

## Artículo original

## Celulas troncales aisladas de piezas dentales provenientes de población mexicana el Estado de Jalisco

Sánchez-Gómez I. (1), Gonzáles-Pelayo G. L. (2), Santibáñez-Escobar L. P. (3), Gaona-Bernal J. (4), Villa-García Torres L. S. (5), Márquez-García E. (6), Avelar-Rodríguez F. J. (7), Marino-Marmolejo E. N. (8), Flores-Hernández F.Y. (9).

(1) Estudiante del Doctorado en Innovación Biotecnológica, del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ); (2) Cirujana Dentista, estudiante de la especialidad en Odontopediatría, Centro Universitarios de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara; (3) Maestría en Ciencias, Jefe de Cirugía Maxilofacial Hospital Civil Nuevo Dr. Juan I. Menchaca; (4) Doctorado en Ciencias, Profesor Investigador Asociado, Departamento de Microbiología, Universidad de Guadalajara; (5) Maestría en Innovación Biotecnológica, Jefa de Proyectos de Propiedad Intelectual, Dirección de Ciencia y Desarrollo Tecnológico, Secretaría de Innovación, Ciencia y Tecnología del Estado de Jalisco; (6) Ingeniera en Biotecnología, Estudiante de Maestría en Biomedicina y Ciencias de Salud, Monash University; (7) Químico Farmacobiólogo, Estudiante de Maestría en Innovación Biotecnológica, CIATEJ; (8) Doctora en Ciencias, Directora Adjunta de Investigación y Posgrado del CIATEJ; (9) Maestría en Ciencias de la Salud, Profesor Investigador Asociado del CIATEJ, Departamento de Biotecnología Medica y Farmacéutica.

### Resumen

La investigación sobre células troncales en regeneración de tejidos dañados ha crecido debido al potencial de mejorar diversas afecciones. Las células troncales de piezas dentales son una opción para ser utilizadas en ingeniería de tejidos, requiriendo contar con procedimientos estandarizados para su procesamiento con el fin de lograr un adecuado aislamiento y cultivo. **Objetivo:** Realizar una evaluación de distintos procedimientos para aislamiento, cultivo y propagación de células troncales de pulpa dental (DPSC por sus siglas en inglés). **Materiales y Métodos:** Estudio cuasiexperimental con muestreo no probabilístico para aislamiento de DPSC, donadas bajo consentimiento informado. Se probaron diversos métodos; para el acceso a la cámara pulpar se probó la perforación mecánica utilizando fresadoras y piezas de mano de alta velocidad, además de un método de corte a nivel de tercio cervical dividiendo corona y raíz utilizando una pieza de mano de baja velocidad con disco de diamante. Se extrajo la pulpa dental disgregando las células por diversos métodos enzimáticos procediendo al cultivo en monocapa para el aislamiento. La fenotipificación celular fue por citometría de flujo detectando marcadores mesenquimales (CD44, 73, 90, 105), además se realizaron ensayos de multidiferenciación hacia linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico. Por último, las DPSC se criopreservaron en nitrógeno líquido. **Resultados:** Procedimiento eficaz para la obtención, aislamiento y proliferación de DPSC, confirmando con morfología, expresión de marcadores mesenquimales, multipotencialidad y adhesión en plástico. **Conclusión:** Se logró estandarizar un protocolo de aislamiento de DPSC (transporte, procesamiento de piezas dentales, aislamiento, cultivo y proliferación), observando mejor aislamiento de DPSC a partir de molares con ápice inmaduro, provenientes de pacientes con promedio de edad de 25 años.

**Palabras clave:** Células troncales de pulpa dental, Aislamiento, Cultivo de células mesenquimales, Población Mexicana.

### Abstract

Research on stem cells regenerating damaged tissues has grown due to the potential to improve various ailments. Tooth stem cells are an option to be used in tissue engineering, requiring standardized procedures for their processing in order to achieve adequate isolation and culture. **Objective:** To carry out an evaluation of different procedures for the isolation, culture and propagation of dental pulp stem cells (DPSC). **Materials and Methods:** Quasi-experimental study with non-probabilistic sampling for isolation of DPSC, donated under informed consent. Various methods were tried; for access to the pulp chamber, mechanical drilling was tested using milling machines and high-speed handpieces, as well as a cutting method at the cervical third level dividing crown and root using a low-speed handpiece with a diamond disc. The dental pulp was extracted by disintegrating the cells by various enzymatic methods proceeding to monolayer culture for isolation. Cell phenotyping was by flow cytometry detecting mesenchymal markers (CD44, 73, 90, 105); in addition, multidifferentiation tests were carried out towards osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages. Finally, the DPSCs were cryopreserved in liquid nitrogen. **Results:** Efficient procedure for obtaining, isolating and proliferating DPSC, confirming with morphology, expression of mesenchymal markers, multipotentiality and plastic adhesion. **Conclusion:** A DPSC isolation protocol was standardized (transport, dental processing, isolation, culture and proliferation), observing better isolation of DPSC from molars with immature apex, from patients with an average age of 25 years.

**Keywords:** Dental pulp stem cells, Isolation, Mesenchymal stem cell culture, Mexican population.

## Introducción

Las células troncales, del inglés Stem cells (SC), o coloquialmente conocidas como células madre, son un tipo de células capaces de autorenovarse y diferenciarse casi en cualquier estirpe celular que constituye al ser humano, por ende, el potencial de ser utilizadas como base de terapias que estén relacionadas con el reemplazo cuando existe daño tisular es de alta relevancia. Estas células han sido efectivas para la regeneración de hueso, cartílago articular, hígado y para el tratamiento de diabetes, enfermedad periodontal, infarto de miocardio, neuropatía, osteoartritis, lesión de la médula espinal, etc., y otras enfermedades que se encuentran bajo investigación. Los resultados experimentales y clínicos indican que el trasplante de SC proporciona un efecto beneficioso sobre el tejido lesionado induciendo angiogénesis, disminución del estrés oxidativo, estimulando supervivencia y proliferación celular.<sup>1</sup> Se pueden obtener de diversas fuentes como tejido adiposo, medula ósea, gelatina de Wharton, placenta, entre otras, sin embargo, la obtención de estas células de piezas dentales (DSC, por sus siglas en inglés), se propone como una alternativa viable. Siguiendo las directrices de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), las SC del tipo mesenquimal (MSC), pueden identificarse mediante la expresión de marcadores de superficie celular (CD105, CD73, CD90, CD45 entre otros) con al menos un 95% de expresión y otro panel de marcadores hematopoyéticos con una expresión no mayor del 2% (CD34-, CD14-, CD11b-, CD79-, CD19-, HLA -DR- entre otros), además deben tener el potencial de diferenciación a múltiples linajes como osteogénico, adipogénico y condrogénico. Se sabe que las MSC pueden presentar características biológicas diferentes según la fuente de tejido y los procedimientos de aislamiento y cultivo.<sup>2,3-5</sup>

Aunque se ha logrado la obtención de MSC, aún se siguen buscando fuentes celulares de fácil acceso, que minimicen los procedimientos quirúrgicos invasivos que además no generen controversias éticas.<sup>3</sup> Las DSC, son una opción viable para ser utilizadas en terapia celular o medicina regenerativa, estas células han sido aisladas de piezas dentales de desecho, lo cual les da un valor agregado.<sup>6,7,4</sup>

