento, tanto en las condiciones de control, como

con el tratamiento con DEM al 100 μ M. Además, las CMPDs cultivadas en la condición fisiológica de oxígeno y tratadas con DEM 50 μ M, recuperaron significativamente más rápido los niveles basales de HO-1 que aquellas sometidas a la condición de oxígeno ambiental. En cuanto a las CMPDs tratadas con DEM 100 μ M, observamos que después de 24 horas de tratamiento en las condiciones fisiológicas, los niveles proteicos de HO-1 tienen una tendencia de bajar, pero no significativamente con respecto a las 8 horas de tratamiento. Por otra parte, las CMPDs en la condición de oxígeno ambiental, siguen manteniendo los mismos niveles de HO-1, después de 24 horas de tratamiento con DEM (50-100 μ M) con respecto a 8 horas.

Otra enzima que estudiamos y que está mediada por Nfr2 es NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO-1), la cual cataliza la reducción de las quinonas a hidroquinonas, involucradas en la detoxificación de xenobióticos y en la protección de los fosfolípidos de membrana frente al daño oxidativo mediante la reducción de la coenzima Q (Kwak, Kensler et al. 2003); (Ross, Kepa et al. 2000); (Venugopal and Jaiswal 1996).

Para estudiar la expresión de la NQO-1 como un mecanismo de defensa en las CMPDs, indujimos asimismo estrés oxidativo al 5% O₂ y al 21% O₂ mediante el tratamiento de las células en confluencia con dietilmaleato (DEM) en concentraciones de 50 μ M y 100 μ M durante 8 y 24 horas de cultivo. El resultado fue que hubo una mayor expresión de la proteína NQO-1 al 21% O₂ con respecto al 5% O₂ estadísticamente significativa a las 8 horas de incubación en las células control y a las 24

horas tanto en las células control así como con tratamientos con DEM al 50 μ M y 100 μ M.

Como ya hemos señalado, p21 está involucrado en varios procesos celulares incluyendo el paro del ciclo celular, la diferenciación, la senescencia, la apoptosis, la replicación y la reparación del DNA (Dotto 2000); (Esposito, Cuccovillo et al. 1998); (Gartel and Tyner 2002); (Lavrovsky, Schwartzman et al. 1994); (O'Reilly 2005). En la bibliografía, hay estudios que demuestran que hay una relación directa entre la defensa de Nrf2 en respuesta al estrés oxidativo y la proteína p21^{Waf1/Cip1} (Chen, Sun et al. 2009). Ello explicaría el efecto protector de p21 frente al estrés oxidativo. Estos investigadores demostraron que *in vitro*, p21 es capaz de reaccionar con el dominio DLG de Nrf2 y disminuir su ubiquitinación por Keap1 y su degradación proteasomal. Así, las propiedades antioxidantes de p21 son Nrf2-dependientes, y el aumento en la expresión de p21 conlleva al aumento de los niveles de transcripción de los genes antioxidantes controlados por Nrf2. Por otra parte, está demostrado que la MAP-quinasa p38 fosforila p21^{Waf1/Cip1} en respuesta al estímulo de estrés oxidativo (Kim, Mercer et al. 2002), efectivamente, p38 tiene la capacidad de estabilizar la expresión de la proteína p21 induciendo su fosforilación en Ser130 *in vitro* and *in vivo*. Con todo ello, nosotros proponemos el siguiente mecanismo en respuesta a la agresión por ROS que supone para las células el oxígeno ambiental, y que explica los resultados obtenidos (ver figura V.1).

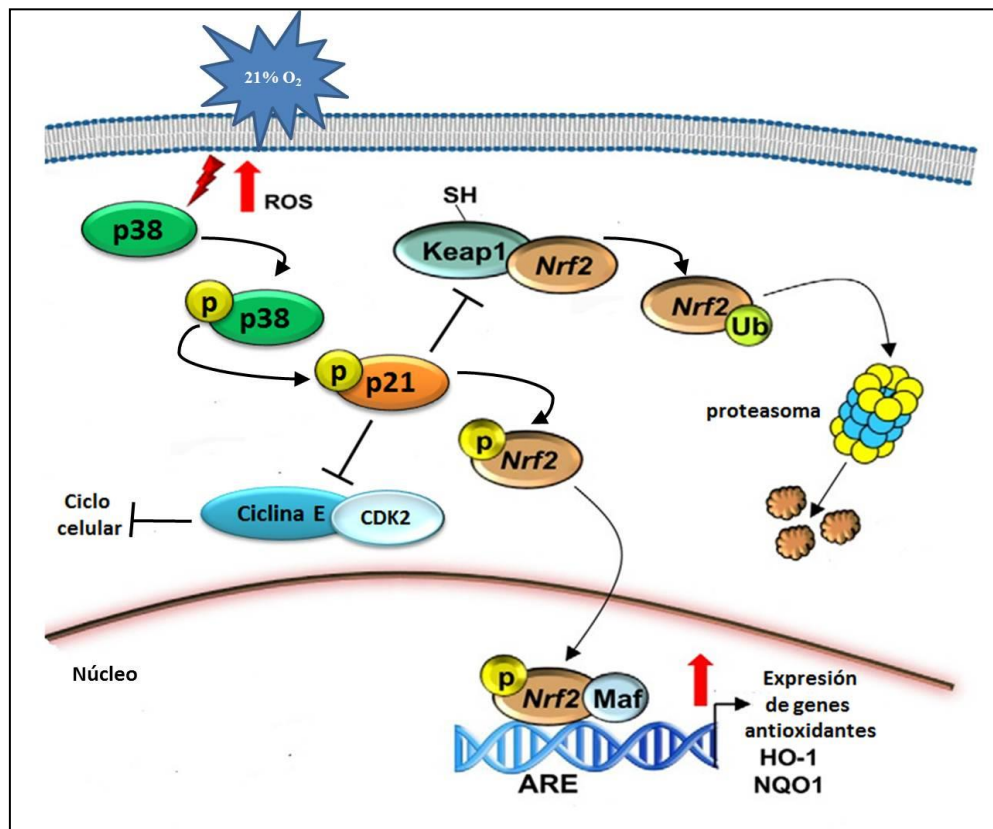


Figura V.1 La ruta propuesta en las CMPDs en respuesta al estrés oxidativo inducido por el oxígeno ambiental

7. Aspectos morfológicos

Gracias al avance tecnológico y el desarrollo de nuevas técnicas de investigación, en la actualidad contamos con la posibilidad de analizar la morfología y las características de las células en cuanto a su forma, su tamaño y su estructura. Dichas técnicas son fundamentalmente: la microscopía óptica y electrónica.

En la bibliografía, a nuestro saber, no hay estudios hasta ahora que se hayan centrado en estudiar el efecto del oxígeno ambiental (20-21% O₂) como fuente de estrés oxidativo sobre la morfología celular. Como ya hemos señalado previamente, el exceso en el la presión parcial de oxígeno induce estrés oxidativo que puede tener efectos perjudiciales sobre sobre el normal funcionamiento de las células en general. Por lo tanto las características morfológicas es un parámetro que nos podría servir como un espejo que refleja el buen o el mal estado de las células dependiendo de las condiciones en las cuales se encuentran.

En la presente tesis se ha empleado la microscopía óptica y electrónica para evaluar la morfología de las células madre de pulpa dental, sometidas a diferentes condiciones de oxígeno.

Los resultados obtenidos fueron que, a los 5 días de cultivo, las membranas plasmáticas de las CMPDs cultivadas al 3% O₂ presentan abundantes expansiones confiriéndoles bordes irregulares a las células. En líneas generales, estas células contienen menos vesículas densas (cuerpos densos) que las células cultivadas a 21% O₂. El núcleo de estas células es ovalado y su cromatina laxa y presenta un borde muy irregular. No encontramos mitosis. El citoplasma presenta abundantes expansiones. Además, presentan un elevado número de gotas lipídicas en sus citoplasmas. Todas estas características nos indican que se trata de cultivos envejecidos.

A los 5 días de cultivo las CMPDs en atmósfera de 21% O₂, alcanzan un mayor tamaño que las células al 3% O₂. En el citoplasma de estas células abundan las vesículas densas de pequeño tamaño, sus bordes

celulares son regulares, mostrando una menor densidad de expansiones citoplasmáticas que las células al 3% O₂. Los núcleos son ovalados y la cromatina es laxa, pero a diferencia del cultivo al 3% O₂, los núcleos de las células al 21% O₂ presentan bordes regulares. Por otra parte, CMPDs en atmósfera de 21% O₂ contienen en su citoplasma mitocondrias aberrantes, es decir, presentan bordes irregulares y sus crestas se encuentran dilatadas, presentan retículos endoplásmicos rugosos muy dilatados y su citoplasma contiene una gran cantidad de lisosomas. Encontramos más frecuentemente que al 3% O₂, células grandes de citoplasma claro. Además, encontramos numerosas mitosis ya que el cultivo todavía no ha llegado a confluencia y se encuentra en fase exponencial del crecimiento.

A los 5 días de cultivo, las células cultivadas al 21% O₂+trolox al 50µM, no representan un fenotipo diferente de aquellas cultivadas al 21% O₂.

El hecho de que no se vean mitosis en la CMPDs al 3% O₂ es porque su tasa de crecimiento es mayor que al 21% O₂ y ya ha llegado a confluencia, se ha saturado el cultivo y el crecimiento se ralentiza. Por esto, el número de mitosis no se debe tener en cuenta, en este caso, como un indicativo de óptimas condiciones de cultivo. Sin embargo, el que no haya llegado todavía a confluencia es un indicativo de que el crecimiento es menor. Por otra parte, las CMPDs cultivadas al 21% O₂ representan mitocondrias aberrantes, retículos endoplásmicos rugosos muy dilatados y citoplasma con una gran cantidad de lisosomas. Todo ello, deduce que las condiciones son más desfavorables para las CMPDs cultivadas al 21% O₂.

VI. SUMMARY OF RESULTS AND DISCUSSION

The capacity of the teeth to form dentine in response to the deep caries and the soft trauma suggests the important role of the dental pulp in the tissue regeneration. This owes to the fact that mesenchymal stem cells in the dental pulp have the aptitude to differentiate and form odontoblasts to give place to a new dentine (Gronthos, Mankani et al. 2000); (Zhang, Walboomers et al. 2006). Therefore, the obtention of the mesenchymal stem cells (MSCs) of the dental pulp has been the interest of several studies in the regenerative medicine.

Nowadays, the MSCs are used as a suspension of cells in clinical studies in animals and humans (Giordano, Galderisi et al. 2007), in combination with scaffolds; compatible materials used as a support for the stem cells and that are re-absorbed gradually by the enzymatic and hydrolytic degradation (Pieri, Lucarelli et al. 2009). But for such clinical uses, there are some factors that still limit their use such as the big number of cells needed and the time for their obtention, which means maintaining the cell cultures during weeks before be able to be used with the scaffolds.

In the present thesis, the most important aim was to optimize the time of obtaining and culturing the stem cells to correct the above mentioned limitations regarding the time and the cell number needed, which is actually necessary for the bone regeneration assays. Therefore, in order to preserve the original properties of the stem cells in terms of proliferation and differentiation, we tried to reach the best physiological conditions of their culturing.

The excess in the oxygen tension has been described as an important factor which could destabilize the cellular redox homeostasis (Fan, Cai et al. 2008). On the other hand, severe reductions in oxygen availability (hypoxia) also have cytotoxic effects on the cells (Chandel, Vander Heiden et al. 2000). It has been demonstrated, that cell culturing under physiological oxygen tension (3-6%) is the most appropriate for its proliferation and preservation of its original properties (Hall E. J. 2005). Therefore, in order to optimize and increase the velocity of the dental pulp stem cells proliferation, we studied the possible differences in the proliferation of DPSCs under physiological oxygen condition (3%) compared to the environmental (21%), and the molecular mechanism explaining these possible differences.

1. Optimization of the dental pulp stem cells obtention at 3% O₂

The first dental pulp stem cells (DPSCs) were isolated in 2000 (Gronthos, Mankani et al. 2000). The used method was the digestion of the dental pulp- fragmented before, with collagenase type I at 3 mg/mL and dispase at 4mg/mL during 60 min to 37°C. Many authors used this protocol to isolate DPSCs (Takeda, Tezuka et al. 2008); (Liu, Li et al. 2005). Other methods described in the literature consisted on using collagenase/dispase both at 4 mg/mL for 1 hour (Waddington, Youde et al. 2009), the digestion with collagenase type I at 3 mg/mL (Zhang, Walboomers et al. 2008), or to fragment the pulp without the application of any type of digestion. In another study, they cultivated 40 pulps

realizing the digestion with collagenase type I and type the II in combination with the thermolysin during 40 minutes at 37 ° C (Perry, Zhou et al. 2008). In all these studies, the cells were cultured at the conventional oxygen- 21 % O₂ and 5 % CO₂ with the aim to obtain stem cells independently of the time necessary for it, except the last study in which they could obtain the first cell population in 24 hours.

In our study, we could isolate dental pulp stem cells (DPSCs) of permanent teeth from 110 patients, between 14 and 67 years old (31 men and 79 women). In 10 of these individuals, pulps have been collected of 2 different teeth. In an attempt to improve the efficiency of DPSCs isolation, we tested different methods of pulp digestion and we verified their effect on the DPSC obtention. The used enzymes for the pulp digestion require the presence of zinc and calcium. For this reason, we used a culture medium DMEM, with calcium, with low glucose 1g/L, without serum and with antibiotics. We used the enzymes: collagenase I, a metalloproteinase with the capacity to hydrolyze the native collagen; dispase II, a protease that hydrolyze the casein in the tyrosine, and thermolysin, a metalloendopeptidase that specifically catalyzes the hydrolysis of peptide bonds containing hydrophobic amino acids. Moreover, we used EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*) as a chelator of bivalent cations in Krebs buffer before the enzymatic digestion of the dental pulp.

To carry out the aim of the time optimization of the dental pulp digestion and stem cells obtention, we chose a humid physiological environment with 5% CO₂, 37°C, besides a concentration of oxygen of 3% O₂, since in the last years, it has been proved that the concentration of

the conventional oxygen (21% O₂) used in the majority of the *in vitro* studies, can cause an imbalance in the cellular redox as a result of an excess in the ROS formation (Wiseman and Halliwell 1996), which cause damages to the proteins, the lipids, the DNA and as consequence to the cell metabolism in general (Fan, Cai et al. 2008).

First, we proceeded with the mechanical disaggregation alone, with which we did not obtain any stem cells, probably because the cells weren't liberated from the dental pulp tissue. Later, besides the mechanical disaggregation (as it was used with all the next methods), to facilitate the decomposition of the dental pulp tissue and the isolation of the cells, we add EDTA at 2mg/mL during 30 min. The EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*), is a chelator of bivalent cations (such as calcium) and it is used as the cations favor the cellular adhesion. With this method we obtained stem cells after 7 days of culture with a percentage of 50 % of success. The following method that we used was the enzymatic disaggregation of the dental pulp with the enzyme type I collagenase at 2 mg/mL during 90 min. The enzymes of disaggregation are proteins that break the intercellular unions or the structures of the conjunctive tissue thus liberating the cells. The collagenase is an interstitial metalloproteinase that degrades the collagen, one of the principal components of the extracellular matrix in fragments, which are easily denaturalized and transformed in gelatin. With this method we obtained stem cells in an average of 11 ± 2 days with a percentage of 76 % of success. Also, we used the collagenase at 1mg/mL for 13 hours, with which we obtained stem cells in an average of 6 days ± 4 with a percentage of 84 % of success. Then we combined EDTA at 2mg/mL

during 10 min with collagenase I 2mg/mL 90 min, and we obtained stem cells at 6 ± 1 day with a percentage of 100 % of success. In the next method that we used, for the enzymatic digestion, we combined the enzyme dispase II at 4mg/mL with the collagenase at 2mg/mL during 90 min after the disaggregation with EDTA at 2mg/mL during 10min. With this method, we obtained stem cells in an average of 5 ± 2 days with a percentage of 76 % of success. The dispase cuts the fibronectin, the collagen IV and the fibrils of the basal membrane and degrades in minor extension, the collagen I. In the next the method, EDTA at 2mg/mL during 10 min, (collagenase I 4mg/mL + dispase II 4mg/mL) during 40 min and sonication during 1 min at 37°C: this favors the disaggregation of the tissue due to the intermolecular vibrations. With this method, we could obtain stem cells in an average of 4 days ± 2 with a percentage of 100 % of success. Also we used for the digestion of the dental pulp the enzyme thermolysin at 13ng/mL (Perry et al. 2008) with which we obtained stem cells in 20 hours with a percentage of 33 % of success. The thermolysin is a metalloendopeptidase that hydrolyzes the proteins in the terminal N of the residues of hydrophobic amino acids. Finally, the best method for the disaggregation of the dental pulp was the method using EDTA at 2mg/mL during 10 min, collagenase I at 4mg/mL, dispase II at 4mg/mL, thermolysin at 13ng/mL during 40 min and sonication for 1min at 37°C. With this method we obtained stem cells in an average of 15 ± 4 hours with a percentage of 100 % of success.

