

Perfil de proteínas de células con características multipotentes derivadas del ligamento periodontal

José Abimael Marín Uc ^{1,2}, Ricardo Peñaloza Cuevas ¹, S. M. Teresa Hernández Sotomayor ⁴,
Beatriz Adriana Rodas Junco ^{1,3,*}

¹ Laboratorio Traslacional de Células Troncales de la Cavity Oral, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, C.P. 97000.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Carretera Mérida-Xmatkuil Km. 15.5 Apdo., Itzimná, Mérida, Yucatán, C.P. 97100.

³ CONACYT-Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico de Mérida Licenciado Manuel Berzunza 13615, Chuburna de Hidalgo Inn. Mérida, Yucatán, C.P. 97302.

⁴ Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, CP 97205.

Fecha de recepción: 28 de octubre de 2020 - Fecha de aceptación: 9 de junio de 2021

Resumen

Las células troncales del ligamento periodontal (CTLTP) son células mesenquimales de fácil obtención, elevada proliferación y con potencial multipotente. Asimismo, son consideradas interesantes modelos de estudio para la terapia celular. Los estudios moleculares sugieren que el análisis de las células de ligamento periodontal (CLP) desde un enfoque proteico podría contribuir a una comprensión más precisa y completa de los mecanismos que regulan su capacidad de autorrenovación y diferenciación celular. Por lo que, nuestro objetivo fue analizar el perfil de proteínas de células con características multipotentes derivadas del ligamento periodontal. Para ello las CLP fueron aisladas y caracterizadas por RT-PCR y ensayos de diferenciación celular. Posteriormente se realizó una electroforesis bidimensional (2D-E) con el fin de analizar el perfil proteico de las CLP. Los resultados demostraron que las CLP exhiben características de células mesenquimales multipotentes de origen dental. En relación con la 2D-E, reveló la sobreexpresión de spots de proteínas de 30-50 kDa y pI de 3-7 y una expresión menor de proteínas 20-150 kDa y un valor de pI de 3-10. Esto proporcionar una visión temprana de lo que estaría sucediendo hacia el compromiso celular.

Palabras clave: células troncales, células multipotentes, células del ligamento periodontal, electroforesis bidimensional, perfil de proteínas.

Protein Profile of Cells with Multipotent Characteristics Derived from Periodontal Ligament

Abstract

Periodontal ligament stem cells (PDLSC) are mesenchymal cells easily obtained, high proliferation and with multipotent potential. Likewise, they are considered interesting study models for cell therapy. Molecular studies suggest that the analysis of periodontal ligament cells (PLC) from a

*beatriz.rodas@correo.uady.mx

protein approach could contribute to a more accurate and complete understanding of the mechanisms that regulate its capacity of cell self-renewal and differentiation. Therefore, our objective was to analyze the protein profile of cells with multipotent characteristics derived from the periodontal ligament. For this the PLC were isolated and characterized by RT-PCR and cell differentiation assays. Subsequently, a two-dimensional electrophoresis was performed (2D-E) in order to analyze the protein profile of the PLC. The results indicate that the PLC exhibit characteristics of multipotent mesenchymal cells of dental origin. In relation to the 2D-E, revealed the overexpression of protein spots 30-50 kDa and pI 3-7 and a lower protein expression of 20-150 kDa and a pI value of 3-10. It could provide an early vision of what is happening towards cellular engagement.

Key words: stem cells, multipotent cells, periodontal ligament cells, two-dimensional electrophoresis, protein profile.

1 Introducción

Las células troncales mesenquimales (CTM) son células fibroblastoides con capacidad de autorrenovación y diferenciación celular. Las CTM en condiciones *in vitro* presentan adhesión a la superficie de cultivo, expresión de los marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105) y potencial de diferenciación hacia los linajes osteogénico, adipogénico y condrogénico (Guadix et al. 2017). En la cavidad bucal se han identificado diversas poblaciones de CTM, entre las que se encuentran las células troncales del ligamento periodontal (CTLP) (Rodas-Junco et al. 2017). Las CTLP poseen atributos tales como su fácil obtención, elevada capacidad de proliferación y potencial multipotente, que les convierten en interesantes modelos de estudio en el campo de la terapia celular (Eleuterio et al. 2013).

En los últimos años diversas poblaciones de células troncales han sido ampliamente estudiadas desde la perspectiva de la expresión génica, sin embargo, esto no es suficiente (van Hoof et al. 2012). Es por ello, que desarrollar análisis desde un enfoque proteico podría generar información relevante para comprender los mecanismos que orquestan la maquinaria celular.