La extracción de terceros molares retenidos es el procedimiento de cirugía oral que se realiza con mayor frecuencia, en demanda de tratamientos ortodóncicos, ya que la toma de radiografías panorámicas permite la detección precoz de dientes no erupcionados, una vez removidos se convierten en desecho biológico, que puede ser aprovechado como una fuente factible de SC. Las

células mesenquimales dentales (DMSC, por sus siglas en inglés) también se han estudiado en el tratamiento de diversos padecimientos.<sup>8</sup> En particular, la pulpa dental es posiblemente la fuente más accesible de células madre posnatales, sin embargo, no es la única fuente más de células dentales.<sup>9</sup>

Existen células trocales encontradas en el ligamento periodontal, que mantienen la homeostasis y la regeneración del tejido periodontal, así como hacia células formadoras de colágeno.<sup>9</sup> También se han reconocido las células troncales de la papila apical, este es un tejido situado en los ápices del diente permanente que se está formando, es decir en las aperturas de la pulpa dental después de la raíz, son las precursoras de los odontoblastos primarios, responsables de la formación de la dentina radicular.<sup>9</sup> Por otro lado, las células troncales del folículo dental, es un tejido ectomesenquimal que rodea el órgano del esmalte y la papila dental del germen del diente permanente en formación. Este tejido contiene células troncales que son las que acabarán formando el periodonto, constituido por cemento, ligamento, hueso alveolar y encía.<sup>10</sup> Uno de los tipos de células troncales más investigados son las obtenidas de la pulpa dental (DPSC, por sus siglas en inglés), siendo las primeras células troncales dentales que se aislaron en el año 2000 por Gronthos y Cols.<sup>11</sup> La producción de DPSC es de 1 % de todas las células y según aumenta la edad del individuo, la disponibilidad de estas células se ve reducida. Se han estudiado sobre todo las células que provienen de terceros molares y dientes supernumerarios. Cabe destacar, que, si son aisladas durante la formación de la corona, las DPSC son más proliferativas. Esto se refiere a que durante la formación de la corona ocurre un proceso de diferenciación celular hacia odontoblastos y otras células, los cuales se encargan de formar la dentina y otras estructuras dentarias.<sup>12</sup>

El complejo dentina-pulpa tiene un potencial regenerativo natural que conduce a la formación de dentina terciaria. Los odontoblastos pueden sobrevivir a lesiones leves, como el desgaste o la caries temprana, y secretan una matriz de dentina reaccionaria. Sin embargo, los traumatismos de mayor intensidad, como caries avanzadas o procedimientos de restauración, pueden provocar la muerte de los odontoblastos preexistentes.<sup>13</sup>

En específico, en los dientes permanentes tenemos cuatro grupos: incisivos, caninos, premolares y molares. Estos grupos están presentes en los cuatro cuadrantes en los que se divide la cavidad bucal. Dentro del grupo de los molares tenemos un tercer molar por cada cuadrante, en total cuatro terceros molares. Se les nombra así

por el orden cronológico ya que son las últimas en erupcionar.<sup>14</sup>

Un 75 % de la población joven presenta problema de dientes retenidos. Se denomina dientes retenidos, incluidos o impactados a aquellos que una vez llegada la época normal de erupción quedan encerrados dentro de los maxilares y mantienen la integridad de su saco pericoronario fisiológico.<sup>15</sup> El tercer molar es un diente que erupciona durante el inicio de la vida adulta, de los 17 años en adelante. Los terceros molares en muchos casos pueden ver interrumpido su proceso de erupción, esto provoca su retención parcial o total dentro de los maxilares. Estas se pueden asociar con alteraciones anatomopatológicas como inflamación y ulceración de la zona vecina de las encías, daño a las raíces de los segundos molares, caries en los segundos molares, enfermedad de la encía y del hueso alveolar alrededor de los segundos molares y el desarrollo de quistes o tumores.<sup>16</sup> Estas alteraciones y su prevención son la justificación principal de la extracción temprana de los terceros molares. Actualmente los terceros molares retenidos y su patología representan un porcentaje elevado de actuación profesional de la salud pública y privada, hasta el punto en el que la exodoncia del tercer molar ha sido la intervención quirúrgica que representa el mayor porcentaje de actividad de los servicios de cirugía oral y maxilofacial.

Los molares extraídos son un desecho biológico, es decir, no tiene algún uso o fin para el paciente u odontólogo así que pueden ser aprovechados para el aislamiento de DPSC, esto disminuye en demasía las controversias éticas y nos presenta una obtención factible para la obtención de este tipo de células.<sup>6</sup> Algunos autores mencionan que la capacidad de proliferación de las DMSC, Lizier *et al.* 2012 puede permanecer al menos durante 6 meses sin cambios en la morfología o la expresión de marcadores mesenquimales.<sup>12,17</sup> Para algunos investigadores la capacidad de proliferación se puede mantener por lo menos 25 pasajes después de la criopreservación celular.<sup>18</sup>

Pese a los avances en este tema aún son limitados los reportes que contienen información sobre el correcto manejo del diente para facilitar la obtención celular. Existen reportes de países donde manejan algunas técnicas de extracción celular de los dientes y conservación de las DMSC e incluso se tienen bancos celulares de origen dental para criopreservación y aislamiento como: Japón, el primer banco de dientes se estableció en la Universidad de Hiroshima llamado "tres soportes" (Suri Buraketto), BioEDEN (Austin, Texas), StemSave, la tienda-a-Tooth en EE. UU, El BANK3 en Noruega, en India Stemade

Biotech Pvt. Ltd. (Delhi, Chennai, Chandigarh, Pune, y Hyderabad). Cabe resaltar con esto la importancia de analizar procedimientos de aislamiento de DMSC en pacientes de México.<sup>8,19</sup> Por tal motivo se llevó a cabo el análisis de un protocolo para el aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental, para que en un futuro se pueda establecer un protocolo estandarizado y eficiente para la creación de bancos de DMSC en México y su utilización en los distintos campos mencionados anteriormente.

## Material y Métodos

Se aplicó un diseño cuasiexperimental analítico, con un muestreo no probabilístico por conveniencia. Para la obtención de las piezas dentales se seleccionaron pacientes por medio de consentimiento informado, del área de Cirugía Maxilofacial del hospital civil nuevo "Dr. Juan I. Menchaca". Se tomó una muestra total de 180 dientes considerando los siguientes criterios:

### Criterios de inclusión

Pacientes, de edad entre 5 y 45 años, ambos sexos, cualquier nivel socioeconómico, donadores de piezas dentales tanto permanentes como temporales, incluidas y/o erupcionadas, recientemente extraídas con presencia de tejido orgánico como pulpa dental o ligamento periodontal o foliculo dental o con presencia de tejido apical cariados en un porcentaje menor al 30%. Con ápice maduro e inmaduro.