Therefore, the best used method for DPSCs obtention was: first we disaggregate mechanically the dental pulp cutting it manually in small pieces, then we proceed to the disaggregation with EDTA, chelating the

calcium which relates the intracellular cadherin's connections. After, we apply an enzymatic disaggregation using 3 enzymes: the collagenase I, for the degradation of the collagen I; the dispase II for the degradation of fibronectin, the collagen IV and the anchoring fibrils of the basal membrane and the thermolysin to hydrolyze the proteins in N terminal of the hydrophobic amino acid residues. Finally, we apply a physical disaggregation with sonication to finish the cells isolation by the intermolecular vibrations.

As a conclusion, in our study, we could minimize the time of the DPSCs obtention from a mean of 11 ± 2 days to 15 ± 4 hours with a 50min time of digestion of the dental pulp. The table 1 is a resume of the used methods for the optimization of the DPSCs obtention and contains: the number of the used method (with details above the table), the number of the dental pulps, the time of the digestion of the used dental pulp in minutes and the percent of obtaining DPSC in each method.

Nº of the method	Number of the dental pulp (N)	Time of disaggregation (min)	Time of obtention of DPSCs in days	% de obtention of DPSCs
1	6	---	---	0%
2	4	30	7	50%
3	34	90	11 ± 2	76%
4	13	780	6 ± 4	84%
5	7	100	6 ± 1	100%
6	13	100	5 ± 2	76%
7	24	50	3,8 ± 2	100%
8	16	50	0,6 (15h) ± 4h	100%
9	3	40	0,8 (20h)	33%

Table VI.1 Summary of the used methods for the optimization of DPSC isolation

Method 1: Mechanical disaggregation

Method 2: EDTA 2mg/mL 30 min

Method 3: Collagenase type I 2mg/mL 90 min

Method 4: Collagenase type I 1mg/mL 13h

Method 5: EDTA 2mg/mL 10 min + collagenase type I 2mg/mL 90 min

Method 6: EDTA 2mg/mL 10min + collagenase type I 2mg/mL+ dispase type II 4mg/mL 90min

Method 7: EDTA 2mg/mL 10 min+ collagenase type I 4mg/mL+ dispase type II 4mg/mL 40 min + sonication 1 min 37°C

Method 8: EDTA 2mg/mL 10 min + collagenase type I 4mg/mL+ dispase type II 4mg/mL+ thermolysin 13ng/mL 40 min +sonication 1min 37°C.

Method 9: thermolysin 13ng/mL 40 min

The nine used methods to optimize DPSCs isolation revealed that the method N° 8 using collagenase I, dispase II, thermolysin and sonication, is the most appropriate method. In fact, this method reduces to the minimum the time of DPSCs isolation (15 ± 4 hours), with a minimum digestion time (50 min) and a maximum performance (100%).

Perrys y cols could obtain DPSCs realizing the enzymatic disaggregation with collagenase I, II and thermolysin during 40min. and obtained the first stem cells within 24 hours in conditions of 21% O₂ and 5% CO₂ (Perry, Zhou et al. 2008), but the cells became confluent after 10 days. Karamzadeh y cols could obtain DPSCs after 3-5 days of culture using an enzymatic disaggregation with collagenase/dispase and after 5 days de culture without any kind of disaggregation (Karamzadeh, Eslaminejad et al. 2012). In the present thesis, we could obtain DPSCs in a minimum time of 15 hours realizing the enzymatic disaggregation and the tissue culture in the physiological oxygen tension (3% O₂). We could not obtain any DPSCs only with mechanical disaggregation.

In the studies about the obtention of DPSCs, the tissue cultures are realized in the environmental oxygen tension (20-21% O₂/160 mm Hg), with the aim to isolate stem cells of the dental pulp, to characterize

and differentiate them (Zhang, Walboomers et al. 2008); (Rodriguez-Lozano, Insausti et al. 2012), to cryopreserve them (Collart Dutilleul, Thonat et al. 2012) or/and for their clinical use (d'Aquino, De Rosa et al. 2009); (Pisciotta, Riccio et al. 2012). For the same aims, the physiological oxygen tension (3-6 % O₂/ 20-40 mmHg) (Hall E. J. 2005) is an essential parameter that it has to be respected not only for obtaining cells within a minimum time but also for a maximum proliferation rate as we will comment in the next points. Very few studies focused on minimizing the time of DPSCs obtention, even if it is a limiting factor for the chirurgical practice as we already mentioned.

2. Characterization of the dental pulp stem cells (DPSCs)

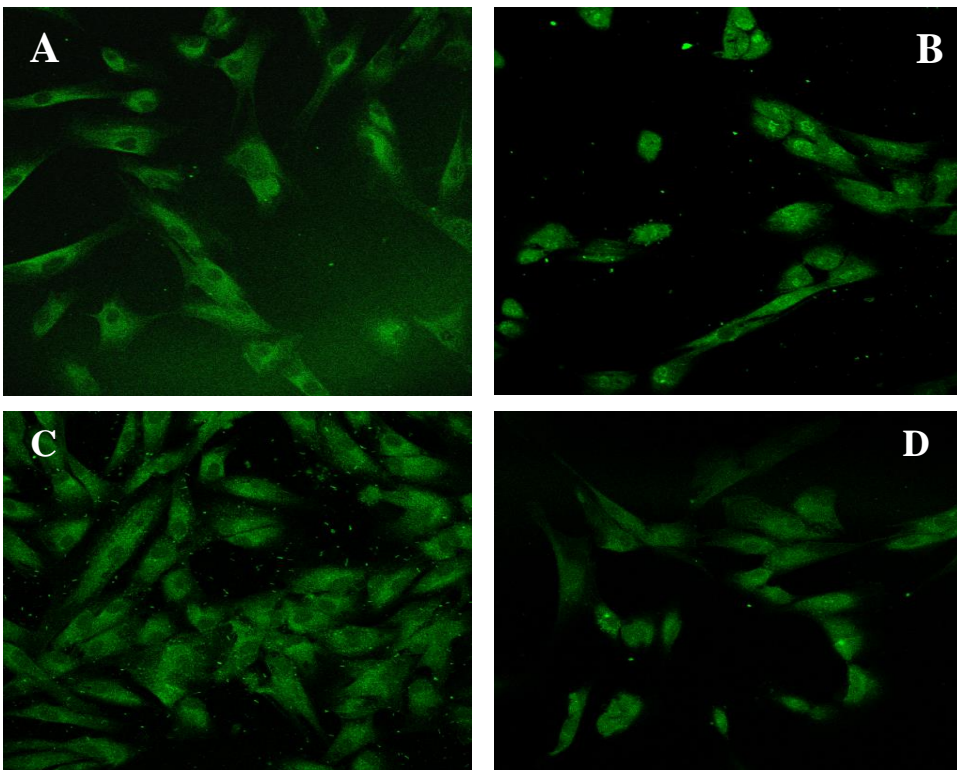
To ensure that the obtained stem cells met minimal criteria to be called MSCs, the authors use a serie of positive and negative markers, but it is necessary to indicate that there is not any specific marker that characterizes exclusively the mesenchymal DPSCs. The group of Kerkis et al. 2006, cultured stem cells of deciduous teeth positive for the markers of embryonic stem cells, OCT-4, Nanog, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, confirming the pluripotency of these cells (Kerkis, Kerkis et al. 2006). Recently, the group of Waddington (Waddington, Youde et al. 2009), isolated different DPSC of rats using several culturing protocols. They cultured stem cells from neuronal crest positive for STRO-1, CD31 (a marker of mature stem cells), LANGFR (a marker of cells from the neuronal crest), CD105 and Notch-2 (a surface marker of endothelial

cells). On the other hand, they cultured bone marrow stem cells which were only positive for STRO-1, CD31 and fibronectin. The differentiated DPSC to osteoblasts are still positive for STRO-1 but negative for CD34 y CD117. They are also positive for alkaline phosphatase (a hydrolyzing enzyme particularly high in bone), calcein, osteonectin (a phosphoglicoprotein, receptor in the membrane of the osteoblasts), CD54, CD44 y RUNX-2 (Papaccio, Graziano et al. 2006).

In the present thesis, the phenotype of the DPSCs has been confirmed by 5 positive and one negative marker in cells from 4 to 6 passages in 2 different lines from different patients. We used positive markers described in the bibliography for mesenchymal stem cells: STRO1, a putative marker of stem cells (Gronthos, Graves et al. 1994); OCT4, a marker necessary for maintaining the pluripotentiality in embryonic stem cells and expressed in embryonic murine and human stem cells (Nichols, Zevnik et al. 1998); (Donovan 2001); CD133, a marker expressed in stem cells able to form stem cells from hematopoietic, endothelial and myogenic origin (Meregalli, Farini et al. 2010); Nestin, a marker of neuronal stem cells (Lendahl, Zimmerman et al. 1990), odontoblastic and hematopoietic germinal teeth stem cells (Kenmotsu, Matsuzaka et al. 2010); (Terling, Rass et al. 1995); (About, Laurent-Maquin et al. 2000) and more recently demonstrated in DPSCs (Honda, Hirose et al. 2007); CD34, expressed in stem cells of the human and murine hematopoietic system, progenitor cells (Andrews, Singer et al. 1986); (Baumheter, Singer et al. 1993); (Wood, May et al. 1997) and human embryonic stem cells (Vazao, das Neves et al. 2011). Moreover, we employed a negative marker of mesenchymal stem cells, CD45:

expressed in hematopoietic cells, principally leucocyte precursors (Barclay, Jackson et al. 1988); (Pittenger, Mackay et al. 1999); (Zhang, Niu et al. 2003).

We analyzed the results by confocal microscopy by specific antibodies for the stem cells markers and we found that the DPSCs were positive for STRO1; OCT1; CD133; CD34; Nestin and negative for CD45, confirming the mesenchymal stem cells phenotype of the isolated dental pulp cells (Figure VI.1).



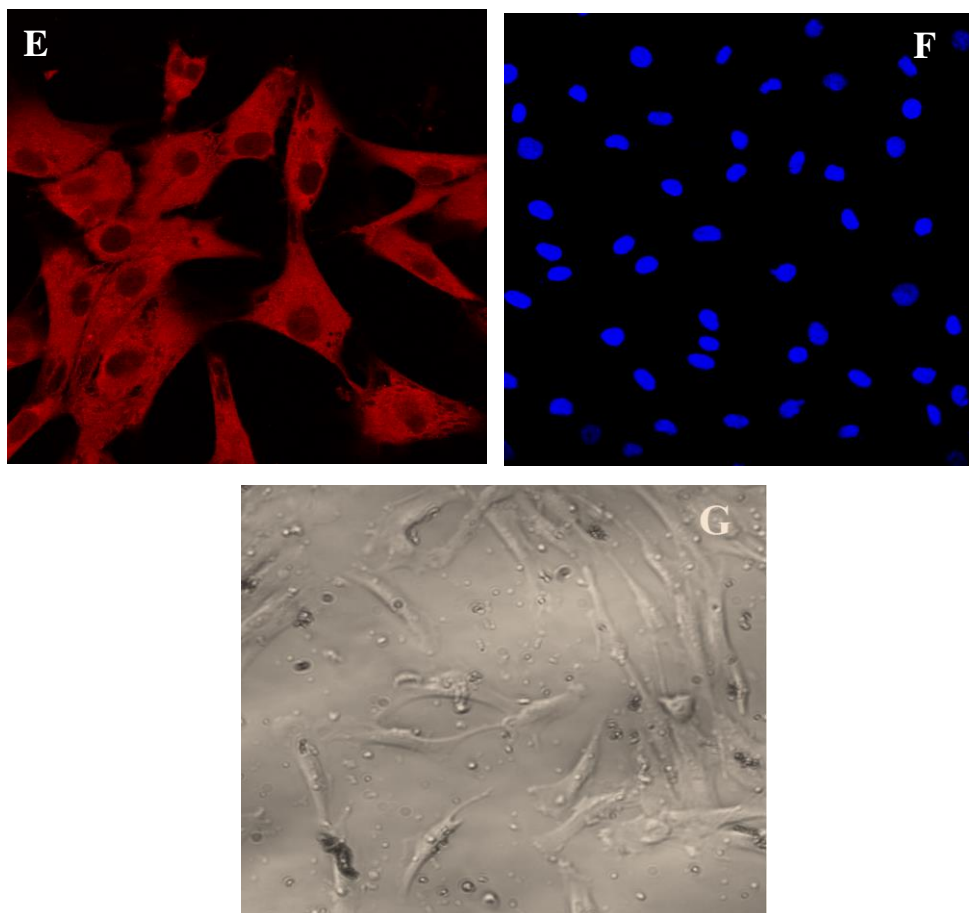


Figure VI.1 Characterization of the dental pulp stem cells by confocal microscopy (A) Image (40x) of the marker STRO-1 (B) Image (40x) of the marker OCT-4 (C) Image (40x) of the marker CD-34 (D) Image (40x) of the marker Nestin (E) Image (40x) of the marker CD-133 (F) Image (40x) of the marker CD45 (G) Image (40x) of the control cells

Given the obtained results, we confirm that the phenotype of the dental pulp stem cells used in the present thesis is like mesenchymal stem cells.

3. Parameters of oxidative stress in dental pulp stem cells cultured at 3% O₂ or 21% O₂

The normal cell function requires a stable oxidation-reduction environment. When there is an imbalance between the prooxidant and antioxidant substances in favor of the first ones, the result is oxidative stress damage that affects several molecules in the cells (Sies 1986), and this would be reflected on their physiological functions (Csete 2005).

The excess in the oxygen tension has been described as an important factor which could destabilize the cellular redox homeostasis (Fan, Cai et al. 2008). It has been demonstrated that high concentrations of oxygen can cause oxidative stress damage via production of reactive oxygen species (ROS)- free radicals that can damage lipids, proteins and DNA (Wiseman and Halliwell 1996). Although the environmental oxygen tension 20-21% O₂ (160 mmHg) is widely used *in vitro*, the physiological oxygen tension in the organism is markedly lower 3-6% O₂ (20-40 mmHg) (Hall E. J. 2005). Thus, we set ourselves the objective to mimic as possible the physiological conditions, so that we could optimize the time obtention and the growth of the DPSCs.

We studied some parameters of oxidative stress in the DPSC under environmental oxygen tension (21% O₂) compared to the

physiological tension (3-6% O₂), specifically the protein damage by measuring the protein carbonylation and the lipid damage by measuring the malondialdehyde (MDA) levels. Moreover, we supplemented the cells under the environmental oxygen condition with water soluble derivate of Vitamin E- trolox (50 μM) to verify its antioxidant effect on the parameters of oxidative stress.

We studied the parameters of oxidative stress in DPSC after 1, 3, 5 and 7 days of culture under 3 % O₂ or under 21 % O₂.

3.1 Damage to proteins by measuring the protein carbonylation

All amino acids residues in the proteins are subjected to the attack of the reactive oxygen species (ROS), especially hydroxyl radicals (Stadman 1992). The result can be a conformational change in the protein, which causes the loss or the modification of its biological function.

In the process of proteins oxidative stress damage, some amino acids such as lysine, proline and arginine, are oxidized resulting in carbonyl groups formation, so that the protein carbonyl containing could be employed as a marker of protein oxidative damage (Stadman 1992). Other amino acids like histidine, cysteine and metionine, also undergo oxidative damage, but don't form carbonyl derivates (Stadman 1992). Nevertheless, the protein carbonylation shouldn't be always considered as an oxidative damage. Effectively, García-Giménez et al. discovered an increased protein carbonylation of the histones (the proteins which compact the DNA) parallely with the increasing fibroblasts proliferation

NIH3T3 and the posterior decreased protein carbonylation with the cells confluency (Garcia-Gimenez, Ledesma et al. 2012). A possible explanation could be the existence of peptidyl lysil oxidases (LOXs) within the nucleus (Li, Nellaiappan et al. 1997), which could modify histones H1 *in vitro* (Kagan and Li 2003).