En este sentido, Lu y colaboradores (2009) reportaron en células troncales de modelos

murinos durante el proceso de diferenciación temprana, que más del 50% de los cambios en la expresión de proteínas no correspondían con los cambios en la expresión del ARNm. Esto sugiere que el estado de las proteínas podría tener un papel importante durante la diferenciación celular (van Hoof et al. 2012). Además, el análisis a nivel proteómico podría proporcionar información más precisa y completa sobre la biología de las CLP, que podría contribuir con la comprensión de los mecanismos reguladores de la autorrenovación y diferenciación celular (Eleuterio et al. 2013).

En este contexto, pocos son los reportes que han abordado el estudio de las CLP desde un enfoque proteico. Por ejemplo, a partir de la proteómica comparativa se detectó la expresión diferencial de la proteína 3-oxoácido CoA-transferasa 1, asociada con la diferenciación y funciones neuronales, lo que exhibe el potencial neurogénico de las CLP (Eleuterio et al. 2013). El análisis de proteómica funcional ha permitido identificar a la proteína dedo de zinc como un inhibidor clave del proceso adipogénico en células del ligamento periodontal de modelos murinos (Peláez-García et al. 2014). O bien a la proteína laminina A como un elemento asociado con la maduración tisular y un candidato potencial en terapias de restauración tisular (Denes et al. 2019).

Es por ello que nuestro objetivo fue analizar el perfil de proteínas de células con características multipotentes derivadas del ligamento periodontal, con fines de explorar en un futuro aquellas proteínas involucradas durante su diferenciación adipogénica

2 Metodología

2.1 Obtención y transporte del órgano dentario

El ligamento periodontal (LP) se colectó de un tercer molar sistémicamente sano de un paciente masculino de 19 años, previo consentimiento informado. La colección del órgano dentario (OD) se realizó en la Clínica de Cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Investigación Ética del Centro Regional de Investigación Dr. Hideyo Noguchi, UADY (Número de Aprobación: CIE-06-2017).

El transporte y almacenamiento del OD se realizó siguiendo el protocolo modificado de Rivas-Aguayo (2018). Brevemente, posterior a la extracción el tercer molar se transfirió a un tubo cónico (Cornell) que contenía una solución estéril de búfer fosfato salino 1X (PBS: 138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ y 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4), suplementado con una solución al 1% de antibiótico/antimicótico [penicilina (100 UI/mL)/ estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco)], y se transportó en un contenedor refrigerado al Laboratorio Traslacional de Células Troncales-UADY.

2.2 Establecimiento y expansión de las poblaciones celulares del ligamento periodontal

Con el fin de establecer los cultivos celulares, el LP se retiró de la porción apical del tercer molar mediante una hoja de bisturí y se transfirió a un microtubo de 1.5 mL (Eppendorf) que contenía medio α -Minimum

Essential Medium (α -MEM) suplementado con 15% suero fetal bovino (SFB, Gibco) y 1% AA (medio basal completo).

El tejido se seccionó mecánicamente en fragmentos de 1 mm³, se transfirió a una caja Petri de 35 mm (Nest®) que contenía medio basal completo (α -MEM + 10% SFB + 1% AA) y se incubó en condiciones de cultivo estándar (37°C y 5% CO₂). Cuando el cultivo celular alcanzó el 80% de confluencia se realizó la tripsinización con una solución al 0.25% tripsina/EDTA (Gibco) para generar la expansión celular (pase 1, P1) sembrando una concentración de 5x10⁴ células/mL en cajas de cultivo T75 (Nest®) con medio basal completo. Las células se incubaron en condiciones de cultivo estándar y el cambio de medio se realizó cada 48 horas. Asimismo, se realizó el monitoreo del crecimiento celular in vitro con un microscopio de fase invertida (TCM400, LABOMED). El procedimiento se repitió hasta alcanzar el pase celular cuatro (P4).

2.3 Análisis por RT-PCR

Para analizar la expresión de los marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105) y el marcador de pluripotencia (*KLF-4*) en el cultivo celular, se realizó la extracción del ARN total de las CLP en P4 mediante el kit Quick-RNATM Mini-Prep (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del proveedor. La síntesis del ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 125 ng de ARN total mediante el kit de síntesis de ADNc RevertAid First Strand (Thermo Scientific), siguiendo las instrucciones del proveedor. La expresión de los marcadores seleccionados se analizó mediante PCR punto final. Para la reacción de PCR, una muestra de ADNc sin transcriptasa reversa se utilizó como control negativo. La mezcla de la reacción (25 µl) incluyó: 150 ng de ADNc, 10xPCR buffer (Taq DNA Polymerase #EP0402, Thermo Scientific), 200 mM dNTPs, 5Xmol de cada oligonucleótido (Cuadro 1) y una Unidad de Taq DNA polimerasa.