### Criterios de exclusión

Pacientes mayores de 45 años. Piezas dentales que presenten lesiones cariosas por arriba del 70-80% del total de la pieza dental. Terceros molares que en la radiografía presenten zonas radiolúcidas periapicales. Terceros molares que presenten fracturas de corona con exposición pulpar antes de la exodoncia. Terceros molares que durante el procedimiento de extracción (exodoncia) se pierda el tejido pulpar. Terceros molares que durante el procedimiento de extracción se comunica con el tejido pulpar.

### Criterios de eliminación

Piezas dentales totalmente fragmentadas y dañadas en cuanto a caries y procesos infecciosos. Piezas dentales que se contaminaron en el proceso de aislamiento y cultivo celular.

### Mantenimiento de las piezas dentales obtenidas

Las piezas dentales extraídas mediante cirugía maxilar, se colocaron en un tubo de 15 mL con medio de preservación,

para ello se probaron tres medios de transporte: a) RPMI-1640 +10% DMSO +10% albúmina humana +10% SFB +100 U/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomycin + 0.25mg/mL de anfotericina B; b) Sales de HANK'S + 10%DMSO +10% albumina humana +10% SFB +100 U/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomycin + 0.25 mg/mL de anfotericina B; c) MEM + 10% DMSO +10% albumina humana +10% SFB +100 U/mL penicilina + 100 mg/mL estreptomycin + 0.25 mg/mL de anfotericina B.

Se realizó la identificación de las muestras (asignación de número a cada paciente en forma ascendente junto con la nomenclatura de la Federación Dental Internacional, donde se clasifican con dos dígitos, el primer dígito correspondiente al número de cuadrante y el segundo dígito correspondiente al tipo de pieza dental), además de registrar si es un diente con ápice maduro o inmaduro. Posterior a esto se trasladaron en cadena fría al laboratorio. El tiempo transcurrido desde la recolección hasta su tratamiento no fue superior a 40 horas.

#### **Extracción de pulpa dental**

Se trabajó en condiciones asépticas con material esterilizado por autoclave y manipulación bajo campana de flujo laminar. Se descontaminó el diente a través de un tren de desinfección como se describe a continuación: 1) Se limpió con gasa y anfotericina B 50µg/mL, posteriormente se sumergió en tres soluciones, yodopovidona 8%, PBS 1X con 100U/100mg/mL de Penicilina/Estreptomycin a 5% y clorhexidina al 0.12%, una a la vez por un minuto aproximadamente, en ese orden. Este paso se buscó eliminar microorganismos que puede contener el diente en su superficie, producto de la manipulación de extracción, contacto con saliva y sangre, etc. A continuación, se buscó llegar al tejido blando dental, las muestras fueron en su totalidad terceros molares, de los cuales se trabajó la pulpa dental, para obtenerla se perforaron o fraccionaron utilizando 2 métodos: a) Utilizando pieza de mano de uso odontológico de alta velocidad (Appledental, España) se perforó desde la corona hasta llegar a la cámara pulpar. Para perforar el esmalte y dentina de la corona se utilizó una fresa redonda de carburo número 8 (Tungsteno, España) colocada en dirección longitudinal a la raíz del diente en el centro de la corona dental, se perforó el esmalte hasta llegar a dentina; posteriormente se utilizó una fresa de carburo número 2 (Tungsteno, España) para hacer comunicación hasta llegar a la cámara pulpar, una vez comunicado se utilizó una fresa endo Z (Maillefer, Suiza) de punta inactiva para ampliar la cavidad antes formada y tener mejor acceso cuidando de dañar lo menos posible la cámara pulpar. Con esta metodología se trabajaron 76 dientes; b) Se

tomó la pieza dental por la corona con un fórceps para exodoncia 222 (TBS, México), se cortó el diente a nivel de tercio cervical dividiendo corona y raíz, utilizando una pieza de mano de baja velocidad (Medidental) con disco de diamante de doble vista con mandril (Mestra, Madrid) irrigando con jeringa hipodérmica con agua inyectable a manera de goteo para evitar el sobrecalentamiento del diente. Con esta metodología se trabajaron 104 dientes.

#### **Aislamiento de DPSC**

Al quedar expuesta la pulpa, se extrajo mecánicamente de la cámara pulpar y de la zona radicular con ayuda de cucharillas para dentina del número 3 (Arain, México) pinzas finas y limas flexo file calibre 15-30 (Maillefer, Suiza). La pulpa dental extraída se seccionó en pequeños fragmentos con una hoja bisturí del número 10 marca (HERGOM, México) y mango para bisturí número 3 (TBS, México). La pulpa dental se colocó en digestión, para ello se probaron métodos enzimáticos para disgregar el tejido, al igual que un método mecánico mediante tamizaje del tejido de 40µm (BD Falcón 352340), se probó este método en 10 piezas, el segundo método implementado consistió en agregar 1mL de tripsina al 0.025% (SIGMA) en PBS 1X con 100U/mL de penicilina, 100mg/mL de estreptomycin en agitador a 37°C/160 rpm/20 min. Luego se colocó en vortex por 1 min, y se repitió el proceso en el agitador con regulador de temperatura otros 20 min. Una vez finalizado se volvió a colocar en vortex por 1min, se centrifugó a 1500rpm por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en αMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, marca GIBCO), 2mM L-glutamina, 10µM L-ácido ascórbico 2-fosfato, 100U/100mg/ml 1% penicilina-estreptomycin y 0.25mg/ml de anfotericina B. El pellet se colocó en botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> y cultivaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Se revisaron a las 72 horas y cuando se adhirieron las células fibroblastoides se realizó un cambio de medio por DMEM+1% L-Glutamina 2 mM+0.5% 10,000 mg/Penicilina/estreptomycin+ 20% SFB. Se realizaron cambios de medio cada tercer día hasta observar una confluencia mínimo del 80%. Después se realizó el primer pase para expandir el cultivo celular. Para lo cual se utilizó tripsina al 0.025 % (marca ATCC) para desprender las células.

#### **Caracterización del fenotipo DPSC**

##### **Morfología**

La caracterización morfológica se realizó a través de microscopía invertida, utilizando un microscopio invertido con contraste de fases marca OPTIKA, se identificó a las células adherentes tipo fibroblastoide.

### Citometría

Para este análisis se utilizó el kit de BD Human MSC Analysis Kit 562245. Se desprendieron las células con tripsina al 0.025% de botellas de cultivo; se contaron en cámara de Neubauer, colocando aproximadamente 500,000 células en microtubo de 1.5 mL. Se prepararon nueve microtubos (para anticuerpos CD90, CD105, CD73, coctel hematopoyético, controles de isotipo y células sin marcar). Se realizó un lavado para retirar el medio de cultivo, centrifugando las células a 1500rpm por dos minutos. Se retiró el sobrenadante cuidando de no desprender el botón celular. Se añadieron 100µl de paraformaldehído al 4% en frío y colocaron en agitación constante a 120rpm durante 20 min. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 900µl de PBS/BSA 0.1%. Se realizó un lavado con PBS a 1500 rpm 2 minutos. Una vez que se realizó el lavado para retirar el paraformaldehído, se colocaron 5 µL de los anticuerpos individuales a cada tubo correspondiente y para los controles de isotipo, así como 10 µL del coctel positivo y negativo. Se incubaron toda la noche a 4°C. Se realizó un lavado, centrifugando a 1500 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y resuspendieron en 300µl de PBS/BSA 0.1%. Se analizó la muestra en un citómetro Accuri C6 BD®.