In our study, we determined the oxidative damage to proteins using the reaction of the carbonyl groups with 2,4-dinitrophenylhydrazine whose product (2,4-dinitrophenylhydrazone) can be detected by a specific antibody by Western Blotting.

When we measured the protein carbonylation in the growth curve of DPSC at 3% O₂ compared to 21% O₂ and 21% O₂ with trolox (50 μM), we obtained that on one hand, the protein carbonylation was significantly higher in DPSC cultured under 3% O₂ and 21% O₂ with trolox (50 μM) after 3 and 7 days of culture compared to those cultured under 21% O₂. After 1 and 5 days of culture, there was a significant difference between the cultured cells at 3% O₂ and 21% O₂ with trolox 50 μM. On the other hand, there was an increase in the protein carbonylation which reached its maximum point after 5 days of culture at 21% O₂, and after 3 days of culture for the cells cultured at 21% O₂ with trolox (50 μM), after which, there was a diminution of the protein carbonylation by confluence in all conditions (figure VI.2).

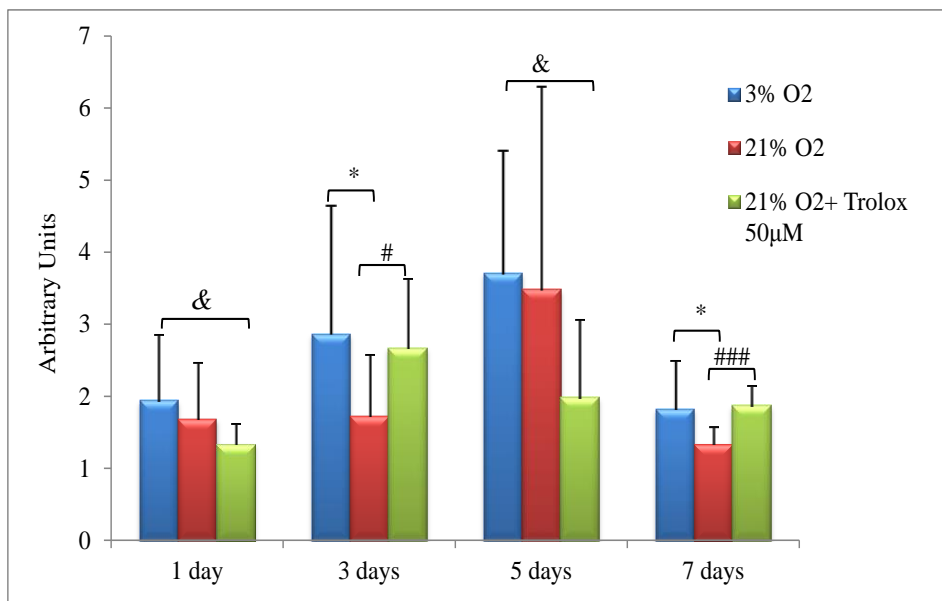


Figure VI.2 Protein carbonylation in DPSCs cultured at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50 μM) at 1, 3, 5 y 7 days of culturing. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05; (***) p<0.001

Therefore, the protein carbonylation in DPSCs is significantly higher at 3% O₂ and 21% O₂ with Trolox (50 μM) in comparison with 21% O₂ after 3 and 7 days of culture. Also, we can observe that the protein carbonylation increases with the cell proliferation and diminishes with the confluence of the cells.

3.2 Lipid peroxidation determined by measuring malondialdehyde (MDA)

The malondialdehyde is one of the products generated during the process of oxidation of the lipids principally in the biological membranes.

It is able to induce a structural alteration and as a consequence the loss of fluency. It is the reason why it is a widely used marker for measuring lipid oxidation.

In the bibliography, there are not any studies until now that have compared the lipid damage in cells cultivated under environmental oxygen tension compared to the physiological. In our study, we can observe, there was a significant difference in the MDA levels in DPSCs cultured under 3% O₂ compared to those under 21% O₂ after 7 days of culturing and also a significant difference between the cells cultured under 21% O₂ and 21% O₂ with Trolox cultured under (50 μM), after 5 and 7 days of culture (Figure VI.3).

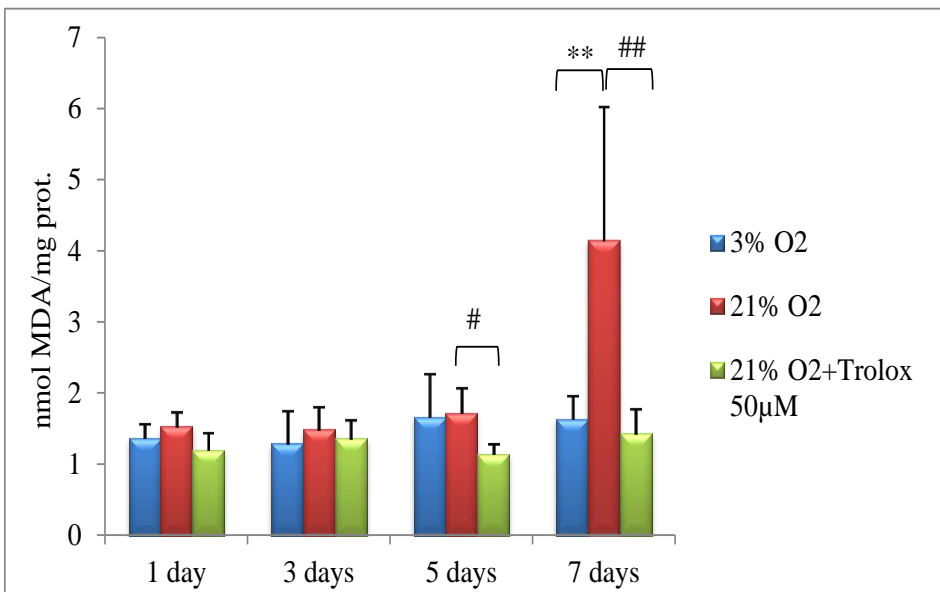


Figure VI.3 Lipid oxidation in DPSCs cultured at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50 μM) at 1, 3, 5 y 7 days of culturing. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05, (**) p<0.01

As a conclusion, there is a significant difference in the lipid peroxidation of the DPSCs cultured under 3% O₂ and 21% O₂, and after 5 and 7 days of culture, the MDA levels are significantly higher in DPSC under 21% O₂ compared to 21% O₂ with Trolox (50 µM).

4. Proliferation of dental pulp stem cells cultured under 3% O₂ or 21% O₂

The cellular proliferation is highly regulated by a set of factors that allow to control the cell cycle depending on the conditions of the cells (Ross 2007). The physiological concentration of oxygen is one of the basic conditions that must be respected. Nowadays, there are increasingly *in vitro* studies of cells cultured under different conditions of oxygen.

Many studies demonstrated the low proliferation rate of stem cells at the environmental oxygen tension (20-21% O₂) compared to the physiological (3-6% O₂). It has been described in many types of stem cells: neuronal stem cells (Rodrigues, Diogo et al. 2010), bone marrow stem cells (Dos Santos, Andrade et al. 2010); (Hung, Ho et al. 2012), umbilical cord stem cells (Lavrentieva, Majore et al. 2010), adipose tissue stem cells (Efimenko, Starostina et al. 2011); (Kim, Song et al. 2012), murine embryonic fibroblasts (Parrinello, Samper et al. 2003) and human fibroblasts WI-38 (von Zglinicki, Saretzki et al. 1995). The last study explained the low proliferation rate of the fibroblasts cultivated at the environmental oxygen tension with telomere shortening while

another study related it with DNA damage (Parrinello, Samper et al. 2003).

Another parameter studied in the environmental oxygen tension was the ROS production. Fan et al. found that in the cells from the umbilical cord blood CD34 positive, there was a high formation rate of anion superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in cells cultivated at 20% O_2 compared to those cultivated at 5% O_2 (Fan, Cai et al. 2008). Also, it has been demonstrated a significant increase in ROS formation in macrophages cultured at 20% O_2 compared to 5% O_2 (Pfau, Schneider et al. 2004). In myoblasts C2C12, Hansen et al. observed significantly increased ROS formation in cells cultured at 20% O_2 compared to 5-6% O_2 (Hansen, Klass et al. 2007).

Hung et al. demonstrated that the osteogenic differentiation is more induced when the bone marrow mesenchymal stem cells are cultivated at 1% O_2 in comparison with 20% O_2 (Hung, Ho et al. 2012). Moreover, they showed that the physiological oxygen tension induced important genes as Oct4, Nanog, Sall4 y Klf4 (Hung, Ho et al. 2012). Also, the hypoxia-induced factor of transcription HIF 2 α regulates the expression of the transcription factor Oct-4, essential for maintaining the pluripotentiality (Covello, Kehler et al. 2006); (Forristal, Wright et al. 2010) and for the expression of Sox2, Nanog which maintain the stem cells characteristics and inhibit the promoter genes of differentiation (Boyer, Lee et al. 2005).

The oxygen consumption of the umbilical cord stem cells cultivated at 21% O₂ was demonstrated to be 5 times higher compared to those cultivated at 2,5-5% O₂ (Lavrentieva, Majore et al. 2010).

The chromosomal integrity is directly related with oxidative stress (Csete 2005); (Woo and Poon 2004). There is a study which observed less spontaneous chromosomal aberrations in human embryonic stem cells cultivated at 2% O₂ en comparision 20% O₂ (Forsyth, Musio et al. 2006).

A study about bone marrow stem cells (Hung, Ho et al. 2012) and another about adipose tissue stem cells (Kim, Song et al. 2012), observed that the oxygen tension affected the physiological motility of the cells. In fact, the physiological hypoxia increased the ability of the cell migration and regulated the mesenchymal genes expression as fibronectin, N-cadherin (adhesion molecules) and vimentin: a mesenchymal marker and one of the fibrotic proteins which form the intermediate filaments of the intracellular cell skeleton, particularly the embryonic stem cells (Fuchs and Weber 1994).

Finally, it has been demonstrated that the rat neuronal stem cells cultivated at physiological oxygen conditions undergo less apoptosis compared to those cultivated at environmental oxygen (Studer, Csete et al. 2000); (Bhandari, Choo-Wing et al. 2006).

Therefore, we chose the aim to study the cell proliferation of the DPSCs in the physiological oxygen condition (3% O₂) compared to the environmental oxygen condition (21% O₂) and the environmental oxygen

with an antioxidant (trolox 50 μ M), looking for the possible effect of oxidative stress.

4.1 Adhesion of DPSCs under 3% O₂ or 21% O₂

The adhesion of the cells to the *in vitro* surface is an important parameter when elaborating a growth curve. Nevertheless, till now, any study has determined the cellular adhesion under different oxygen tensions. (Dos Santos, Andrade et al. 2010); (Efimenko, Starostina et al. 2011); (Lavrentieva, Majore et al. 2010); (Rodrigues, Diogo et al. 2010). The rate of the cellular adhesion can be considered as the capacity of recovery of the cells after a passage in the same culture conditions and the posterior expression of adhesion proteins.

Our study showed that the DPSCs adhesion under 21% O₂ stucked 30% less to the flask surface compared to those cultured at the physiological condition of 3% O₂.

4.2 Growth curve of DPSCs under 3% O₂ or 21% O₂

After studying the parameters of oxidative stress in DPSCs under different oxygen tensions, we studied the cells proliferation in the same conditions. In order to have the same number of cells from the start point of adhesion (6h), we seeded 30 % more cells under 21 % O₂ and we started the Trolox (50 μ M) treatment after the cells adhesion during the entire growth curve. The proliferation was evaluated at 6h, 1, 2, 3, 5, 7 and 8 days after seeding. The proliferation of the DPSCs was significantly higher at 3% O₂ compared to 21% O₂ in all the time course of the growth curve. The trolox reverted the effect of the increased oxygen tension on the proliferation after 3, 5, 7 and 8 days of after

culturing (Figure VI.4). The cell viability was higher than 90% in all oxygen conditions.

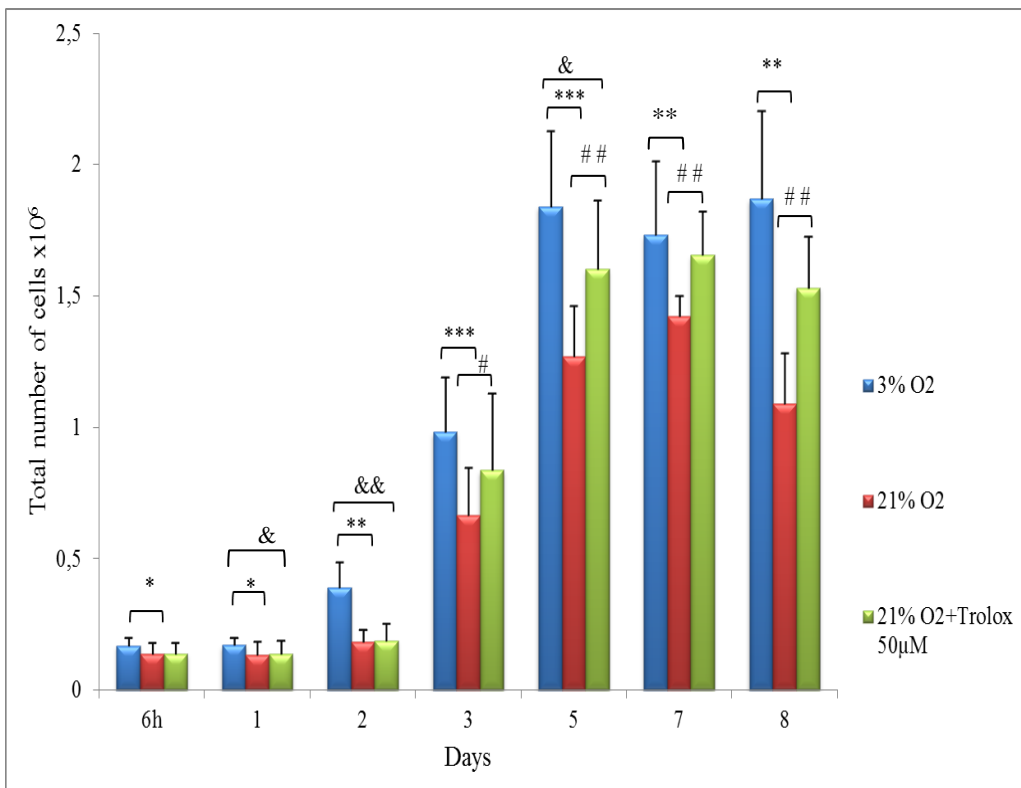


Figure VI.4 Growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50μM).

The values of the results are represented as the average \pm SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Therefore, we might say that the proliferation of DPSCs was significantly higher under 3% O₂ in comparison with 21% O₂ at 6h, 1, 2, 3, 5, 7 and 8 days after seeding. Trolox 50 μM reverted the effect of the increased oxygen tension on the proliferation, this fact showed that, the oxidative stress of DPSCs cultured under 21% O₂ was affecting to the

proliferation rate, which is thus an inadequate condition for the normal cell function.

In the present thesis, we confirmed not only the minor proliferation of the stem cells in environmental oxygen tension compared to the physiological, but also we found that the adhesion of these cells at 21% O₂ is 30% less when compared to 3% O₂, which is a parameter that was not studied till now. Moreover, we show that oxidative stress is responsible for these differences, as trolox was able to revert the different proliferation under 21% O₂.

5. Cell cycle regulation in DPSCs

The cell cycle has two principal phases: the phase S (interface) and the phase M (mitosis), characterized by the division of the genome. Other three phases subdivide additionally the interface: the phase G1 (gap1), the phase S (of synthesis of the DNA) and the phase G2 (gap2). The interface is constituted by the succession of the phases G1, S and G2 and normally is 90 % or more of the total time of the cell cycle. The regulation of the cell cycle is mediated by proteins that are synthesized and degraded during the cycle. The protein complexes in the points of control along the cell cycle can stimulate the cell to enter in the cell cycle or to go out of it, as they stimulate the growth and the division when the conditions are favorable or inhibit them when the conditions are unfavorable (Ross 2007). In response to DNA damage, the cells are auto regulated by the points of control of the cell cycle to allow the DNA repair. Two principal points of control have been characterized: the point

G1/S, including the previous and the same phase of the synthesis of DNA (S) and the point G2/M before the cell division (Zhou and Elledge 2000). In the phase G1, there are 2 points of control that check the progression of the cell: the restriction point, in which the cell autoevaluates its own replicative capacity to enter into the S phase and the point of control of the DNA damage, in which is verified the integrity of the DNA newly duplicated. In the phase S, there is a point of control of the quality of the DNA in process of duplication. Finally, in the phase G2, there are 2 points of control that verify the DNA damage and not duplicated DNA to be able to enter or not in the phase M.