Tabla 1. Primers utilizados en el análisis por PCR punto final.

Gen	Secuencia		Tamaño del fragmento (pb)
	Forward	Reverse	
CD73	5' CAG CAT TCC TGA AGA TCC AAG-3'	5'-GAT TGA GAG GAG CCA TCC AG-3'	120
CD90	5'-GTC CTC TAC TTA TCC GCC TTC-3'	5'-GAC CAG TT GTC TCT GAG CAC-3'	123
CD105	5'-CTG AAG ACC AGG AAG TCC ATA-3'	5'-GAT GAG GAA GGC ACC AAA-3'	131
<i>KLF-4</i>	5'-TAC CAA GAG CTC ATG CCA CC-3'	5'-CGC GTA ATC ACA AGT CTG GG-3'	114

La reacción se sometió a un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C (dos minutos) seguido de 95 °C (40 segundos), el alineamiento se realizó a 55-61 °C de acuerdo con el cebador (40 segundos) en un total de 40 ciclos, y un ciclo de extensión a 72 °C (40 segundos) seguido de 72 °C (5 minutos). Los productos amplificados de la PCR se visualizaron en un gel de Agarosa al 1.5% (Certified PCR Agarose Bio-Rad) teñido con bromuro de Etidio, en un fotodocumentador (BIO-RAD).

2.3 Ensayo de diferenciación

2.3.1 Osteogénesis

Para la diferenciación osteogénica se sembraron 3×10^4 cel/mL de CLP P4 en medio osteogénico (medio basal completo suplementado con 0.1 μ M dexametasona, 50 μ M ácido ascórbico-2fosfato y 10 μ M B-glicerolfosfato) durante 14 días, con recambios parciales de medio de inducción cada 48 horas. La formación de depósitos de calcio se evaluó en el día 14 con la tinción con Rojo de Alizarina al 2% (p/v).

2.3.2 Adipogénesis

Para la diferenciación adipogénica se sembraron 2×10^4 cel/mL de CLP P4 en medio adipogénico (medio basal completo suplementado 1.7 μ M con insulina, 1 μ M

dexametasona, 500 μ M 3-isobutil-1metilxantina y 60 μ M indometacina durante 21 días con recambios parciales de medio cada 48 horas. La formación de vacuolas lipídicas se evaluó en el día 21 con la tinción con una solución al 0.03% (p/v) aceite Rojo. Los cambios morfológicos en respuesta a la osteogénesis y adipogénesis fueron monitoreados periódicamente mediante un microscopio de fase invertida (TCM400, LABOMED).

2.4 Extracción y preparación de proteínas totales de las células derivadas de ligamento periodontal

La extracción de proteínas totales de las CLP P4 se realizó mediante el búfer de extracción de proteínas Mammalian Protein Buffer Extraction (Healthcare) [MPEB: Tris hidroximetil-aminometano (<20 mM), Cloruro de sodio (<20 Mm), Tergitol-tipo NP-40 (<5%), Triron X-100 (<5%), Tween 20 (<5%)] complementado con el cocktail de inhibidores de proteasas (Protease Inhibitor Cocktail, P8340, Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente se realizó la precipitación de los extractos proteicos con base en el método de TCA/Acetona propuesto por Niu et al. (2018). Finalmente se realizó la cuantificación de las proteínas precipitadas mediante el método de Peterson (1977).

2.5 Electroforesis unidimensional (1D-E)

Para demostrar la calidad de las proteínas obtenidas, 30 µg de las mismas se resolvieron mediante gel al 12% de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie G-250 (BIO-RAD).

2.6 Electroforesis bidimensional (2D-E)

Para obtener el perfil de proteínas 2D de las muestras, se realizó la electroforesis en un amplio rango de anfótero (pH 3-10). El extracto proteico (100 µg) se resuspendió por 60 minutos a temperatura ambiente en una solución de 100 µl compuesta por 0.2% anfóteros, buffer de rehidratación (UREA, TIOUREA, CHAPS y DTT) y azul de bromofenol, con el fin de rehidratar las tiras IPH pH 3-10, 7 cm (Ready Strip IPG, BIO-RAD). Para separar las proteínas por su punto isoeléctrico (pI) se realizó el enfoque isoeléctrico en el sistema Zoom Runner (Invitrogen) a 250 V por 20 minutos, 4000 V por 120 minutos y 4000 V hasta alcanzar el voltaje total de 20,000 V/h.