### Multidiferenciación

Se realizaron ensayos de multidiferenciación para verificar su capacidad de diferenciarse a distintas estirpes, esto para corroborar su multipotencialidad como célula mesenquimal. Las DPSC se sometieron a diferenciación con medios comerciales hacia adipocitos (SIGMA Cat. 811D-250 Stem cell), condroblastos (SIGMA Cat. 411D-250 Stem cell) y osteoblastos (SIGMA Cat. 417D-250 Stem cell) durante 24 días en placas de 6 pozos, además se realizaron sus respectivas tinciones para ratificar cada estirpe.

**Rojo oleoso para adipocitos:** El rojo oleoso es un colorante que se fija a las vacuolas lipídicas características de los adipocitos. La tinción se preparó con 0.25 g de rojo oleoso + 50mL de isopropanol al 100%, cubriendo de la luz e incubando a 56° durante 12h en baño maría. Posteriormente se aforó el volumen a 50mL con agua destilada. Dos horas previas al ensayo, esta solución se llevó a 60°. La solución de trabajo se preparó tomando 6 volúmenes de la solución de rojo oleoso combinándolos con 4 volúmenes de agua destilada, se filtró utilizando membranas de 0.22 µm. Para la tinción, se retiró el medio de cultivo de los pozos y se enjuagó dos veces con 300µL de PBS 1x, las células se fijaron con PFA al 4% durante 15 min, se retiró el PFA y se agregaron 500µL por pozo de PBS durante 1 min, se retiró este PBS y después se

agregaron 500µL por pozo de isopropanol al 60% en SS durante 15seg. Se retiró el isopropanol y agregaron 500µL por pozo de la solución de trabajo y se dejó reposar durante 20 minutos. Se enjuagó dos veces con 500µL de PBS y se observó al microscopio.

**Azul alciano para condroblastos:** El azul alciano es un colorante que se fija a las fibras de colágena de la matriz extracelular producidas por los condroblastos. El azul alciano se preparó al 1% diluido en ácido acético al 3%. Se ajustó el pH a 2.5 utilizando ácido acético concentrado, esta solución se filtró en membranas de 0.22µm y se dejó reposar durante 24h. Para la tinción se retiró el medio de cultivo de la placa, las células se fijaron con etanol al 96% durante 20min, se lavaron con PBS 1x, se agregó ácido acético al 1% durante 5min, enseguida se lavaron con PBS 1x y colocó la solución de azul alciano al 1% durante 1h, posteriormente las células se lavaron con PBS y se observaron al microscopio.

**Tinción Von Kossá para osteoblastos:** La tinción de Von Kossá consiste en utilizar el nitrato de plata para teñir de color negro o marrón los depósitos de calcio producidos por los osteoblastos. Las células se enjuagaron dos veces con agua destilada. Después se colocaron 2mL de etanol frío al 70% por pozo, se incubó durante 12h a 24h en refrigeración a -20°C. Posteriormente se retiró el contenido de los pozos y se lavaron con agua destilada. Se retiró el agua y añadieron 500µL de solución de nitrato de plata al 5%. La placa se colocó en exposición a luz UV a 120µJ/cm<sup>2</sup> durante 5 a 7 min hasta que se comenzaron a visualizar depósitos de calcio en color negro o marrón oscuro. Posteriormente se retiró el nitrato de plata y se colocó PBS 1x y observaron al microscopio.

### Preservación celular

Una vez que el cultivo alcanzó el 90% aproximadamente de confluencia celular, se procedió a desprender las células con tripsina al 0.05%. Una vez separadas se les adicionó DMEM+ 20% SFB+ 10% DMSO, y colocaron en crioviales en un Mr. Frosty con isopropanol para que un proceso de congelamiento paulatino, 1°C por minuto aproximadamente, en ultra congelador durante 24 horas y finalmente los crioviales se colocaron en tanque de nitrógeno líquido para su criopreservación a largo plazo.

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de Chi cuadrada (X<sup>2</sup>) para determinar el cumplimiento de las siguientes hipótesis: El medio de transporte utilizado es independiente de la viabilidad celular. La edad de los pacientes donadores

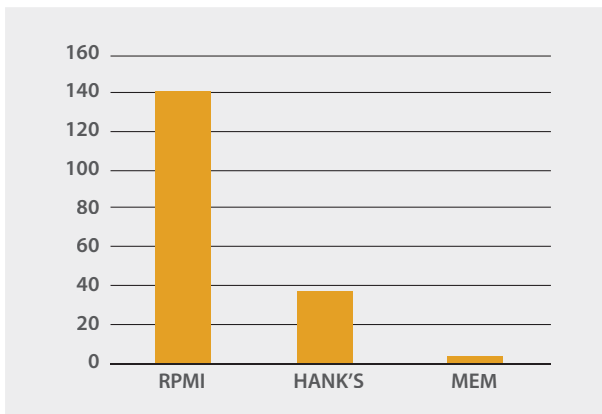
de terceros molares (dos grupos < 20 años y >20 años) son independiente para la presencia de marcadores de DMSC. El cultivo obtenido de las diferentes muestras respecto al sexo de los pacientes es independiente para la presencia de marcadores de DMSC.

## Resultados

### Mantenimiento de las piezas dentales obtenidas

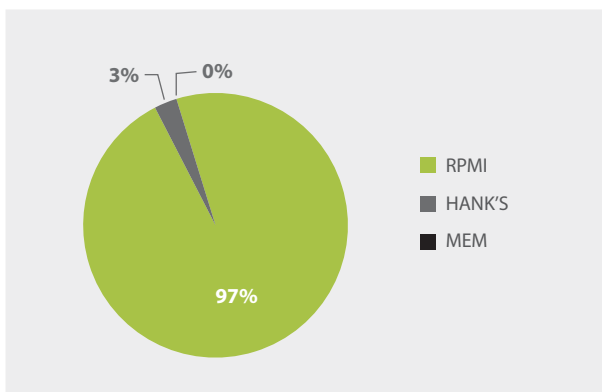
Se recolectaron muestras de 65 pacientes de entre 13 y 50 años, obteniendo un total de 180 piezas, en su totalidad terceros molares; en cuanto a la edad, tenemos un promedio de 25 años aproximada y mayormente mujeres (62%) (Gráfica 1).

**Gráfica 1.**  
**Incidenia de medios de transporte  
para piezas dentales (n=180)**



Fuente: Elaborado por autores

**Gráfica 2.**  
**Incidenia de medios de transporte  
con crecimiento celular (n=33)**



Fuente: Elaborado por autores.

También se observó que la mayoría de muestras tenían su ápice inmaduro, es decir aún abierta la apertura dental después de la raíz.

El medio de transporte RPMI-1640 suplementado, mantenía por mayor tiempo el pH entre 7.2-7.5 por lo que se utilizó para el transporte de la mayoría de piezas dentales (Gráfica 2), además de que se logró un porcentaje más alto de crecimiento en cultivos, cabe resaltar que logró aislar células de 33 muestras (Gráfico 3), esto nos revela dependencia del medio de transporte con la viabilidad celular con un valor de  $p=0.03$ . Se congelaron un total de 78 dientes a  $-80^{\circ}\text{C}$  pertenecientes a 26 pacientes, de las cuales solo se obtuvo crecimiento de una muestra.