5.1 Protein expression of pp38

The protein p38 is one of the principal MAP-kinase that regulates several biological processes in mammals (Ono and Han 2000). Initially, it was identified as a key mediator of inflammation and react to oxidative stress with its phosphorylation into the active form pp38.

In the eukaryotic cells, the MAPK p38 is one of the sensitive pathways to the stress stimuli that damages DNA and interact with the regulation of the points of control in G1/S (Ito, Hirao et al. 2006) and G2/M (She, Chen et al. 2000), to allow the DNA repair. Besides the regulation of the cell cycle, it is involved in the regulation of the cell differentiation, senescence and apoptosis (Nebreda and Porras 2000); (Johnson and Lapadat 2002); (Han and Sun 2007); (Hui, Bakiri et al. 2007).

In our studies, we obtained that the phosphorylation of the protein p38 is significantly higher in DPSC under 21% O₂ in comparison with cell cultured al 3% O₂ and 21% O₂ with trolox 50 μM after 5 and 7 days of culture (figure VI.5), thus indicating an activation of p38 by oxidative stress to control the cell cycle.

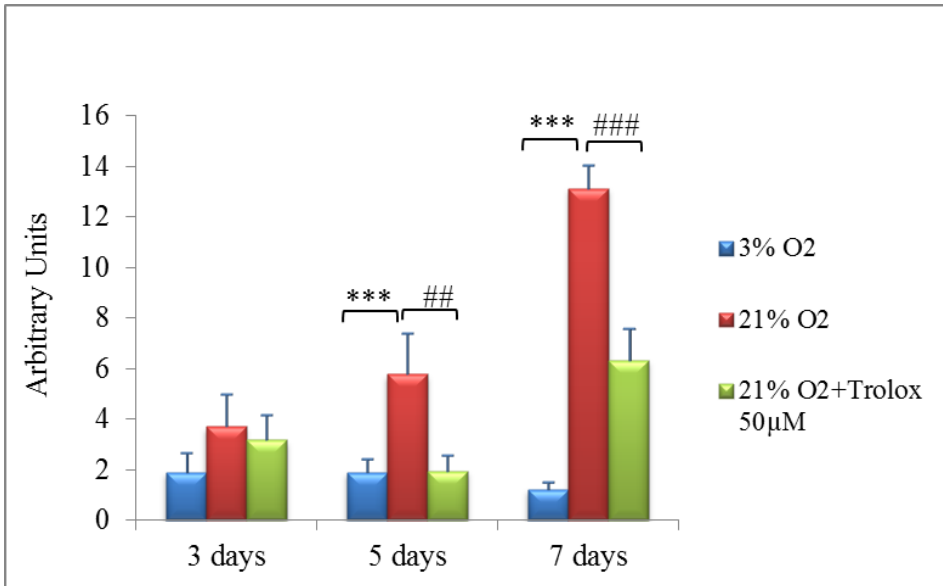


Figure VI.5 Phosphorylation of p38 in the growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50μM) at 3, 5 and 7 days after seeding. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (**) p<0.01; (***) p<0.001.

5.2 Protein expression of the protein p21^{Waf1/Cip1}

p21^{Cip1/Waf1} is a member of Kip/Cip family proteins, inhibitors of CDKs (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip1}) (Ball 1997). This inhibitor was identified simultaneously by two independent research groups, and it was named like *wild-type p53-activated fragment 1* (Waf1) and *CDK-interacting protein 1* (Cip1). As the name indicates, p21^{Cip1/Waf1} is under the control of p53, one of the tumor suppressors, which leads defective cells into apoptosis. The principal role of p21^{Cip1/Waf1} in the regulation of the cell cycle ensues from its capacity to inhibit the activity of the complex cycling A, E/CDK2 needed for the G1/S transition and therefore, the detention in the phase G1 (Deng, Zhang et al. 1995). Likewise, p21^{Waf1/Cip1} regulates several cellular processes apart of the cell cycle, the replication and the DNA repair, senescence and apoptosis (Dotto 2000); (Gartel and Tyner 2002); (Li, Waga et al. 1994); (O'Reilly 2005), and in response to oxidative stress, p21^{Waf1/Cip1} is overexpressed to promote the cell survival (Esposito, Cuccovillo et al. 1998); (Gartel and Tyner 2002); (O'Reilly, Staversky et al. 2001); (Poon and Hunter 1998).

In the present thesis, we studied the protein expression of p21^{cip1/waf1} in the growth curve of dental pulp stem cells (DPSCs) under 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50µM) at 3, 5 and 7 days after seeding. We obtained that the protein expression of p21^{Cip1/ Waf1} at 3 and 5 days after seeding was significantly higher in cells cultured at 21% O₂ and 21% O₂ with trolox 50 µM in comparison with those cultured at 3% O₂. Moreover, 3 days after seeding, there was a significant difference between the conditions in the protein expression at 21% O₂ and 21% O₂ with Trolox 50 µM (figure VI.6).

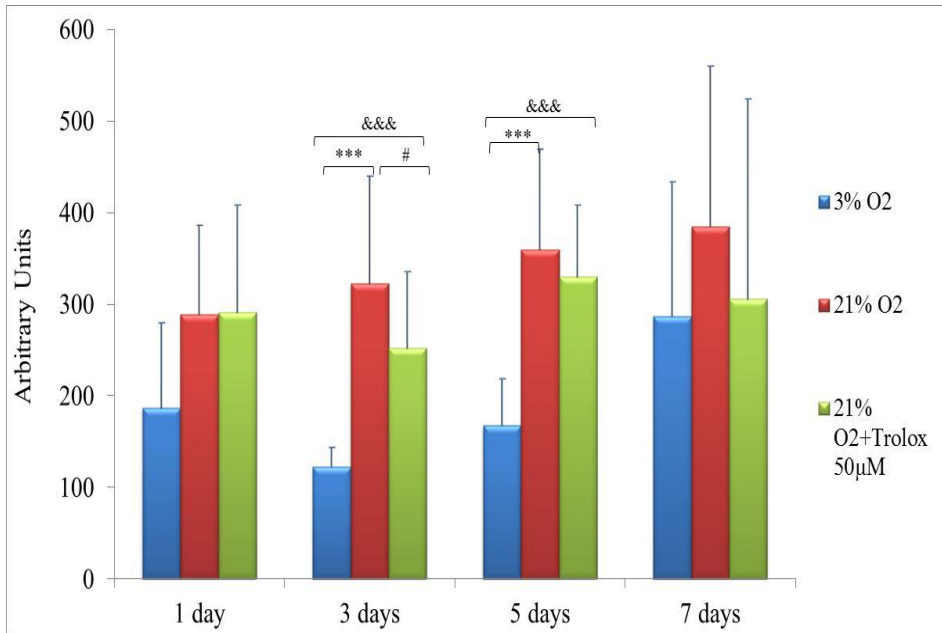


Figure VI.6 Protein expression of p21^{Waf1/Cip1} in the growth curve of DPSCs at 3% O₂, 21% O₂ or 21% O₂ +Trolox (50 μM) at 1, 3, 5 and 7 days after seeding. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05; (***) p<0.001.

Therefore, the expression of the protein p21^{Waf1/Cip1} in DPSC is significantly higher under 21 % O₂ and 21 % O₂ with trolox (50 μM) after 3 and 5 days of culture compared to 3 % O₂ and the trolox (50 μM) doesn't revert the high p21 protein expression at 21 % O₂.

Oxidative stress-induced p21^{Waf1/Cip1} expression generally acts *via* a p53-dependent mechanism (el-Deiry, Tokino et al. 1995); (Giono and Manfredi 2006); nevertheless, there is also a p53-independent pathway (O'Reilly 2005). It has been shown that the MAP-kinase p38 phosphorylate p21^{Waf1/Cip1} in response to oxidative stress stimuli by inducing phosphorylation at Ser130 *in vitro* and *in vivo* (Kim, Mercer et

al. 2002). In our study, the protein expression of pp53 doesn't correlate with p21^{Cip1/waf1} protein expression (data not shown). On the other hand, the higher pp38 protein expression under 21 % O₂ compared to 3 % O₂, correlates with the higher p21 protein expression in the same oxygen conditions. So we can conclude that regulation of the p21 protein expression in dental pulp stem cell under 3% O₂ and 21 % O₂ is p53-independent and that the MAPK-p38 is probably involved in the p21 regulation.

6. Defenses against oxidative stress

The normal cell function requires a stable oxidation-reduction environment, and eukaryotic cells have evolved endogenous antioxidant defenses to counteract oxidative stress. Among them, the Nrf2/ARE (Nuclear factor of transcription/Antioxidant response element) pathway has emerged as the most important transcription mechanism involved in upregulating antioxidant genes and maintaining cellular redox homeostasis (Motohashi and Yamamoto 2004). The redox-sensitive transcription factor nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) serves as a regulator of cell survival, and the coordinated induction of defense enzymes is controlled through a cis-acting element designated antioxidant response element (ARE) or electrophile response element within the regulatory regions of target genes. In under basal conditions, the nuclear transcription factor Nrf2, is targeted for proteasome degradation via its cytosolic regulatory protein Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (Kang,

Kobayashi et al. 2004). The reactive oxygen species-(ROS) and electrophilic agents lead to modifications in cys residues of Keap1 (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (Kato, Iida et al. 2005); (McMahon, Itoh et al. 2003) and spatial alterations in the Nrf2-Keap1 complex (Itoh, Wakabayashi et al. 1999); (McMahon, Itoh et al. 2003); (Wakabayashi, Itoh et al. 2003), resulting in nuclear accumulation of Nrf2 and upregulation of ARE-linked gene expression *in vivo* and *in vitro* (Dinkova-Kostova, Holtzclaw et al. 2002); (Kobayashi, Li et al. 2009). ARE is located in the genes encoding phase II detoxifying and antioxidant enzymes, including NQO1, GST, glutamate cysteine ligase (GCL) subunits, HO-1, and the cystine/ glutamate transporter (xCT) (Hayes, Chanas et al. 2000); (Mann, Bonacasa et al. 2009); (Motohashi and Yamamoto 2004).

Previous studies have shown the upregulation of Nrf2/ARE pathway by hyperoxia (Godman, Chheda et al. 2010), (Papaiahgari, Zhang et al. 2006). In the present thesis, we studied the effect of the environmental oxygen tension in DPSC, on the Nrf2/ARE defense via the expression of the proteins heme oxygenase 1 (HO-1) and NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO-1).

The inducible protein heme oxygenase-1 (HO-1) catalyzes the oxidation of heme to carbon monoxide (CO) and biliverdin, which exerts a concerted cytoprotective effect against oxidative stress and modulate cell proliferation and differentiation (Otterbein and Choi 2000). It has been reported that the HO-1 pathway is a key mechanism for the adaptation of human dental pulp cells (HDPCs) and periodontal ligament cells (PDLs) to stressful conditions and for their recovery from injurious events (Min, Hwang et al. 2006); (Min, Kwon et al. 2006); (Pi,

Kim et al. 2007); (Lee, Pi et al. 2007); (Lee, Min et al. 2008); (Kook, Hwang et al. 2009); (Kook, Lee et al. 2009). Moreover, several studies have shown that HO-1 expression is related to adipogenesis in human mesenchymal stem cells (MSCs) (Kim, Burgess et al. 2008), osteoblastic differentiation in PDLCS (Lee, Min et al. 2008); (Lee, Choi et al. 2009), and neuronal differentiation in MSCs (Barbagallo, Tibullo et al. 2008).

In order to study the Nrf2 oxidative stress defense in DPSCs under 5% O₂ and 21% O₂, we induced oxidative stress by treating confluent cells with diethylmaleate (DEM)-a potent GSH depleting agent at concentrations of 50µM and 100µM during 8 and 24 hours of culturing. We found that there was a significantly higher heme oxygenase 1 protein expression at 21% O₂ comparing to 5% O₂, after 24 hours in controls and DEM (100 µM) treated cells. Moreover, the DPSC cultured under physiological oxygen tension recovered significantly faster the HO-1 basal levels in DEM (50 µM) treated cells compared to the environmental oxygen condition (Figure VI.7)

NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1(NQO1) is also upregulated by Nrf2 under stress conditions. It catalyzes the reduction of quinone to hydroquinones, is involved in detoxifying xenobiotics and in the protection of membrane phospholipids from oxidative damage via reduction of coenzyme Q (Kwak, Kensler et al. 2003); (Ross, Kepa et al. 2000); (Venugopal and Jaiswal 1996).

In order to study the protein expression of NQO1 as a defense mechanism in DPSCs, we also induced oxidative stress at 5% O₂ and 21% O₂ treating confluent cells with diethylmaleate (DEM) at 50µM or 100 µM during 8 and 24 hours of culture. We found that there was

significantly higher NQO1 protein expression at 21% O₂ comparing to 5% O₂ after 8 hours in controls and DEM (100 μM) treated cells, and at 24 hours in controls and DEM (50μM-100μM) treated cells (Figure VI.8).

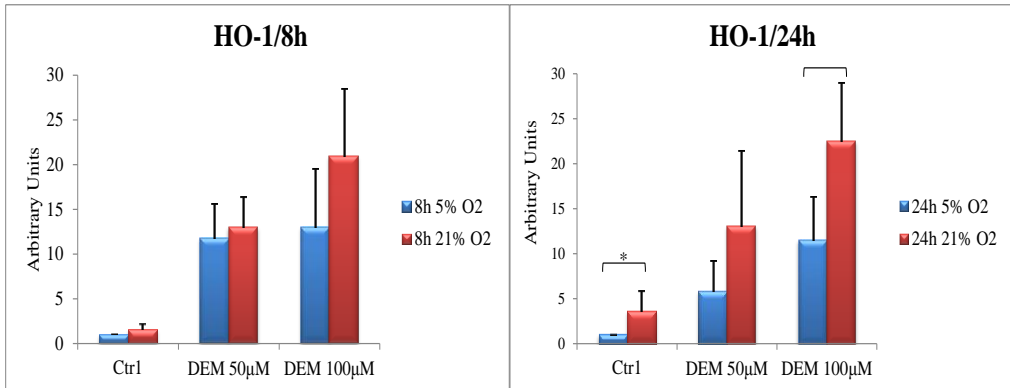


Figure VI.7 Protein expression of HO-1 in DEM (50-100μM) treated DPSCs at 5% O₂ or 21% O₂ after 8 and 24 h of treatments. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05

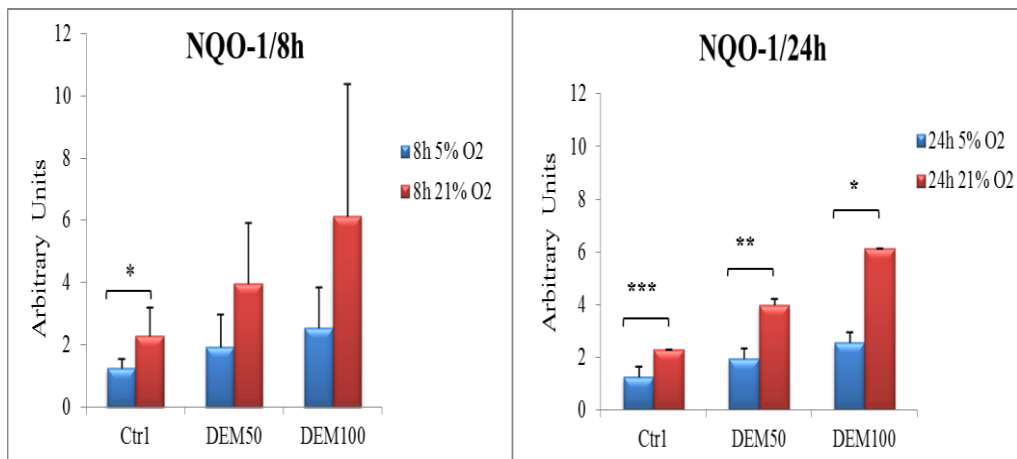


Figure VI.8 Protein expression of NQO-1 in DEM (50-100μM) treated DPSCs at 5% O₂ or 21% O₂ after 8 and 24 h of treatments. The values of the results are represented as the average ± SEM. Every point is the average of 3 realized experiments. The statistical significance is expressed as (*) p<0.05; (**) p<0.01; (***) p<0.001.