Posteriormente las proteínas se separaron por su peso molecular (PM) a partir de una electroforesis en gel de poliacrilamida SD (SDS-PAGE). Se utilizó un sistema de electroforesis con geles de poliacrilamida al 12% (8 cm x 8 cm) y se separaron a 90V por 2.5 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250 (BIO-RAD). Finalmente, se obtuvo una imagen digital de los geles mediante un fotodocumentador (BIO-RAD) y el software PDQuest (BIO-RAD).

3 Resultados y discusión

3.1 Establecimiento y expansión de las poblaciones celulares del ligamento periodontal

Se estableció un cultivo celular derivado del LP por el método de explantes, cuya migración celular se detectó en el día 6 de cultivo celular (Fig. 1A). Asimismo, en los tres primeros pases celulares se observaron células heterogéneas de morfología fibroblastoide y esférica, las cuales transitaron hacia una morfología fibroblastoide única durante la expansión hacia el P4 (Fig. 1B).

Estudios previos han reportado el aislamiento de poblaciones celulares de origen dental por métodos mecánicos (explantes) y enzimáticos (Raoof et al. 2012; Tran et al. 2014). Sin embargo, pocos son los trabajos enfocados en las CLP. Por ejemplo, Tran y colaboradores (2014) emplearon terceros molares y condiciones de aislamiento similares a la presente investigación. Ellos reportaron que las CLP también presentaron morfologías heterogéneas al inicio de su cultivo, pero en el P4 predominaba la morfología fibroblastoide. Sin embargo, nuestros resultados difieren con autores quienes, en condiciones de aislamiento similares a la presente investigación, reportaron que las CLP presentaron morfología homogénea fibroblastoide durante todas las etapas de cultivo celular (Soheilifar et al. 2016; Trejo-Iriarte et al. 2017). No obstante, estos autores emplearon dientes premolares. Esto sugiere que el origen del tejido podría influir en las características morfológicas del cultivo celular.

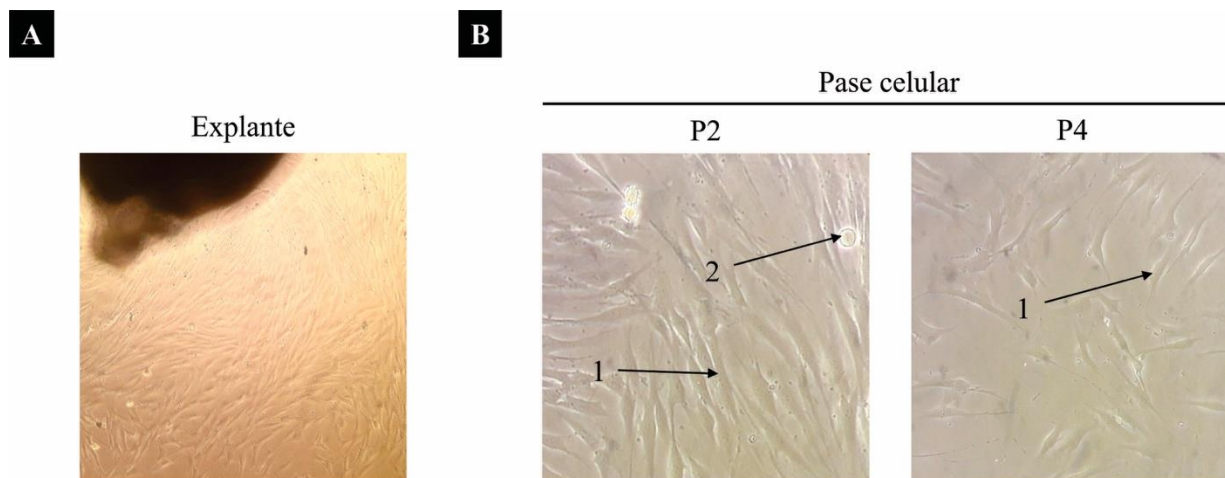


Figura 1. Establecimiento y expansión de las poblaciones celulares derivadas del ligamento periodontal. (A) Migración celular en los explantes derivados del ligamento periodontal. (B) Morfología celular representativa de las CLP en dos pases celulares. Las flechas indican los diferentes tipos de morfología celular observados en los cultivos: células de morfología fibroblastoide (1) y células de morfología esférica (2). Magnificación A 10x y B 20x.