### Extracción de pulpa dental

Se procesaron 89 dientes para extracción y aislamiento de DPSC. El proceso se describe a continuación (fig. 1): a) y b) Tren de desinfección de la pieza dental; c) y d) Apertura de cavidad pulpar; e) y f) Extracción de pulpa dental; g) Digestión de pulpa dental en tripsina; h) Cultivo en botellas de  $75\text{ cm}^2$ .

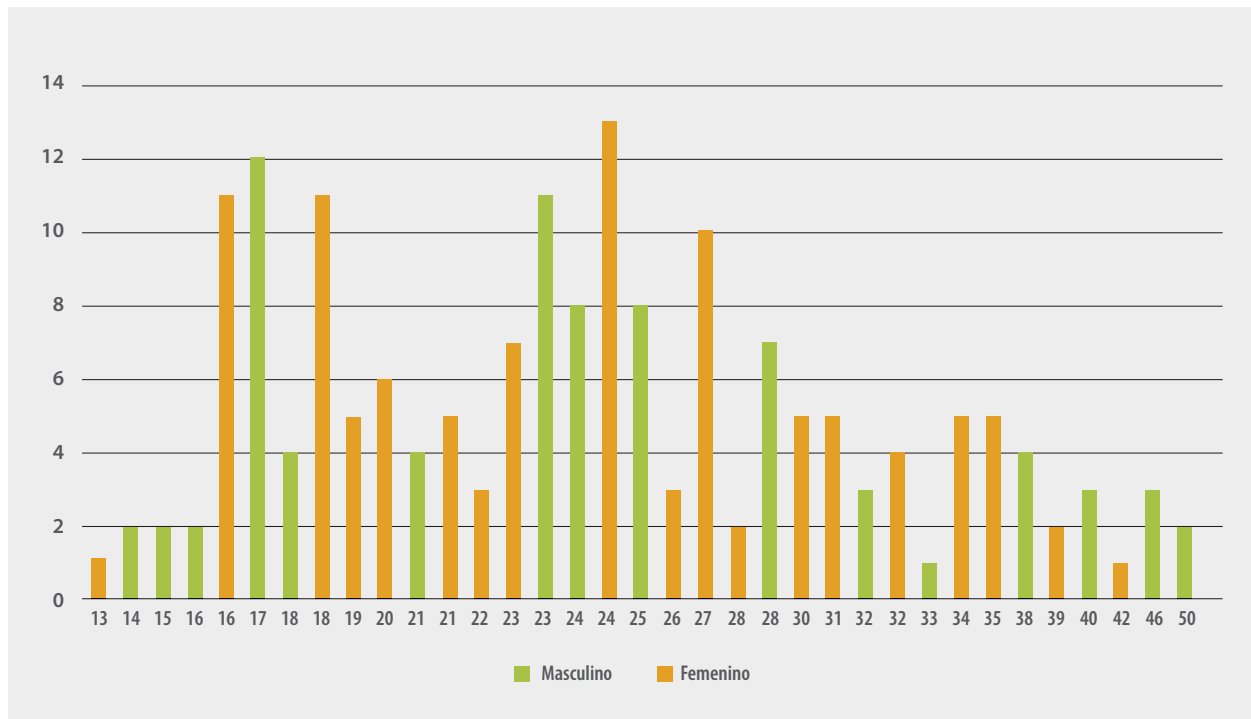
El procedimiento para la apertura de las piezas que brindó mejores resultados fue el de utilizar una pieza de mano de uso odontológico de alta velocidad (Appledental, España) perforando desde la corona hasta llegar a la cámara pulpar, ya que con el método b, los cultivos se contaminaban con residuos del polvo resultante de la perforación, además este método ofrecía un mejor acceso a la pulpa dental.

### Aislamiento de DPSC

33 muestras extraídas (18.33%) mostraron crecimiento celular, la edad de la mayoría de pacientes de estas muestras varía entre 16 y 32 años con ápice maduro (tabla 1).

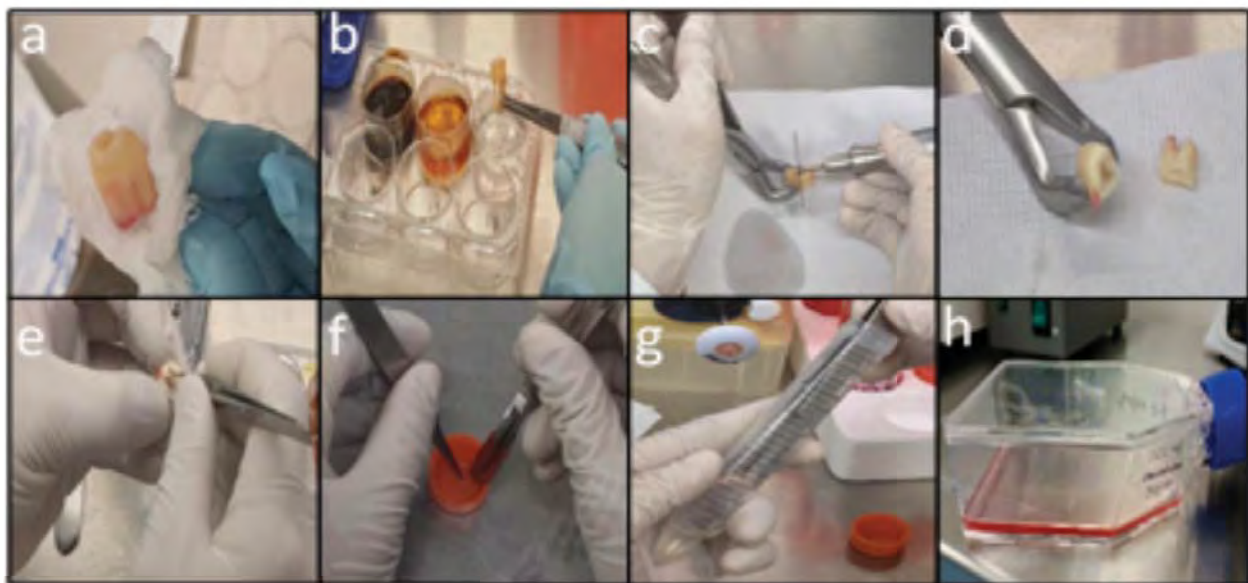
Se cambió el medio cada 72 horas y observó crecimiento de DPSC de tipo fibroblastoide, desde 7 hasta 21 días después. La figura 2 muestra las etapas de crecimiento celular, comenzando en pequeñas colonias (a) que emigran de los explantes cultivados para después emigrar a la periferia de la botella (b) y posteriormente expandiéndose a por toda la botella de cultivo (c).

**Gráfica 3.**  
**Incidencia de piezas dentales obtenidas por edad y género (n=180)**



Fuente: Elaborado por autores.

**Figura 1.**  
**Proceso de extracción y cultivo de DPSC**



Fuente: Elaborado por autores

**Tabla 1.**  
**Crecimiento celular de las piezas dentales por edad**

Edad	Incidencia	Estado de ápice
15	1	Inmaduro
16	3	
18	7	
19	3	
16	3	Maduro
20	1	
23	2	
24	1	
25	5	
27	2	
31	1	
35	3	
42	1	
Total	33	

Fuente: Elaborado por autores.