As we already mentioned, p21 is involved in many different cellular processes, including cell cycle arrest, cell differentiation, senescence, apoptosis, DNA replication and repair, and oxidative stress (Dotto 2000); (Esposito, Cuccovillo et al. 1998); (Gartel and Tyner 2002); (Lavrovsky, Schwartzman et al. 1994); (O'Reilly 2005). A recent study, showed a direct interaction between p21 and Nrf2, which may explain the cytoprotective properties of p21 when faced to oxidative stress (Chen, Sun et al. 2009). These investigators demonstrated *in vitro* that p21 is able to interact with the DLG motif within Nrf2, thereby attenuating Keap1-based ubiquitination and subsequent proteasome degradation. The antioxidative properties of p21 rely on the presence of Nrf2, as an increase in p21 concentration leads to increased transcript levels of ARE-regulated genes. On the other hand, it has been described that the MAP-kinase p38 phosphorylate p21^{Waf1/Cip1} in response to oxidative stress stimuli (Kim, Mercer et al. 2002), in fact p38 has the capacity to mediate increased protein stability of p21 by inducing phosphorylation at Ser130 *in vitro* and *in vivo*. Therefore, we propose the next mechanism as a defense against ROS aggression caused by the environmental oxygen tension and which explains our obtained results (Figure VI.9).

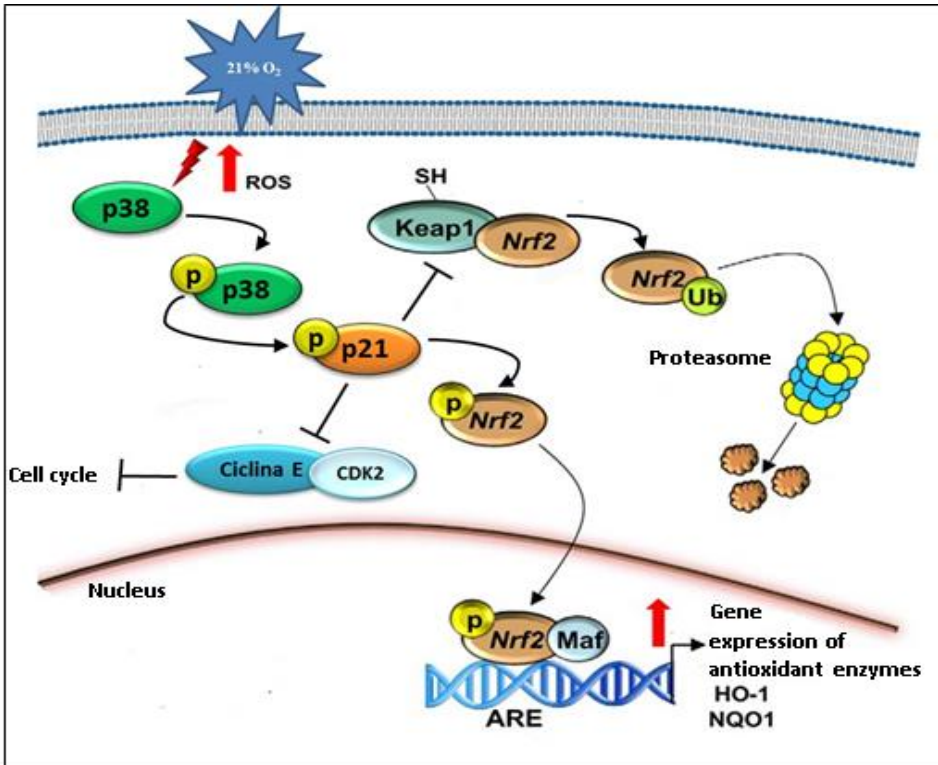


Figure VI.9 The proposed pathway of DPSC in response to oxidative stress

7. Morphological aspects of DPSCs under different oxygen tensions

The morphology and the characteristics of the cells can be analyzed in regard to their form, size and structure thanks to the optical and electronic microscopy.

In the bibliography, to our knowledge, there aren't any studies until now which focused on studying the effect of the environmental oxygen tension (20-21% O₂) as a source of oxidative stress on the cell

morphology. As we previously mentioned, the excess of the oxygen concentration induces oxidative stress which could have detrimental effects on the normal cell function in general. Therefore, the morphological characteristics is a parameter that could serve as a mirror reflecting the good or the bad cell state depending on the conditions they are merged in.

In the present thesis, the morphology of the DPSCs was evaluated in cells under different oxygen conditions and treatments. The study was focused on the comparison of the different cellular components and characteristics, as well as the differences that they present in the different phases of development.

The results of the morphologic analysis of DPSCs were that after 5 days of culture under 3 % O₂, showed that the plasmatic membrane of these cells presented abundant expansions and irregular edges. In general, these cells contained fewer dense bodies than the cells cultivated under 21 % O₂. The nuclei were oval, with a very irregular edge and its chromatin was lax. We did not find any mitosis. The cytoplasm presented abundant expansions and had high number of lipid drops. These characteristics are typical of aged cultures.

After 5 days of culture of DPSCs under 21% O₂, they reached a major size that those cultured under 3 % O₂. In one hand, their cellular edges were regular, showing a minor density of cytoplasmic expansions than the cells cultured under 3 % O₂. The nuclei were oval and the chromatin lax, but unlike the cells under 3 % O₂, the nuclei of the cells under 21 % O₂ presented regular edges. On the other hand, the DPSCs in

the 21% O₂ atmosphere, contained in its cytoplasm aberrant mitochondria, a high quantity of lysosomes and dense vesicles of small size. Moreover, their crests and their rough endoplasmic reticulum were extensive. We also found numerous mitosis in the cells, since the culture didn't reach the confluence yet and they were in the exponential phase of the growth. At 5 days of culturing, the cells cultivated to 21 % O₂ with trolox (50µM), didn't show a different phenotype from those cultivated at 21 % O₂.

The fact that we didn't find mitosis in the DPSCs at 3 % O₂ is due to its higher proliferation rate compared to those cultured at 21 % O₂, since they were already confluent after 5 days, the culture has been saturated and the growth slowed down. Therefore, the rate of mitosis must not be taken in count in this case, as a marker of ideal conditions of culture. Nevertheless, the fact that the DPSCs under 21 % O₂ didn't reach the confluence yet, is a marker of its minor proliferation rate. The DPSCs cultivated to 21 % O₂ presented aberrant mitochondria, a very extensive rough endoplasmic reticulum and a cytoplasm with a high quantity of lysosomes. All this characteristics showed that the 21 % O₂ condition is unfavorable for the DPSCs culture, which confirm the previous results showed in this thesis.

VII. CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones enumeradas a continuación:

1. Las CMPDs se pueden obtener en un mínimo tiempo de 15±4h con un mínimo tiempo de digestión (50min).
2. Las CMPDs tienen una menor tasa de adhesión (-30%) al 21% O₂ con respecto al 3% O₂.
3. Las CMPDs tienen una menor tasa de proliferación al 21% O₂ con respecto al 3% O₂.
4. La menor tasa de proliferación de las CMPDs al 21% O₂ es dependiente de estrés oxidativo.
5. La carbonilación proteica es significativamente mayor en CMPDs al 3% O₂ y 21% O₂ con trolox al 50 μM con respecto al 21% O₂. Además, aumenta con la proliferación celular y baja con la confluencia.
6. La oxidación lipídica (niveles de MDA) es significativamente mayor al en las CMPDs cultivadas al 21% O₂ en comparación con el 3% O₂ y el 21% O₂ con trolox al 50 μM.
7. Existe una activación de la MAP quinasa p38 en CMPDs cultivadas al 21% O₂ con respecto al 3% O₂ y 21% O₂ con trolox al 50 μM.
8. La expresión de la proteína p21^{Cip1/Waf1}, que regula negativamente el ciclo celular, es significativamente mayor al 21% O₂ y al 21% O₂ con trolox al 50 μM con respecto al 3% O₂.
9. La expresión de las enzimas antioxidante HO-1 y NQO1 mediados por el factor de transcripción Nrf2 es significativamente mayor al 21% O₂ con respecto al 5% O₂.

10. Los parámetros morfológicos al 21% O₂ indican una condición desfavorable de las células con respecto al 3% O₂.

VII. CONCLUSIONS

From the obtained results in the present thesis, we can conclude that:

1. The DPSCs can be obtained in a minimum time of 15 ± 4 hours with a minimum of 50 minutes time of digestion.
2. The DPSCs have a minor adhesion rate (-30%) under 21% O_2 compared to 3% O_2 .
3. The DPSCs have a minor proliferation rate under 21% O_2 compared to 3% O_2 .
4. The low proliferation rate of DPSCs under 21% O_2 is oxidative stress dependent.
5. The protein carbonylation in DPSCs is significantly higher in DPSCs under 3% O_2 and 21% O_2 with trolox (50 μ M) compared to those cultured under 21% O_2 . Moreover, it increases with the cell proliferation and decreases with confluency.
6. The lipid peroxidation (MDA levels) is significantly higher in DPSCs under 21% O_2 compared to 3% O_2 and 21% O_2 with trolox (50 μ M).
7. There exists a MAPK p38 activation in DPSCs cultured under 21% O_2 compared to 3% O_2 and 21% O_2 with trolox (50 μ M).
8. The protein expression p21^{Waf1/Cip1}, which negatively regulates the cell cycle, is significantly higher in the DPSCs under 21% O_2 and 21% O_2 with trolox (50 μ M) compared to 3% O_2 .
9. The expression of the antioxidant enzymes HO-1 and NQO1, mediated by the nuclear factor of transcription Nfr2, is significantly higher in DPSCs under 21% O_2 compared to 5% O_2 .

10. The morphologic characteristics of DPSCs under environmental oxygen tension indicates that it is an unfavorable conditions compared to 3% O₂.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- About, I., D. Laurent-Maquin, et al. (2000). "Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions." Am J Pathol **157**(1): 287-295.
- Abukawa, H., M. Shin, et al. (2004). "Reconstruction of mandibular defects with autologous tissue-engineered bone." J Oral Maxillofac Surg **62**(5): 601-606.
- Albertini, R., S. Rindi, et al. (1996). "The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation." Arch. Biochem. Biophys. **327**(2): 207-214.
- Aleman, V. and P. Handler (1967). "Hiydrorotate dehydrogenase." J. Biol. Chem. **242**: 4087-4092.
- Altman, G. H., R. L. Horan, et al. (2002). "Cell differentiation by mechanical stress." FASEB J **16**(2): 270-272.
- Ames, B. N. (1983). "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases." Science **221**: 1256-1264.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 7915-7922.
- Andrews, R. G., J. W. Singer, et al. (1986). "Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors." Blood **67**(3): 842-845.
- Azizi, S. A., D. Stokes, et al. (1998). "Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats--similarities to astrocyte grafts." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3908-3913.
- Babior, B. M. (1978). "Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes." N. Engl. J. Med. **298**: 659-668.
- Baccarini, D. P. (1978). "Coupled oxidation of NADPH wigy thiols at neutral pH." Arch. Biochem. Biophys. **191**: 315-357.
- Ball, K. L. (1997). "p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding." Prog Cell Cycle Res **3**: 125-134.
- Barbagallo, I., D. Tibullo, et al. (2008). "A cytoprotective role for the heme oxygenase-1/CO pathway during neural differentiation of human mesenchymal stem cells." J Neurosci Res **86**(9): 1927-1935.
- Barbero, A. E. G. B., J.G (2000). Desarrollo embrilógico de los dientes. Patología y terapéutica dental.
- Barclay, A. N., D. I. Jackson, et al. (1988). "The leukocyte-common antigen (L-CA) family." Adv Exp Med Biol **237**: 3-7.
- Barton, J. P. and J. E. Parker (1970). "The radolysis of oxigenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O2." Int. J. Radiat. Phys. Chem. **2**: 159-166.

- Bates, S., K. M. Ryan, et al. (1998). "Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression." Oncogene **17**(13): 1691-1703.
- Baumheter, S., M. S. Singer, et al. (1993). "Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34." Science **262**(5132): 436-438.
- Bellomo, C., S. A. Jewel, et al. (1982). "Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butylhydroperoxide." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**: 6842-6846.
- Bendich, A., L. J. Machlin, et al. (1986). "The antioxidant role of vitamins C." Free radical biology and medicine **2**: 419-444.
- Berthet, C., E. Aleem, et al. (2003). "Cdk2 knockout mice are viable." Curr Biol **13**(20): 1775-1785.
- Beyer, R. E., J. Segura-Aguilar, et al. (1996). "The role of DT-diaphorase in the maintenance of the reduced antioxidant form of coenzyme Q in membrane systems." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(6): 2528-2532.
- Bhandari, V., R. Choo-Wing, et al. (2006). "Hyperoxia causes angiopoietin 2-mediated acute lung injury and necrotic cell death." Nat Med **12**(11): 1286-1293.
- Bhasker, S. (1991). Orban's oral histology and embryology.
- Bhattacharya, S., J. D. Jackson, et al. (2003). "Direct identification and enrichment of retinal stem cells/progenitors by Hoechst dye efflux assay." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(6): 2764-2773.
- Bielsky, B. H. and J. M. Gebieki (1977). Application of radiation chemistry to biology. Free radicals in biology. P. W.A., Academic Press. **3**: 1-19.
- Biliran, H., Jr., Y. Wang, et al. (2005). "Overexpression of cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to cisplatin-mediated apoptosis in an elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line." Clin Cancer Res **11**(16): 6075-6086.
- Bissett, D. L., R. Chatterjee, et al. (1990). "Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse." Photodermatol Photoimmunol Photomed **7**(2): 56-62.
- Bizzarri, A., H. Koehler, et al. (2006). "Continuous oxygen monitoring in subcutaneous adipose tissue using microdialysis." Anal Chim Acta **573-574**: 48-56.
- Borel, J. P., J. C. Monboisse, et al. (1988). Med. Sci. **5**: 304-311.
- Borgne, A., I. Versteeg, et al. (2006). "Analysis of cyclin B1 and CDK activity during apoptosis induced by camptothecin treatment." Oncogene **25**(56): 7361-7372.
- Bosch, P., D. S. Musgrave, et al. (2000). "Osteoprogenitor cells within skeletal muscle." Journal of Orthopaedic Research **18**(6): 933-944.

- Bosch, P., D. S. Musgrave, et al. (2000). "Osteoprogenitor cells within skeletal muscle." J Orthop Res **18**(6): 933-944.
- Boveris, A., N. Oshino, et al. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxyde." Biochem. J. **128**: 617-630.
- Boyer, L. A., T. I. Lee, et al. (2005). "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells." Cell **122**(6): 947-956.
- Breen, A. P. and J. A. Murphy (1995). "Reactions of oxyl radicals with DNA." Free Rad. Biol. Med. **18**(6): 1033-1077.
- Buhring, H. J., S. Treml, et al. (2009). "Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets." Ann N Y Acad Sci **1176**: 124-134.
- Busuttil, R. A., M. Rubio, et al. (2003). "Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture." Aging Cell **2**(6): 287-294.
- Cadenas, E., P. Hochstein, et al. (1992). "Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **65**: 97-146.
- Campisi, J. (1996). "Replicative senescence: an old lives' tale?" Cell **84**(4): 497-500.
- Capdevila, L., L. Parkhill, et al. (1981). "The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P450." Biochem. Biophys. Res. Commun. **101**: 1357-1362.
- Caplan, A. I. (1991). "Mesenchymal stem cells." J Orthop Res **9**(5): 641-650.
- Carnero, A. and G. J. Hannon (1998). "The INK4 family of CDK inhibitors." Curr Top Microbiol Immunol **227**: 43-55.
- Collart Dutilleul, P. Y., C. Thonat, et al. (2012). "[Dental pulp stem cells: characteristics, cryopreservation and therapeutic potentialities]." Orthod Fr **83**(3): 209-216.
- Conget, P. A. and J. J. Minguell (1999). "Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells." J Cell Physiol **181**(1): 67-73.
- Coqueret, O. (2003). "New targets for viral cyclins." Cell Cycle **2**(4): 293-295.
- Cordeiro, M. M., Z. Dong, et al. (2008). "Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth." J Endod **34**(8): 962-969.
- Costanzi-Strauss, E., B. E. Strauss, et al. (1998). "Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRB, and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines." Exp Cell Res **238**(1): 51-62.
- Covello, K. L., J. Kehler, et al. (2006). "HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth." Genes Dev **20**(5): 557-570.