En la tabla 2 se muestra la cantidad de viales por diente que se obtuvieron. En algunas muestras se llegaron a obtener hasta 35 viales, mientras que en otras solo 1, observando un aumento en la obtención de viales entre los 16-18 años posiblemente a un aumento de su capacidad proliferativa.

#### Caracterización del fenotipo DPSC

Citometría: Se realizó un análisis por citometría de las células cultivadas con morfología fibroblástica comparando con poblaciones certificadas de ATCC. Se realizó el análisis por citometría de flujo a 10 cultivos de DPSC. Los cultivos fueron elegidos al azar, los resultados se muestran en la tabla 3 y en un gráfico de puntos representativo de marcadores positivos de MSC (fig. 3) para CD44, 73, 90 y 105, y negativo para marcadores hematopoyéticos. No se muestra dependencia de la edad (valor  $p=0.74$ ) ni del género (valor  $p=0.19$ ), aunque se recomienda aumentar el número de muestras para corroborar los resultados.

**Figura 2.**  
**Análisis morfológico por microscopia de las etapas del aislamiento de DPSC**

Id de paciente	Género	Edad	No. Viales nitrógeno
35/48	Masculino	15	21
30/18	Masculino	16	1
54/28	Femenino	16	2
54/18	Femenino	16	3
40/28	Femenino	16	5
40/18	Femenino	16	10
40/48	Femenino	16	13
38/48	Femenino	18	3
37/38	Femenino	18	8
38/18	Femenino	18	8
37/18	Femenino	18	9
33/38	Masculino	18	10
37/48	Femenino	18	10
33/48	Masculino	18	35
65/38	Femenino	19	4
65/48	Femenino	19	4
65/28	Femenino	19	9
44/18	Femenino	20	1
28/48	Masculino	23	1
13/28	Femenino	23	2
48/28	Femenino	24	2
42/28	Masculino	25	4
42/38	Masculino	25	4
42/18	Masculino	25	6
42/48	Masculino	25	9
31/48	Masculino	25	16
39/38	Femenino	27	3
39/28	Femenino	27	7

Fuente: Elaborado por autores.

**Figura 2.**  
**Análisis morfológico por microscopia de las etapas del aislamiento de DPSC.**



Fuente: Elaborado por autores.



**Tabla 3.**  
**Análisis de marcadores mesenquimales.**

Código muestra	Género	Condición ápice	Edad	% marcadores mesenquimales			
				CD90	CD44	CD105	CD73
40/48	Femenina	Maduro	16	93.2	99.5	27.9	23.4
40/28	Femenina	Maduro	16	98.4	99.4	10.7	60.3
38/18	Femenina	Inmaduro	18	58.7	70.2	11.5	6.2
37/18	Femenina	Inmaduro	18	94.3	97.4	32.9	71.5
44/18	Femenina	Maduro	20	8.7	37.5	57	98.8
50/38	Femenina	Maduro	42	86.9	99.2	44.2	97.6
71/38	Masculino	Maduro	22	94.7	98.2	68.9	94.7
28/48	Masculino	Maduro	23	76.4	98.4	5.3	79.1
42/28	Masculino	Maduro	25	80.1	79.5	20.3	18.8
42/48	Masculino	Maduro	25	91.6	96.9	85.7	96.8

Fuente: Elaborado por autores.

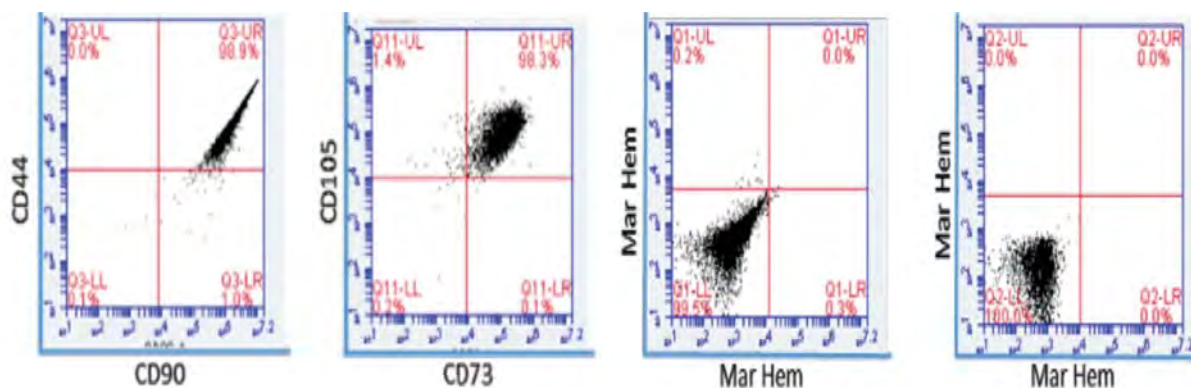
Se observó la expresión de al menos dos marcadores mesenquimales (CD44, CD90) con un porcentaje mayor del 80% en las muestras analizadas, además de que en los molares con ápice maduro se lograron mayor porcentaje de marcadores mesenquimales, sin embargo, en todas las muestras se logró un crecimiento celular de tipo fibroblastoide. Además, las células mostraron capacidad de autorrenovación al seguir

creciendo sin cambiar aparentemente su morfología y capacidad proliferativa.

*Multidiferenciación:* Se realizó además un ensayo para corroborar su multipotencialidad como células mesenquimales, mostrando positividad para diferenciarse a las 3 estirpes (fig. 4); condrogénica (b), osteogénica (d) y adipogénica (f). Se utilizaron DPSC sin medios de diferenciación como controles de cada tinción respectivamente (a, c y e).

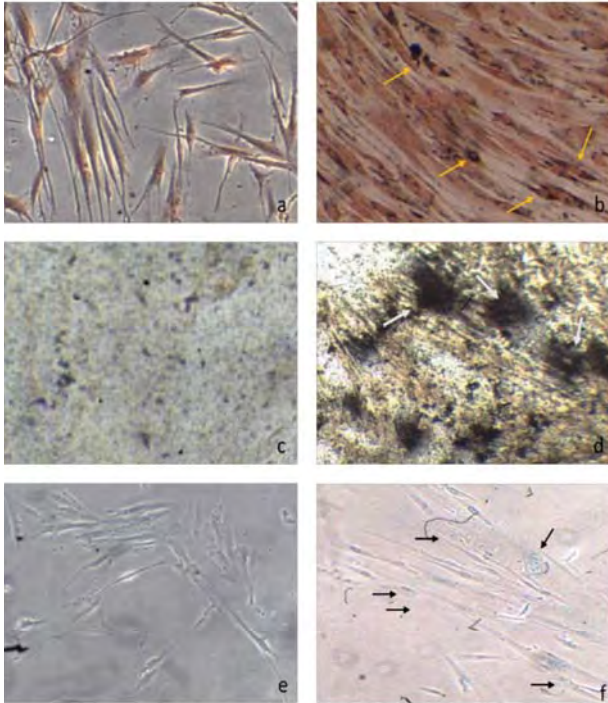
**Figura3.**

**Gráfico de puntos representativo de análisis de marcadores de tipo mesenquimal en DPSC aisladas**



Fuente: Elaborado por autores.

**Figura 4.**  
**Multidiferenciación hacia linajes adipogénico,  
osteogénico y condrogénico (40x)**



Fuente: Elaborado por autores.

#### Preservación celular

Una vez caracterizadas, las células se desprendieron con tripsina al llegar al 90% de confluencia y se llevó a cabo el registro de un “stock celular”, se identificaron con el mismo código para criopreservarlas en tanque de nitrógeno líquido.

#### Discusión

##### Mantenimiento de piezas dentales

En el presente trabajo determinamos que el medio de transporte para las piezas dentales RPMI-1640, mantenía un pH constante entre 7.2-7.5 por más tiempo respecto al MEM y Hank's, mostrando una mayor viabilidad celular de las DPSC, esto concuerda con varios protocolos de aislamiento de otros autores.<sup>20,21</sup> Aunque se ha reportado que las muestras dentales se pueden procesar para obtener DPSC, hasta 120 horas después de la extracción, nosotros observamos mayor crecimiento a un máximo de 24h en cadena fría.<sup>22,23</sup> Se descartó la posibilidad de preservar las piezas a -80°C ya que las 33 piezas dentales preservadas en ultra congelación por más de 24 horas se veían afectadas en rendimiento celular.

El proceso de limpieza del tercer molar antes de su procesamiento se realizó con diversas soluciones como suero fisiológico<sup>24</sup> o PBS estéril, seguido de una solución de povidona yodada al 1% y en tampón fosfato al 1%<sup>22</sup> o yodopovidona al 10% alcohol al 70%<sup>25</sup> reportando en algunos casos contaminación por hongos. Debido a esto se decidió implementar un tren de desinfección de la pieza dental, con anfotericina B, y después tres soluciones: Yodopovidona, PBS 1X con Penicilina/Estreptomicina y Clorhexidina. Si bien algunos cultivos se contaminaron debido a que el mismo origen y cirugía contribuyen a que se incremente la posibilidad, la implementación del tren de desinfección disminuyó los riesgos de contaminación.

#### Extracción de pulpa dental

En la actualidad ya se han reportado protocolos de extracción de pulpa dental no solo de terceros molares sino utilizando dientes primarios exfoliados la cual ya estaba expuesta<sup>26</sup> además también se han utilizado distintas técnicas para fracturar el diente como láser a nivel cervical para hacer microcanales<sup>27</sup> o con una pieza de alta velocidad para dejar la pulpa expuesta e incluso sacar la pulpa del ápice con un extractor pulpar.<sup>23,24,28</sup> En esta investigación realizamos dos técnicas de extracción pulpar, decidiendo optar por el corte transversal a nivel de tercio cervical del tercer molar con un disco de diamante y pieza de baja velocidad. Esto atribuido a que se puede proceder con la manipulación del tejido al tener mayor accesibilidad, por tal, se daña menos el tejido pulpar, además este procedimiento deja mayor accesibilidad a la pulpa radicular y recuperamos más tejido.

#### Aislamiento de DPSC

Los primeros investigadores en aislar DMSC, Gronthos y cols., realizaron la digestión de la pulpa con una solución de colagenasa tipo I y dispasa durante 90 minutos a 37 °C, otros autores utilizaron el mismo procedimiento de disgregación.<sup>11,29,30</sup> Mientras que Sasaki y cols. efectuaron la digestión DMSC de rata con tripsina/EDTA al 0.25% durante 15 minutos.<sup>31</sup> En el estudio de Brizuela, 2013 la disgregación la realizaron únicamente mecánica con una hoja de bisturí y cultivaron los explantes, es importante destacar que en este trabajo, únicamente se lograron muestrear terceros molares de pacientes jóvenes entre 16 y 18 años de edad.<sup>24</sup> En esta investigación se realizó la disgregación de la pulpa de manera mecánica seccionando la pulpa con una hoja de bisturí y digestiva agregando 1ml de enzima tripsina al 0.025%. Esta metodología favoreció la digestión de la pulpa dental ya que combinamos dos métodos y se redujo el tiempo de exposición de la pulpa a la tripsina. Además de ser más económica, también facilita disgregar el tejido de una manera rápida. La

tripsina al ser endopeptidasas, es capaz de actuar en las proteínas presentes en la membrana celular que median la adhesión por tal el tiempo de exposición ante esta enzima deber de ser corto, no más de 30 minutos si la tripsina se encuentra a 37°C o si es en frío, (4°C) entre 6 y 8 horas.<sup>32,33</sup> Por esta razón bajo nuestros procedimientos, esta enzima es efectiva ayudando al disgregar el tejido y permitir que las DMSC puedan desprenderse del mismo y adherirse al plástico de las botellas.

En las metodologías actualmente descritas no mencionan muchos detalles en cuanto al tiempo de obtención de DMSC o el método de cultivo realizado. Takeda y cols. detallan que obtienen DMSC a los 5 días de aislamiento.<sup>29</sup> Perry y cols. obtuvieron DMSC a las 24 horas de aislamiento.<sup>22</sup> En el estudio de Magallanes y col. en 2010, observaron crecimiento de 2 a 5 semanas posterior al cultivo.<sup>28</sup> En el procedimiento utilizado en esta investigación se obtuvo crecimiento de DMSC desde los 7 hasta los 21 días, estos rangos varían por muestra, nos dimos cuenta de que un factor muy importante para el crecimiento y proliferación celular es la edad del paciente, entre más joven sea el paciente mayor su capacidad de proliferación y por supuesto la integridad de la pulpa de un diente libre de caries e infección. En general se obtuvieron 180 muestras de terceros molares de pacientes de los cuales solo de 33 se obtuvieron cultivos DPSC, es importante aclarar que se utilizaron las primeras 89 muestras para estandarizar un protocolo que garantizara la obtención DPSC. Posterior a esto siguió existiendo problemas de contaminación de cultivos por hongos, pero disminuyó en demasía la cantidad. Otra constante que influyó en esta investigación fueron los terceros molares con ápice inmaduro, en estas piezas tenemos la presencia de papila apical y de un total de 36 muestras obtenidas el 38.8% dieron crecimiento DPSC. Comparando los datos de cultivos de terceros molares con ápice maduro e inmaduro tenemos como resultado que se obtuvieron mayor cantidad de cultivos DPSC en terceros molares con ápice inmaduro. Cabe resaltar que la mayoría de las muestras dentales que se lograron aislar y crecer las DPSC fueron de pacientes jóvenes lo que concuerda con lo reportado por otros autores, donde se indica que las muestras de personas mayores presentaron una menor capacidad proliferativa, de diferenciación y aumento en células apoptóticas.<sup>34</sup>