- Cristofalo, V. J. and R. J. Pignolo (1993). "Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture." Physiol Rev **73**(3): 617-638.
- Csete, M. (2005). "Oxygen in the cultivation of stem cells." Ann N Y Acad Sci **1049**: 1-8.
- Chance, B., H. Sies, et al. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol. Rev. **59**: 527-605.
- Chandel, N. S., M. G. Vander Heiden, et al. (2000). "Redox regulation of p53 during hypoxia." Oncogene **19**(34): 3840-3848.
- Cheeseman, K. H. and T. F. Slater (1993). "An introduction to free radical biochemistry." Br. Med. Bull. **49**(3): 588-603.
- Chen, W., Z. Sun, et al. (2009). "Direct interaction between Nrf2 and p21(Cip1/WAF1) upregulates the Nrf2-mediated antioxidant response." Mol Cell **34**(6): 663-673.
- Cheng, X., R. C. Siow, et al. (2011). "Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: a role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway." Antioxid Redox Signal **14**(3): 469-487.
- Chow, D. C., L. A. Wenning, et al. (2001). "Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model." Biophys J **81**(2): 675-684.
- d'Aquino, R., A. De Rosa, et al. (2009). "Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes." Eur Cell Mater **18**: 75-83.
- D'Souza, R. (2002). "Development of the pulpodentin complex." Seltzer and Bender's dental pulp: 13-40.
- Davies, K. J., A. T. Quintanilha, et al. (1982). "Free radicals and tissue damage produced by exercise." Biochem Biophys Res Commun **107**(4): 1198-1205.
- Davies, K. J. A., M. E. Delsignore, et al. (1987). "Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids." J. Biol. Chem. **262**: 9902-9907.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, et al. (2001). "Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane." Arthritis Rheum **44**(8): 1928-1942.
- Dean, R. T., S. Gieseg, et al. (1993). "Reactive species and their accumulation on radical damaged proteins." TIBS. **18**: 437-441.
- Deng, C., P. Zhang, et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." Cell **82**(4): 675-684.

- Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, et al. (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11908-11913.
- Dobashi, Y. (2005). "Cell cycle regulation and its aberrations in human lung carcinoma." Pathol Int **55**(3): 95-105.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-317.
- Donald, R. and M. D. Johns (1995). "Mitochondrial DNA and disease." N. Engl. J. Med. **333**: 638-644.
- Donovan, P. J. (2001). "High Oct-ane fuel powers the stem cell." Nat Genet **29**(3): 246-247.
- Doroshov, J. and P. Hochstein (1982). Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases. Pathology of Oxygen. New York, Academic Press: 245-253.
- Dos Santos, F., P. Z. Andrade, et al. (2010). "Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia." J Cell Physiol **223**(1): 27-35.
- Dotto, G. P. (2000). "p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?" Biochim Biophys Acta **1471**(1): M43-56.
- Drury, K. C. and S. Schorderet-Slatkine (1975). "Effects of cycloheximide on the "autocatalytic" nature of the maturation promoting factor (MPF) in oocytes of *Xenopus laevis*." Cell **4**(3): 269-274.
- Efimenko, A., E. Starostina, et al. (2011). "Angiogenic properties of aged adipose derived mesenchymal stem cells after hypoxic conditioning." J Transl Med **9**: 10.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1995). "Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues." Cancer Res **55**(13): 2910-2919.
- Ernster, L. D.-d. (1967).
- Ernster, L. N., F. (1958). "Soluble diaphorase in animal tissues." Acta Chem. Scand **12**: 595-602.
- Esposito, F., F. Cuccovillo, et al. (1998). "A new p21waf1/cip1 isoform is an early event of cell response to oxidative stress." Cell Death Differ **5**(11): 940-945.
- Estrela, J. M., G. T. Saez, et al. (1983). "The effect of cysteine and N-acetylcysteine on rat liver glutathione." Biochem. Pharmacol. **32**(22): 3483-3485.
- Fan, J., H. Cai, et al. (2008). "Comparison between the effects of normoxia and hypoxia on antioxidant enzymes and glutathione redox state in ex vivo

- culture of CD34(+) cells." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **151**(2): 153-158.
- Fenton, H. J. H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in the presence of iron." J. Chem. Soc. Trans. **65**: 899-910.
- Ferraris, G. (2009). Histologia, embriologia e ingenieria tisular bucodental.
- Forristal, C. E., K. L. Wright, et al. (2010). "Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions." Reproduction **139**(1): 85-97.
- Forsyth, N. R., A. Musio, et al. (2006). "Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities." Cloning Stem Cells **8**(1): 16-23.
- Freeman, B. A. and J. Crapo (1982). "Biology of disease: Free radicals and tissue injure." Lab. Invest. **47**: 412-426.
- Frei, B. (1994). "Reactive oxygen species an antioxidant vitamins: Mechanisms of action." Am. J. Med. **97**(3A): 5S-13S.
- Fridovich, I. (1974). "Superoxide Dismutases." Adv Enzimol **41**: 35-97.
- Fridovich, I. (1986). Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxigen Toxicity. Free Radicals and Biology. W. A. Pryor. New York, Academic Press. **1**: 239-246.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters." J. Biol. Chem. **272**(30): 18515-18517.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., A. A. Ivanov-Smolenski, et al. (1978). "Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants." Exp Hematol **6**(5): 440-444.
- Fuchs, E. and K. Weber (1994). "Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease." Annu Rev Biochem **63**: 345-382.
- Garcia-Gimenez, J. L., A. M. Ledesma, et al. (2012). "Histone carbonylation occurs in proliferating cells." Free Radic Biol Med **52**(8): 1453-1464.
- Gartel, A. L. (2005). "The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis." Leuk Res **29**(11): 1237-1238.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (2002). "The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis." Mol Cancer Ther **1**(8): 639-649.
- Gil, J. and G. Peters (2006). "Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 667-677.
- Giono, L. E. and J. J. Manfredi (2006). "The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints." J Cell Physiol **209**(1): 13-20.

- Giordano, A., U. Galderisi, et al. (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." *J Cell Physiol* **211**(1): 27-35.
- Girard, F., U. Strausfeld, et al. (1991). "Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts." *Cell* **67**(6): 1169-1179.
- Giulivi, C. and K. J. A. Davies (1993). "Dityrosine and tyrosine oxidation products are endogenous markers for the selective proteolysis of oxidatively modified red blood cell hemoglobin by (the 19 S) proteasome." *J. Biol. Chem.* **268**: 8752-8759.
- Godman, C. A., K. P. Chheda, et al. (2010). "Hyperbaric oxygen induces a cytoprotective and angiogenic response in human microvascular endothelial cells." *Cell Stress Chaperones* **15**(4): 431-442.
- Goldberg, M. and J. J. Lasfargues (1995). "Pulpo-dentinal complex revisited." *J Dent* **23**(1): 15-20.
- Goldstein, S. (1990). "Replicative senescence: the human fibroblast comes of age." *Science* **249**(4973): 1129-1133.
- Golsteyn, R. M. (2005). "Cdk1 and Cdk2 complexes (cyclin dependent kinases) in apoptosis: a role beyond the cell cycle." *Cancer Lett* **217**(2): 129-138.
- Goodison, S., V. Urquidi, et al. (1999). "CD44 cell adhesion molecules." *Mol Pathol* **52**(4): 189-196.
- Gronthos, S., J. Brahim, et al. (2002). "Stem cell properties of human dental pulp stem cells." *J Dent Res* **81**(8): 531-535.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." *J Cell Physiol* **189**(1): 54-63.
- Gronthos, S., S. E. Graves, et al. (1994). "The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors." *Blood* **84**(12): 4164-4173.
- Gronthos, S., M. Mankani, et al. (2000). "Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13625-13630.
- Gronthos, S. and P. J. Simmons (1995). "The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro." *Blood* **85**(4): 929-940.
- Gronthos, S., A. C. Zannettino, et al. (1999). "Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells." *J Bone Miner Res* **14**(1): 47-56.
- Gronthos, S., A. C. Zannettino, et al. (2003). "Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow." *J Cell Sci* **116**(Pt 9): 1827-1835.

- Haber, F. and J. Weiss (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." Naturweiss. **20**: 948.
- Haber, F. and J. Weiss (1934). "The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts." Proc. R. Soc. London. **147**: 332-351.
- Hageman, H. H., A. Bast, et al. (1992). "Monitoring of oxidative free radical damage *in vivo*: Analytical aspects." Chem. Biol. Interactions. **82**: 243-293.
- Hall E. J., G. A. J. (2005). Radiobiology for the Radiologist.
- Halliwell, B. (1991). "Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease." Am. J. Med. **91**(3C): 14S-22S.
- Halliwell, B. (1994). "Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?" Lancet **344**: 721-724.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." Annu. Rev. Nutr. **16**: 33-50.
- Halliwell, B. and O. I. Auroma (1991). "DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems." FEBS Lett. **281**: 9-19.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1995). "The definition and measurement of antioxidants in biological systems." Free Radic Biol Med **18**(1): 125-126.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1985). Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1986). "Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts." Arch. Biochem. Biophys. **246**: 501-514.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1989). Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview." Methods Enzymol. **186**: 1-85.
- Han, J. and P. Sun (2007). "The pathways to tumor suppression via route p38." Trends Biochem Sci **32**(8): 364-371.
- Hansen, J. M., M. Klass, et al. (2007). "A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle." Cell Biol Int **31**(6): 546-553.
- Harada, S. and G. A. Rodan (2003). "Control of osteoblast function and regulation of bone mass." Nature **423**(6937): 349-355.
- Harman, D. (2001). "Aging: overview." Ann N Y Acad Sci **928**: 1-21.
- Harrison, J. S., P. Rameshwar, et al. (2002). "Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers." Blood **99**(1): 394.

- Hasebe, Y., S. Hasegawa, et al. (2011). "Analysis of cell characterization using cell surface markers in the dermis." J Dermatol Sci **62**(2): 98-106.
- Hayes, J. D., S. A. Chanas, et al. (2000). "The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin." Biochem Soc Trans **28**(2): 33-41.
- Hayflick, L. (1991). "Aging under glass." Mutat Res **256**(2-6): 69-80.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, et al. (1992). "Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies." Bone **13**(1): 69-80.
- Hengst, L. and S. I. Reed (1998). "Inhibitors of the Cip/Kip family." Curr Top Microbiol Immunol **227**: 25-41.
- Hinds, P. W., S. F. Dowdy, et al. (1994). "Function of a human cyclin gene as an oncogene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 709-713.
- Hirai, H., M. F. Roussel, et al. (1995). "Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6." Mol Cell Biol **15**(5): 2672-2681.
- Hiomura, K., J. W. Pippin, et al. (1999). "Modulation of apoptosis by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1)." J Clin Invest **103**(5): 597-604.
- Hoang, A. T., K. J. Cohen, et al. (1994). "Participation of cyclin A in Myc-induced apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(15): 6875-6879.
- Holmgren, A. (1979). "Glutathione dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*." J. Biol. Chem. **254**: 3664-3671.
- Honda, A., M. Hirose, et al. (2007). "Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(30): 12389-12394.
- Hopkins, F. G. (1921). "On an Autoxidisable Constituent of the Cell." Biochem J **15**(2): 286-305.
- Hu, B., F. Unda, et al. (2006). "Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells." J Dent Res **85**(5): 416-421.
- Huang, X., A. Kurose, et al. (2006). "Activation of ATM and histone H2AX phosphorylation induced by mitoxantrone but not by topotecan is prevented by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine." Cancer Biol Ther **5**(8): 959-964.
- Hui, L., L. Bakiri, et al. (2007). "p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis." Cell Cycle **6**(20): 2429-2433.
- Hung, S. P., J. H. Ho, et al. (2012). "Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells." J Orthop Res **30**(2): 260-266.

- Hunter, T. and J. Pines (1991). "Cyclins and cancer." *Cell* **66**(6): 1071-1074.
- Igura, K., X. Zhang, et al. (2004). "Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta." *Cytotherapy* **6**(6): 543-553.
- Ito, K., A. Hirao, et al. (2006). "Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells." *Nat Med* **12**(4): 446-451.
- Itoh, K., N. Wakabayashi, et al. (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." *Genes Dev* **13**(1): 76-86.
- Ivanchuk, S. M., S. Mondal, et al. (2001). "The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth." *J Neurooncol* **51**(3): 219-229.
- Iwata, T., M. Yamato, et al. (2010). "Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use." *J Clin Periodontol* **37**(12): 1088-1099.
- Jaenisch, R. and R. Young (2008). "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming." *Cell* **132**(4): 567-582.
- Jafarian, M., M. B. Eslaminejad, et al. (2008). "Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **105**(5): e14-24.
- James, M. C. and G. Peters (2000). "Alternative product of the p16/CKDN2A locus connects the Rb and p53 tumor suppressors." *Prog Cell Cycle Res* **4**: 71-81.
- Jeffrey, P. D., L. Tong, et al. (2000). "Structural basis of inhibition of CDK-cyclin complexes by INK4 inhibitors." *Genes Dev* **14**(24): 3115-3125.
- Johnson, G. L. and R. Lapadat (2002). "Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases." *Science* **298**(5600): 1911-1912.
- Jones, S. A., J. D. Wood, et al. (1994). "The functional expression of p47-phox and p67-phox may contribute to the generation of superoxide by an NADPH oxidase-like system in human fibroblasts." *FEBS Lett.* **355**: 178-182.
- Kadar, K., B. Porcsalmy, et al. (2009). "[Isolating, culturing and characterizing stem cells of human dental pulp origin]." *Fogorv Sz* **102**(5): 175-181.
- Kagan, H. M. and W. Li (2003). "Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell." *J Cell Biochem* **88**(4): 660-672.

- Kang, M. I., A. Kobayashi, et al. (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(7): 2046-2051.
- Kanofsky, J. R. and P. D. Sima (1993). "Singlet-oxygen generation at gas-liquid interfaces: a significant artifact in the measurement of singlet-oxygen yields from ozone-biomolecule reactions." Photochem Photobiol **58**(3): 335-340.
- Karamzadeh, R., M. B. Eslaminejad, et al. (2012). "Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods." J Vis Exp(69).
- Kasai, H. and S. Nishimura (1984). "Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents." Nucleic Acids Res. **12**: 2137-2145.
- Katoh, Y., K. Iida, et al. (2005). "Evolutionary conserved N-terminal domain of Nrf2 is essential for the Keap1-mediated degradation of the protein by proteasome." Arch Biochem Biophys **433**(2): 342-350.
- Kemoun, P., S. Laurencin-Dalcieux, et al. (2007). "Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro." Cell Tissue Res **329**(2): 283-294.
- Kenmotsu, M., K. Matsuzaka, et al. (2010). "Analysis of side population cells derived from dental pulp tissue." Int Endod J **43**(12): 1132-1142.
- Kerkis, I., A. Kerkis, et al. (2006). "Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers." Cells Tissues Organs **184**(3-4): 105-116.
- Ketterer, B. (1986). "Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases." Xenobiotica. **16**: 957-973.
- Kim, D. H., A. P. Burgess, et al. (2008). "Heme oxygenase-mediated increases in adiponectin decrease fat content and inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in Zucker rats and reduce adipogenesis in human mesenchymal stem cells." J Pharmacol Exp Ther **325**(3): 833-840.
- Kim, G. Y., S. E. Mercer, et al. (2002). "The stress-activated protein kinases p38 alpha and JNK1 stabilize p21(Cip1) by phosphorylation." J Biol Chem **277**(33): 29792-29802.
- Kim, J. H., S. Y. Song, et al. (2012). "Primary involvement of NADPH oxidase 4 in hypoxia-induced generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells." Stem Cells Dev **21**(12): 2212-2221.