#### Caracterización de DPSC

La sociedad internacional de terapia celular (ISCT por sus siglas en inglés) establece criterios mínimos para definir células madres mesenquimales humanas como: adherencia al plástico en condiciones estándar de cultivo, morfología celular fibroblastoide, expresión de antígenos de superficie específicos como CD44, CD73, CD90, CD105, etc.<sup>35</sup> En esta

investigación al analizar los 33 cultivos de muestras viables, corroboramos las características mencionadas por la ISCT para las MSC, como la adherencia al plástico y morfología celular fibroblastoide. Para el análisis de expresión de antígenos de MSC característicos se seleccionaron 10 cultivos al azar, mostrando expresión de antígenos CD44, 73, 90 y 105, sin embargo en algunas muestras los porcentajes salieron bajos (<50%), probablemente causado por el método enzimático utilizado para su recolección y/o por los lavados de las células, lo que pudo dañar proteínas de membrana como ya se ha reportado.<sup>33</sup> Otra determinante es que el análisis se realizó entre los pasajes uno y dos, lo que puede dar lugar a que células de otro tipo se hayan mezclado, y estos otros tipos celulares no presentan altos porcentajes en estos marcadores mesenquimales. A pesar de esto se observó en todos los cultivos la morfología fibroblastoide y la adherencia al plástico que confirman su origen mesenquimal, además se corroboró la capacidad de multidiferenciación hacia condroblastos, osteoblastos y condrocitos observando su capacidad de diferenciarse hacia esos tipos celulares.

#### Conclusiones

Se logró implementar un procedimiento para el aislamiento de DPSC a partir del procesamiento de piezas dentales provenientes de población mexicana del estado de Jalisco. Se identificó que las piezas terceros molares provenientes de pacientes con una edad promedio de 25 años, con presencia de ápice inmaduro, ofrecen mayores posibilidades de aislar células troncales dentales.

También se logró identificar el medio de transporte RPMI-1640 es el adecuado para mantener la viabilidad celular durante los tiempos de traslado en cadena fría desde la extracción de la pieza dental hasta el aislamiento y cultivo de las células troncales provenientes de pulpa dental. Confirmamos que los cultivos obtenidos cumplían características de MSC como adherencia al plástico, morfología celular fibroblastoide y expresión de antígenos de superficie como CD44, CD73, CD90 y CD105, se observó autorrenovación celular al seguir proliferando las células, morfología fibroblastoide y capacidad de multidiferenciación hacia distintas estirpes.

#### Agradecimientos y Financiamiento

El proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo financiero del FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL SS/IMSS/ISSSTE-CONACYT.

Contacto: Dra. Flor Yohana Flores-Hernández  
e-mail. fflores@ciatej.mx

## Referencias bibliográficas

- Gomzikova MO, Rizvanov AA. Current Trends in Regenerative Medicine: From Cell to Cell-Free Therapy. *Bionanoscience* 2017;7(1):240–245.
- Uder C, Brückner S, Winkler S, Tautenhahn HM, Christ B. Mammalian MSC from selected species: Features and applications. *Cytom Part A* 2018;93(1):32–49.
- Yoshida S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Insight into the role of dental pulp stem cells in regenerative therapy. *Biology (Basel)* 2020;9(7):1–24.
- Lan X, Sun Z, Chu C, Boltze J, Li S. Dental pulp stem cells: An attractive alternative for cell therapy in ischemic stroke. *Front Neurol* 2019;10(JUL):824.
- Cho J, D'Antuono M, Glicksman M, Wang J, Jonklaas J. A review of clinical trials: mesenchymal stem cell transplant therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Am J Stem Cells* 2018;7(4):82–93.
- Masthan KMK, Leena Sankari S, Aravindha Babu N, Gopalakrishnan T. Mystery inside the tooth: The dental pulp stem cells. *J Clin Diagnostic Res* 2013;7(5):945–947.
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Research and Therapy*. 2019;10(1):68.
- Baniebrahimi G, Khanmohammadi R, Mir F. Teeth-derived stem cells: A source for cell therapy. *J Cell Physiol* 2019;234(3):2426–2435.
- Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Critical reviews in oral biology & medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 2009;88(9):792–806.
- Jesús L, Orta G. Investigación con células madre de origen dentario . Actualización . *Gac Dent* 2011;223:118–129.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(25):13625–30.
- Hendriks J, Riesle J, Blitterswijk CA van. Co-culture in cartilage tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2010;4(7):524–531.
- Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom (Kyoto)* 2016;56(4):144–153.
- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003;18(4):696–704.
- Armand Lorié M, Legrá Silot E, Ramos de la Cruz M, Matos Armand F. Terceros molares retenidos. Actualización. *Rev Inf Científica* 2015;92(4):995–1010.
- Campbell JH. Pathology Associated with the Third Molar. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*. 2013;25(1):1–10.
- Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, Hebling J, Oliveira CF, Caplan AI, et al. Scaling-Up of Dental Pulp Stem Cells Isolated from Multiple Niches. *PLoS One* 2012;7(6):e39885.
- Valencia R, Espinosa R, Nario H. Panorama actual de las células madre de la pulpa de dientes primarios y permanentes. *Rodyb* 2013;2:1–33.
- Lourenço Neto N, Pereira LF, Marques NCT, Prado MTO, Vitor LLR, Tokuhara CK, et al. Protocolo de armazenamento de células pulpaes de dentes decíduos humanos. *Brazilian Dent Sci* 2017;20(3):126–131.
- Pilbauerová N, Suchánek J. Cryopreservation of Dental Stem Cells. *Acta Medica (Hradec Kral Czech Republic)* 2018;61(1):1–7.
- Tomlin A, Sanders MB, Kingsley K. The effects of cryopreservation on human dental pulp-derived mesenchymal stem cells. *Biomater Biomech Bioeng* 2016;3(2):105–114.
- Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu T-MMG, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue Eng - Part C Methods* 2008;14(2):149–156.
- Viña Almunia J. Obtención y caracterización de células madre de pulpa dental humanas e interacción con  $\beta$ -fosfato tricálcico. 2013;:202.
- Brizuela C C, Galleguillos G S, Carrión A F, Cabrera P C, Luz C B, Inostroza S C. Aislación y Caracterización de Células Madre Mesenquimales Provenientes de Pulpa y Folículo Dentario Humano. *Int J Morphol* 2013;31(2):739–746.
- Vemuri MC, Chase LG, Rao MS. Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2011;698:3–8.
- Yasui T, Mabuchi Y, Morikawa S, Onizawa K, Akazawa C, Nakagawa T. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. 2017;:1–10.
- Gioventù S, Andriolo G. A novel method for banking dental pulp stem cells. 2012;(July 2014). doi:10.1016/j.transci.2012.06.005.
- Magallanes Fabián M, Carmona Rodríguez B, Álvarez Pérez MA. Aislamiento y caracterización parcial de células madre de pulpa dental. *Rev odontológica Mex* 2010;14(1):15–20.
- Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res* 2008;87(7):676–681.
- D'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental pulp stem cells: A promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008;4(1):21–26.
- Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Okano T, et al. Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor. *Eur J Neurosci* 2008;27(3):538–548.
- Beltrán NE, González CH. Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos. 2016.
- Mastrolia I, Foppiani EM, Murgia A, Candini O, Samarelli AV, Grisendi G, et al. Challenges in Clinical Development of Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Concise Review. *Stem Cells Transl Med* 2019;8(11):1135–1148.
- Anitua E, Troya M, Zalduendo M. Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytherapy* 2018;20(4):479–498.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 2006;8(4):315–7.