- Kim, W. Y. and N. E. Sharpless (2006). "The regulation of INK4/ARF in cancer and aging." Cell **127**(2): 265-275.
- Klopman, G. and R. D. Bendale (1989). "Computer automated structure evaluation (CASE): a study of inhibitors of the thermolysin enzyme." J Theor Biol **136**(1): 67-77.
- Kobayashi, M., L. Li, et al. (2009). "The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds." Mol Cell Biol **29**(2): 493-502.
- Koff, A., F. Cross, et al. (1991). "Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family." Cell **66**(6): 1217-1228.
- Komori, T., H. Yagi, et al. (1997). "Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts." Cell **89**(5): 755-764.
- Kook, S. H., J. M. Hwang, et al. (2009). "Mechanical force induces type I collagen expression in human periodontal ligament fibroblasts through activation of ERK/JNK and AP-1." J Cell Biochem **106**(6): 1060-1067.
- Kook, Y. A., S. K. Lee, et al. (2009). "Effects of substance P on osteoblastic differentiation and heme oxygenase-1 in human periodontal ligament cells." Cell Biol Int **33**(3): 424-428.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-10716.
- Korycka-Dahi, M. and T. Richardson (1981). "Initiation of oxidative changes in foods. Symposium: oxidative changes in milk." J. Dairy. Sci. **63**: 1181-1208.
- Kosower, N. S. and E. M. Kosower (1983). Glutathione and cell membrane thiol status. Functions of glutathione: Biochemical, Toxicological and Clinical aspects. A. Larsson, A. Holmgren, S. Orrenius and B. Mannervick. New York, Raven Press: 307-315.
- Koyama, N., Y. Okubo, et al. (2009). "Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells." J Oral Maxillofac Surg **67**(3): 501-506.
- Kozam, G. (1967). "Oxygen tension of rabbit incisor pulp." J Dent Res **46**(2): 352-358.
- Kranenburg, O., A. J. van der Eb, et al. (1996). "Cyclin D1 is an essential mediator of apoptotic neuronal cell death." EMBO J **15**(1): 46-54.
- Krinsky, N. (1994). Natural antioxidants in human health and disease. B. Frei. San Diego, Academic Press: 239-262.
- Kwak, M. K., T. W. Kensler, et al. (2003). "Induction of phase 2 enzymes by serum oxidized polyamines through activation of Nrf2: effect of the

- polyamine metabolite acrolein." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 662-670.
- Kyurkchiev, S., A. Shterev, et al. (2010). "Assessment of presence and characteristics of multipotent stromal cells in human endometrium and decidua." Reprod Biomed Online **20**(3): 305-313.
- Laino, G., R. d'Aquino, et al. (2005). "A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB)." J Bone Miner Res **20**(8): 1394-1402.
- Laino, G., A. Graziano, et al. (2006). "An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering." J Cell Physiol **206**(3): 693-701.
- Langer, R. and J. P. Vacanti (1993). "Tissue engineering." Science **260**(5110): 920-926.
- Latif, N., P. Sarathchandra, et al. (2007). "Characterization of structural and signaling molecules by human valve interstitial cells and comparison to human mesenchymal stem cells." J Heart Valve Dis **16**(1): 56-66.
- Lavrentieva, A., I. Majore, et al. (2010). "Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells." Cell Commun Signal **8**: 18.
- Lavrovsky, Y., M. L. Schwartzman, et al. (1994). "Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 5987-5991.
- Lee, S. K., H. I. Choi, et al. (2009). "Nitric oxide modulates osteoblastic differentiation with heme oxygenase-1 via the mitogen activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways in human periodontal ligament cells." Biol Pharm Bull **32**(8): 1328-1334.
- Lee, S. K., C. Y. Lee, et al. (2010). "Mechanical stress promotes odontoblastic differentiation via the heme oxygenase-1 pathway in human dental pulp cell line." Life Sci **86**(3-4): 107-114.
- Lee, S. K., K. S. Min, et al. (2008). "Mechanical stress activates proinflammatory cytokines and antioxidant defense enzymes in human dental pulp cells." J Endod **34**(11): 1364-1369.
- Lee, S. K., S. H. Pi, et al. (2007). "Substance P regulates macrophage inflammatory protein 3alpha/chemokine C-C ligand 20 (CCL20) with heme oxygenase-1 in human periodontal ligament cells." Clin Exp Immunol **150**(3): 567-575.
- Lees, S. J., T. E. Childs, et al. (2008). "p21(Cip1) expression is increased in ambient oxygen, compared to estimated physiological (5%) levels in rat muscle precursor cell culture." Cell Prolif **41**(2): 193-207.
- Lendahl, U., L. B. Zimmerman, et al. (1990). "CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein." Cell **60**(4): 585-595.

- Li, R., S. Waga, et al. (1994). "Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair." Nature **371**(6497): 534-537.
- Li, W., K. Nellaippan, et al. (1997). "Localization and activity of lysyl oxidase within nuclei of fibrogenic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 12817-12822.
- Lind, C., E. Cadenas, et al. (1990). "DT-diaphorase: purification, properties, and function." Methods Enzymol **186**: 287-301.
- Linnane, A. W., S. Marzuki, et al. (1989). "Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases." Lancet.: 642-645.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich (1994). "The role of O₂⁻ in the production of HO₂· : in vitro and in vivo." Free Radical Biol. Med. **16**: 29-33.
- Lippman, R. D. (1985). "Rapid *in vivo* quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man." Exp. Gerontol. **20**: 1-5.
- Liu, H., W. Li, et al. (2005). "MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate." Arch Oral Biol **50**(11): 923-928.
- Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, et al. (1951). "Protein measurement with the folin phenol reagent." J. Biol. Chem. **193**: 265-275.
- Lumsden, A. G. (1988). "Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ." Development **103 Suppl**: 155-169.
- Lutolf, M. P., P. M. Gilbert, et al. (2009). "Designing materials to direct stem-cell fate." Nature **462**(7272): 433-441.
- Maddika, S., S. R. Ande, et al. (2007). "Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy." Drug Resist Updat **10**(1-2): 13-29.
- Mafi, R., S. Hindocha, et al. (2011). "Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature." Open Orthop J **5 Suppl 2**: 242-248.
- Maggio, B., A. T. Diplock, et al. (1977). "Interactions of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids." Biochem J **161**(1): 111-121.
- Mann, G. E., B. Bonacasa, et al. (2009). "Targeting the redox sensitive Nrf2-Keap1 defense pathway in cardiovascular disease: protection afforded by dietary isoflavones." Curr Opin Pharmacol **9**(2): 139-145.
- Marei, M. K., S. R. Nouh, et al. (2005). "Preservation and regeneration of alveolar bone by tissue-engineered implants." Tissue Eng **11**(5-6): 751-767.

- Mason, R. P. (1982). Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. Free radicals biology. W. A. Pryor. New York, Academic Press: 262-165.
- Matthews, B. W. (1988). "Structural basis of the action of thermolysin and related zinc peptidases." Acc Chem Res **21**: 333-340.
- Matthews, B. W., L. H. Weaver, et al. (1974). "The conformation of thermolysin." J Biol Chem **249**(24): 8030-8044.
- Mazia, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.
- Mazumder, S., B. Gong, et al. (2002). "Proteolytic cleavage of cyclin E leads to inactivation of associated kinase activity and amplification of apoptosis in hematopoietic cells." Mol Cell Biol **22**(7): 2398-2409.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase . An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein)." Journal of Biological Chemistry **244**: 6049-6055.
- McCord, J. M., B. B. Keele, et al. (1974). "An enzyme based theory of obligate anaerobius: the physiological function of superoxide dismutase." Proc Natl Acad Sci USA **41**: 35-97.
- McMahon, M., K. Itoh, et al. (2003). "Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression." J Biol Chem **278**(24): 21592-21600.
- Meikrantz, W., S. Gisselbrecht, et al. (1994). "Activation of cyclin A-dependent protein kinases during apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3754-3758.
- Meregalli, M., A. Farini, et al. (2010). "CD133(+) cells isolated from various sources and their role in future clinical perspectives." Expert Opin Biol Ther **10**(11): 1521-1528.
- Miller, W. M., C. R. Wilke, et al. (1987). "Effects of dissolved oxygen concentration on hybridoma growth and metabolism in continuous culture." J Cell Physiol **132**(3): 524-530.
- Min, K. S., Y. H. Hwang, et al. (2006). "Heme oxygenase-1 mediates cytoprotection against nitric oxide-induced cytotoxicity via the cGMP pathway in human pulp cells." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **102**(6): 803-808.
- Min, K. S., Y. Y. Kwon, et al. (2006). "Effects of proinflammatory cytokines on the expression of mineralization markers and heme oxygenase-1 in human pulp cells." J Endod **32**(1): 39-43.

- Mina, M. and A. Braut (2004). "New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes." Cells Tissues Organs **176**(1-3): 120-133.
- Miura, M., S. Gronthos, et al. (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5807-5812.
- Moncada, S., R. M. J. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: Physiology, pathology and pharmacology." Pharmacol. Rev. **43**: 109-142.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Motohashi, H. and M. Yamamoto (2004). "Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism." Trends Mol Med **10**(11): 549-557.
- Mousavi Niri, N., M. Jaberipour, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells do not suppress lymphoblastic leukemic cell line proliferation." Iran J Immunol **6**(4): 186-194.
- Nakahara, H., V. M. Goldberg, et al. (1991). "Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo." J Orthop Res **9**(4): 465-476.
- Nakata, K., M. Yamasaki, et al. (2000). "Anaerobic bacterial extracts influence production of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human dental pulp cells." J Endod **26**(7): 410-413.
- Nebreda, A. R. and A. Porras (2000). "p38 MAP kinases: beyond the stress response." Trends Biochem Sci **25**(6): 257-260.
- Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, et al. (1998). "Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication." Mol Cell Biol **18**(1): 629-643.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." Cell **95**(3): 379-391.
- Niki, E. (1987). "Antioxidants in relation to lipid peroxidation." Chem Phys Lipids **44**(2-4): 227-253.
- Nombela, C. C. S. V., C (2010). Células madre.
- Nourse, J., E. Firpo, et al. (1994). "Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin." Nature **372**(6506): 570-573.
- O'Reilly, M. A. (2005). "Redox activation of p21Cip1/WAF1/Sdi1: a multifunctional regulator of cell survival and death." Antioxid Redox Signal **7**(1-2): 108-118.

- O'Reilly, M. A., R. J. Staversky, et al. (2001). "The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress." Am J Respir Cell Mol Biol **24**(6): 703-710.
- Ochoa, S. (1983). "Regulation of protein synthesis initiation in eukaryotes." Arch. Biochem. Biophys. **223**: 325-349.
- Ohgushi, H., N. Kotobuki, et al. (2005). "Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis." Biomaterials **26**(22): 4654-4661.
- Okamoto, H. (1985). "Molecular basis of experimental diabetes degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic b-cells os islets of Langerhans." Bioassays **2**: 15-21.
- Okamoto, K. and C. Prives (1999). "A role of cyclin G in the process of apoptosis." Oncogene **18**(32): 4606-4615.
- Ono, K. and J. Han (2000). "The p38 signal transduction pathway: activation and function." Cell Signal **12**(1): 1-13.
- Orciani, M., M. A. Mariggio, et al. (2010). "Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells." Skin Pharmacol Physiol **23**(3): 124-132.
- Orrenius, S. and P. Moldeus (1984). "The multiple roles of glutathione in drug metabolism." Trends. Pharmacol. Sci. **5**: 432-435.
- Otterbein, L. E. and A. M. Choi (2000). "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1029-1037.
- Pacifi, R. E. and K. J. Davis (1991). "Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." Gerontology **37**: 166-180.
- Pachmann, K. and W. Leibold (1976). "Insolubilization of protein antigens on polyacrylic plastic beads using poly-L-lysine." J Immunol Methods **12**(1-2): 81-89.
- Pajares, M. A., C. Durán, et al. (1992). "Modulation of rat liver S-adenosylmethionine synthetase activity by glutathione." J. Biol. Chem. **267**(25): 17598-17605.
- Papaccio, G., A. Graziano, et al. (2006). "Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair." J Cell Physiol **208**(2): 319-325.
- Papaiahgari, S., Q. Zhang, et al. (2006). "Hyperoxia stimulates an Nrf2-ARE transcriptional response via ROS-EGFR-PI3K-Akt/ERK MAP kinase signaling in pulmonary epithelial cells." Antioxid Redox Signal **8**(1-2): 43-52.

- Parrinello, S., E. Samper, et al. (2003). "Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts." *Nat Cell Biol* **5**(8): 741-747.
- Parte, S., D. Bhartiya, et al. (2011). "Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary." *Stem Cells Dev* **20**(8): 1451-1464.
- Perry, B. C., D. Zhou, et al. (2008). "Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use." *Tissue Eng Part C Methods* **14**(2): 149-156.
- Pesce, M. and H. R. Scholer (2001). "Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development." *Stem Cells* **19**(4): 271-278.
- Peus, D., A. Meves, et al. (2001). "Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival." *Free Radic Biol Med* **30**(4): 425-432.
- Pfau, J. C., J. C. Schneider, et al. (2004). "Environmental oxygen tension affects phenotype in cultured bone marrow-derived macrophages." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**(2): L354-362.
- Phelps, D. E., K. M. Hsiao, et al. (1998). "Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis." *Mol Cell Biol* **18**(4): 2334-2343.
- Pi, S. H., S. C. Kim, et al. (2007). "Defense mechanism of heme oxygenase-1 against cytotoxic and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inducing effects of hydrogen peroxide in human periodontal ligament cells." *J Periodontol Res* **42**(4): 331-339.
- Pierdomenico, L., L. Bonsi, et al. (2005). "Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp." *Transplantation* **80**(6): 836-842.
- Pieri, F., E. Lucarelli, et al. (2009). "Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs." *J Oral Maxillofac Surg* **67**(2): 265-272.
- Pines, J. and T. Hunter (1989). "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2." *Cell* **58**(5): 833-846.
- Pisciotta, A., M. Riccio, et al. (2012). "Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo." *PLoS One* **7**(11): e50542.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.

- Poon, R. Y. and T. Hunter (1998). "Expression of a novel form of p21Cip1/Waf1 in UV-irradiated and transformed cells." Oncogene **16**(10): 1333-1343.
- Porter, L. A., G. Singh, et al. (2000). "Abundance of cyclin B1 regulates gamma-radiation-induced apoptosis." Blood **95**(8): 2645-2650.
- Postlethwait, E. M., S. D. Langford, et al. (1995). "NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids." Free. Radic. Biol. Med. **19**(5): 553-563.
- Rawley, D. A. and B. Halliwell (1983). "Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide and iron salts by superoxide- and ascorbate-dependent mechanism: Relevance to the pathology of rheumatoid disease." Clin. Sci. **64**: 649-653.
- Richter, C., J. W. Park, et al. (1988). "Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive." Proc. Natl. Acad. Sci. **85**: 6465-6467.
- Rodrigues, C. A., M. M. Diogo, et al. (2010). "Hypoxia enhances proliferation of mouse embryonic stem cell-derived neural stem cells." Biotechnol Bioeng **106**(2): 260-270.
- Rodriguez-Lozano, F. J., C. L. Insausti, et al. (2012). "Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation." J Craniofac Surg **23**(6): e571-575.
- Rosova, I., M. Dao, et al. (2008). "Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells." Stem Cells **26**(8): 2173-2182.
- Ross, D., J. K. Kepa, et al. (2000). "NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1): chemoprotection, bioactivation, gene regulation and genetic polymorphisms." Chem Biol Interact **129**(1-2): 77-97.
- Ross, M. H. R. P., W. (2007). Histología con biología celular y molecular.
- Royer-Pokora, B., M. Busch, et al. (2010). "Wilms tumor cells with WT1 mutations have characteristic features of mesenchymal stem cells and express molecular markers of paraxial mesoderm." Hum Mol Genet **19**(9): 1651-1668.
- Ruch, J. V. (1985). "Odontoblast differentiation and the formation of the odontoblast layer." J Dent Res **64 Spec No**: 489-498.
- Sastre, J., M. Asensi, et al. (1992). "Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration." Am. J. Physiol. **263**: R992-R995.
- Sawyer, D. T. (1988). The redox thermodynamics for dioxygen species (O₂, O₂⁻, HOO·, H₂O₂ and HOO-) and monooxygen species (O, O⁻, ·OH, and OH-) in water and aprotic solvents. Oxygen radicals in biology and medicine. M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press.: 11-20.

- Schwartz, G. K. and M. A. Shah (2005). "Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy." J Clin Oncol **23**(36): 9408-9421.
- Sevanian, A., K. Davies, et al. (1985). "Conservation of vitamin C by uric acid in blood." J. Free Radic. Biol. Med. **1**: 117-124.
- Shanti, R. M., W. J. Li, et al. (2007). "Adult mesenchymal stem cells: biological properties, characteristics, and applications in maxillofacial surgery." J Oral Maxillofac Surg **65**(8): 1640-1647.
- She, Q. B., N. Chen, et al. (2000). "ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation." J Biol Chem **275**(27): 20444-20449.
- Shen, C. C., W. Wartelecki, et al. (1995). "Repair of mitochondrial DNA damage induced by bleomycin in human cells." Mutat Res **337**(1): 19-23.
- Sherr, C. J. (2001). "The INK4a/ARF network in tumour suppression." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 731-737.
- Shi, S. and S. Gronthos (2003). "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp." J Bone Miner Res **18**(4): 696-704.
- Shibutani, S., M. Takeshita, et al. (1992). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." Nature **349**: 431-434.
- Shigenaga, M. K., T. M. Hagen, et al. (1994). "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10771-10778.
- Sies, H. (1983). Biochemistry of oxidative stress. Glutathione: storage, transport and turnover in mammals. S. Y., T. Higashi and N. Tateishi, Japan Scientific Press, Tokyo and UNU. Science Press, Utrech.: 63-69.
- Sies, H. (1986). "Biochemistry of oxidative stress." Angew. Chem. **25**: 1058-1071.
- Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. **25**.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Simmons, P. J., S. Gronthos, et al. (1994). "Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis." Prog Clin Biol Res **389**: 271-280.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb (1991). "CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow." Blood **78**(11): 2848-2853.
- Simmons, P. J. and B. Torok-Storb (1991). "Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1." Blood **78**(1): 55-62.

- Slater, T. F. (1984). "Free radical mechanism in tissue injury." Biochem. J. **222**: 1-15.
- Smith, A. (2006). "A glossary for stem-cell biology." Nature **441**(7097): 1060-1060.
- Smith, J. R. and D. W. Lincoln, 2nd (1984). "Aging of cells in culture." Int Rev Cytol **89**: 151-177.
- Smith, J. R. and O. M. Pereira-Smith (1996). "Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression." Science **273**(5271): 63-67.
- Smith, M. L., H. U. Kontny, et al. (1997). "The p53-regulated cyclin G gene promotes cell growth: p53 downstream effectors cyclin G and Gadd45 exert different effects on cisplatin chemosensitivity." Exp Cell Res **230**(1): 61-68.
- Song, L. and R. S. Tuan (2004). "Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow." FASEB J **18**(9): 980-982.
- Sparrow, C. P. and J. Olszewski (1993). "Cellular oxidation of low-density lipoprotein by thiols: Superoxide-dependent and -independent mechanisms." J. Lipid Res. **34**: 2051-2061.
- Stadman, E. R. (1992). "Protein oxidation and aging." Science **257**: 1220-1224.
- Steurer, J., U. Hoffmann, et al. (1997). "Changes in arterial and transcutaneous oxygen and carbon dioxide tensions during and after voluntary hyperventilation." Respiration **64**(3): 200-205.
- Stewart, K., S. Walsh, et al. (1999). "Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells." J Bone Miner Res **14**(8): 1345-1356.
- Studer, L., M. Csete, et al. (2000). "Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen." J Neurosci **20**(19): 7377-7383.
- Suchanek, J., B. Visek, et al. (2010). "Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis." Acta Medica (Hradec Kralove) **53**(2): 93-99.
- Suter, M. and C. Richter (1999). "Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases." Biochemistry **38**(1): 459-464.
- Takada, A., J. Neil, et al. (1982). "Clinicopathological study of alcoholic fibrosis." American Journal of Gastroenterology **77**: 660-666.
- Takeda, T., Y. Tezuka, et al. (2008). "Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs." J Dent Res **87**(7): 676-681.
- Tateishi, N., T. Higashi, et al. (1974). "Studies of the regulation of glutathione level in rat liver." J. Biochem. **75**: 90-103.

- Terling, C., A. Rass, et al. (1995). "Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development." *Int J Dev Biol* **39**(6): 947-956.
- Thesleff, I. and P. Sharpe (1997). "Signalling networks regulating dental development." *Mech Dev* **67**(2): 111-123.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-1147.
- Tsai, M. S., J. L. Lee, et al. (2004). "Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol." *Hum Reprod* **19**(6): 1450-1456.
- Tuli, R., S. Tuli, et al. (2003). "Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone." *Stem Cells* **21**(6): 681-693.
- Umemoto, T., M. Yamato, et al. (2006). "Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state." *Stem Cells* **24**(1): 86-94.
- Vazao, H., R. P. das Neves, et al. (2011). "Towards the maturation and characterization of smooth muscle cells derived from human embryonic stem cells." *PLoS One* **6**(3): e17771.
- Venugopal, R. and A. K. Jaiswal (1996). "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(25): 14960-14965.
- Viguie, C. A., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Antioxidant estatus and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise." *J. Appl. Physiol.* **75**: 566-572.
- Vina, J. (1990.). *Glutathione: Metabolism and Physiological Functions*. Boca Raton Florida, CRC Press.
- Viña, J., G. T. Sáez, et al. (1983). "The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes." *Biochem. J.* **212**: 39-44.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, et al. (1995). "Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence?" *Exp Cell Res* **220**(1): 186-193.
- Waddington, R. J., S. J. Youde, et al. (2009). "Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp." *Cells Tissues Organs* **189**(1-4): 268-274.
- Wakabayashi, N., K. Itoh, et al. (2003). "Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation." *Nat Genet* **35**(3): 238-245.

- Wakitani, S., T. Saito, et al. (1995). "Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine." Muscle Nerve **18**(12): 1417-1426.
- Walsh, S., C. Jefferiss, et al. (2000). "Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4." Bone **27**(2): 185-195.
- Ward, J. P. (2008). "Oxygen sensors in context." Biochim Biophys Acta **1777**(1): 1-14.
- White, R. P. (1990). "Responses of isolated cerebral arteries to vasoactive agents." Neurosurg. Clin. N. Am. **1**(2): 401-415.
- Whitten, K. W., K. D. Gailey, et al. (1992). Química General. Méjico, Editorial McGraw-Hill.
- Wiseman, H. and B. Halliwell (1996). "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." Biochem J **313** (Pt 1): 17-29.
- Wolowiec, D., P. Deviller, et al. (1995). "Cdk1 is a marker of proliferation in human lymphoid cells." Int J Cancer **61**(3): 381-388.
- Wongchuensoontorn, C., N. Liebehenschel, et al. (2009). "Application of a new chair-side method for the harvest of mesenchymal stem cells in a patient with nonunion of a fracture of the atrophic mandible--a case report." J Craniomaxillofac Surg **37**(3): 155-161.
- Woo, R. A. and R. Y. Poon (2004). "Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation." Genes Dev **18**(11): 1317-1330.
- Wood, H. B., G. May, et al. (1997). "CD34 expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis." Blood **90**(6): 2300-2311.
- Woods, E. J., B. C. Perry, et al. (2009). "Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use." Cryobiology **59**(2): 150-157.
- Yan, Y., J. Frisen, et al. (1997). "Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development." Genes Dev **11**(8): 973-983.
- Yang, J., M. Li, et al. (2011). "CD34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow." PLoS One **6**(5): e20219.
- Young, H. E., T. A. Steele, et al. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." Anat Rec **264**(1): 51-62.

- Yu, S. H., Y. J. Jang, et al. (2010). "Transplantation of adipose derived stromal cells into the developing mouse eye." Acta Histochem Cytochem **43**(6): 123-130.
- Zeng, B., H. Chen, et al. (2008). "Effects of combined mesenchymal stem cells and heme oxygenase-1 therapy on cardiac performance." Eur J Cardiothorac Surg **34**(4): 850-856.
- Zhang, J., C. Niu, et al. (2003). "Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size." Nature **425**(6960): 836-841.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, et al. (2006). "Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation." Tissue Eng **12**(10): 2813-2823.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, et al. (2008). "In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages." J Tissue Eng Regen Med **2**(2-3): 117-125.
- Zhang, W., X. F. Walboomers, et al. (2005). "Differentiation ability of rat postnatal dental pulp cells in vitro." Tissue Eng **11**(3-4): 357-368.
- Zhou, B. B. and S. J. Elledge (2000). "The DNA damage response: putting checkpoints in perspective." Nature **408**(6811): 433-439.
- Zindy, F., D. E. Quelle, et al. (1997). "Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging." Oncogene **15**(2): 203-211.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res **2**(6): 477-488.

IX. ABREVIATURAS

<i>Español</i>	<i>Abreviatura Abreviation</i>	<i>Inglés</i>
α -aminoadipic- δ -semialdehydo	AAS	α -aminoadipic- δ -semialdehyde
Adenosin difosfato	ADP	Adenosine diphosphate
Productos finales de glicación avanzada	AGE	Advanced glycation end products
AGC protein quinasa	Akt	AGC protein kinase
Alkalin fosfatasa	ALP	Alcaline phosphatase
Ácido desoxirribonucleico	ADN	Desoxyribonucleic acid
Elemento de la respuesta antioxidante	ARE	Antioxidante response element
	ARF	Alternative reading frame
Ácido ribonucleico	ARN	Ribonucleic acid
Adenosin trifosfato	ATP	Adenosin triphosphate
Serum Bovino Albumina	BSA	Serum Bovine Albumin
Catalasa	Cat	Catalase
Ciclinas dependiente de las quinasas	CDKs	Cyclin dependent kinase
Inhibidores de las quinasas dependiente de las ciclinas	CDKIs	Cyclin dependent kinase inhibitors
Casein quinasa 2	CK	Casein kinase
Células madre mesenquimales	CMMs/MSCs	Mesenchymal stem cells
Células madre de la pulpa dental	CMPDs/DPSCs	Dental pulp stem cells

Células mesenquimales progenitoras derivadas de la placenta	PDMPC	Placenta derivated progenitor mesenchymal cells
Control	Ctrl	Control
Diethylmaleato	DEM	Diethylmaleate
Medio de cultivo específico	DMEM	Dubelco's modified Eagle Medium
Dimethylsulfóxido	DMSO	Dimethyl sulfoxide
2,4- dinitrophenylhidrazina	DNPH	2,4- dinitrophenylhydrazine
2,4- dinitrophenylhidrazona	DNP-hydrazone	2,4- dinitrophenylhydrazone
DL-Ditioltreitol	DTT	DL-Dithiolthreitol
Factor de transcripción esencial	E2F	Esencial factor of transcription
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA	Ethylendiaminotetraacetic acid
Isotiocianato <i>de</i> fluoresceína	FITC	Fluorescein Isothiocyanate
Glutamato-cisteín ligasa	GCL	Glutamate cysteine ligase
Glutación peroxidasa	GPx	Glutathion peroxidase
Glutación reductasa	GR	Glutathion reductase
Glutathión reducido	GSH	Reduced glutathione
Glucogen sintasa quinasa 3 β	GSK-3β	Glucogen sintase quinase
Glutación oxidado	GSSG	Oxydized glutathion
Glutación-S-Transferasa	GST	Gluthation-S-transferase
Células madre de la pulpa dental humana	HDPSCs	Human dental pulp stem cells
Acido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethan sulfónico	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

Factor de transcripción inducible por hipoxia 2 α	HIF 2α	Hypoxia inducible transcription factor 2 α
Hemooxigenasa 1	HO-1	Heme oxygenase 1
Equipo de Cromatografía líquida de alta eficacia	HPLC	High liquid chromatography
Peroxidasada Rábano	HRP	Horseradish peroxidase
Células intersticiales	ICs	Interstitial cells
Inhibidor de proteasas	IP	Protease inhibitor
Factor de crecimiento parecido a la insulina	IGF-1	Insulin like growth factor
	Keap-1	Kelch like associated protein 1
Tampón fosfato	Kpi	Phosphate buffer
Lysine oxidasa	LOX	Lysil oxidase
Protein kinasa activada por mitógenos	MAPK	Mitogen activated protein kinase
Malondialdehido	MDA	Malondialdehyde
Doble minuto murino	Mdm2	Murine doble minute 2
Matriz extracelular	MEC	Extracellular matrix
Metaloproteínasas	MMPs	Metalloproteinase
Acido 3-(N-morpholino)propanesulfónico	MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Factor promotor de maduración	MPF	Maturation Promoting Factor
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio	MTT	Dimethylthiazol-diphenyl tetrazolium bromide
Nicotinamida adenina dinucleótido	NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1	NQO-1	NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Factor nuclear de transcripción 2	Nrf2	Nuclear factor of transcription 2
Tampón fosfato	PB	Phosphate buffer
Tampón fosfato salino	PBS	Phosphate Saline Buffer
Células del ligamento periodontal	PDLCs	Periodontal ligament cells
Fosfoinositol 3 quinasa	PI3K	Fosfoinositol 3 quinase
Protein quinasa C	PKC	Protein quinasa C
Poly-L-lisina	PLL	Poly-L-lysine
Peroxiredoxin 3 reducido	Prx3-red	Reduced Peroxiredoxin 3
	PVDF	Polyvinylidene difluoride
Retinoblastoma	Rb	Retinoblastom
Especies reactivas de nitrógeno	RNS	Reactive nitrogen species
Especies reactivas de oxígeno	ROS	Reactive oxygen species
Suero bovino fetal	SBF	Serum bovine fetal
Dodecilsulfato sódico	SDS	Sodium dodecyl sulfate
Células madre humanas de dientes deciduos	SHED	Human stem cells from deciduous teeth
Células madre de la piel	S-MSC	Skin mesenchymal stem cells
Superóxido desmutasa	SOD	Superoxide dismutase
Ácido tiobarbitúrico	TBA	Tiobarbituric acid
Tampapón Tris salino con Tween 20	TBST	Tris-Buffered Saline with Tween 20

Microscopio electrónico de transmisión	TEM	Electronic microscopy of transmission
El factor de crecimiento transformante beta	TGF-β	Transforming growth factor beta
tris(hidroxiometil)aminometano	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Isotiocianato-tetrametil-rodamina	TRITC	Tetramethylrhodamine-5-(and 6)-isothiocyanate
Tioredoxin 2 oxidado	Trx2-ox	Oxydized tioredoxin
Proteínas no acopladas	UCP	Uncoupled proteins
Luz ultravioleta visible	UV-vis	Visible ultraviolet light
Factor de crecimiento endotelial-vascular	VEGF	Vascular endothelial growth factor
El transportador de cisteína/glutamato	xCT	Cystin/gluthamate transporter

Tabla IX.1 Abreviaturas empleadas en la tesis

X. NOMENCLATURA

<i>Español</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Inglés</i>
Monóxido de carbono	CO	Radicals of sulfur derivated atoms
Catión cobre (I)	Cu⁺	Copper (I) ion
Catión cobre (II)	Cu²⁺	Copper (II) ion
Etanol	EtOH	Ethanol
Catión Hierro (II)	Fe²⁺	Iron (II) ion
Átomo de hidrógeno	H	Hydrogen atom
Ácido clorhídrico	HCl	Hydrochloric acid
Radical hidropéroxido	HO₂	Hydroperoxyl Radical
Peróxido de hidrógeno	H₂O₂	Hydrogen peroxide
Cloruro potásico	KCl	Potassium chloride
Dihidrógeno Fosfato de potasio	KH₂PO₄	Potassium dihydrogen phosphate
Hidróxido potásico	KOH	Potassium hydroxyde
Cloruro de magnesio	MgCl₂	Magnesium chloride
Cloruro sódico	NaCl	Sodium chloride
Bicarbonato sódico	NaH₂PO₄	Monosodium phosphate
Dihidrógeno fosfato de sodio	NaHCO₃	Sodium bicarbonate
Hidróxido sódico	NaOH	Sodium hydroxide
Óxido nítrico	NO[•]	Nitrogen monooxide
Dióxido de nitrógeno	NO₂[•]	Nitrogen dioxide

Oxígeno singlete	$^1\text{O}_2$	Single oxygen
Radical hidroxilo	OH^\bullet	Hydroxyl radical
Radicales de átomos derivados de carbono	R^\bullet	Radicals of carbon derivated atoms
Radical alcóxido	RO^\bullet	Alcoixd radical
Radical peróxido	ROO^\bullet	Peroxid radical
	ROOH	Alkyl hydroperoxide
Radicales de átomos derivados de azufre	RS^\bullet	Sulfur derivated radical atoms

Tabla X.1 Tabla de la nomenclatura empleada en la tesis

XI. UNIDADES Y MAGNITUDES FÍSICAS

<i>Magnitudes físicas</i>	
<i>Símbolo</i>	
λ	Magnitud de longitud de onda
M	Magnitud de molaridad
m	Magnitud de masa
pH	Magnitud para la medición de la acidez del medio
T	Magnitud de temperatura

Tabla XI.1 Magnitudes físicas empleadas en la tesis

<i>Unidades físicas</i>		
<i>Símbolo</i>	<i>Unidad básica</i>	
(A)	Amperios	Unidad de intensidad de corriente eléctrica
(g)	Gramos	Unidad de masa
(D)	Dalton	Unidad de peso molecular
(L)	Litros	Unidad de volumen
(h)	Horas	Unidad de tiempo
(min)	Minutos	Unidad de tiempo
(mol)	mol	Unidad de cantidad de sustancia
(M)	Molar	Unidad de concentración molar de un soluto en una disolución

(m)	Metros	Unidad de longitud
(°C)	Grados Celsius	Unidad de temperatura
(p/v)		Relación peso/volumen
(v/v)		Relación volumen/volumen

Tabla XI.2 Unidades físicas empleadas en la tesis