3.2 Análisis por RT-PCR y ensayos de diferenciación en las células derivadas del ligamento periodontal

El perfil génico por RT-PCR mostró que las CLP expresaron los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, así como el marcador de pluripotencia celular *KLF-4* (Fig. 2A). Con respecto a los ensayos de diferenciación, se detectó la formación de depósitos de calcio y vacuolas lipídicas, lo que demuestra el potencial de diferenciación osteogénico y adipogénico de las CLP, respectivamente (Fig. 2B).

Estos resultados son interesantes, ya que los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 son considerados importantes en el grupo de las CTM (Romero et al. 2014). Diversos autores han demostrado la expresión de estos marcadores en diferentes modelos celulares de origen dental, como las células de la pulpa dental, las células del folículo dental y

las CLP (Yalvac et al. 2009; Potdar y Jethmalani, 2015; Song et al. 2016; Qu et al. 2020). Esto coincide con el perfil de expresión génica observada en el presente estudio. Por lo tanto, se infiere que el cultivo *in vitro* de CLP presenta características mesenquimales (Kadkhoda et al. 2016; Trejo-Iriarte et al. 2017).

Otra característica evaluada en el presente estudio fue el potencial de diferenciación hacia el linaje osteogénico y adipogénico. Los ensayos de diferenciación mostraron la capacidad de las CLP para formar depósitos de calcio y vacuolas lipídicas. Estos resultados concuerdan con Lindroos y colaboradores (2008) y Navabazam y colaboradores (2013), quienes en condiciones similares de diferenciación al presente estudio demostraron la capacidad multipotente de las CLP.

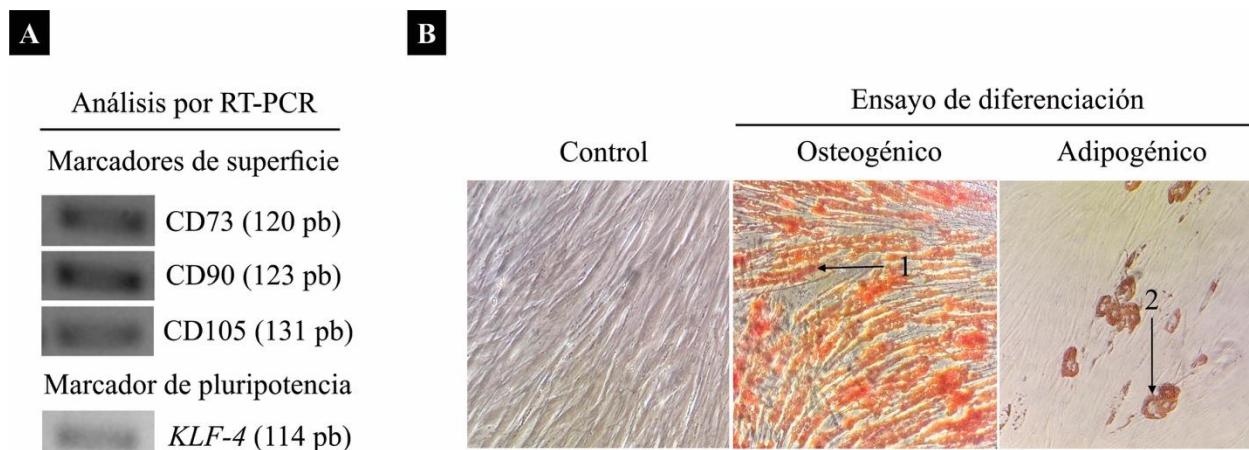


Figura 2. Análisis por RT-PCR y ensayos de diferenciación de las células derivadas del ligamento periodontal. (A) Perfil de expresión génica de los marcadores de superficie (CD73, CD90 y CD105) y el marcador de pluripotencia (*KLF-4*) en CLP P4, en geles de Agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de Etidio. (B) Ensayo de diferenciación osteogénica y adipogénica en CLP P4 tras 14 y 21 días de inducción, respectivamente. Las flechas señalan depósitos de calcio teñidos con Rojo de Alizarina al 2% (1) y vacuolas lipídicas teñidas con aceite Rojo al 0.03% (2). Magnificación 20x

Cabe resaltar que algunos reportes sugieren que la edad del paciente es un factor importante en la respuesta a la diferenciación celular, ya que el incremento en la edad está asociado con el deterioro de las características biológicas de las células troncales de origen dental (Iezzi et al. 2018; Li et al. 2020). Li y colaboradores (2020) reportaron en CLP aisladas de pacientes mayores a los 35 años escasa formación de depósitos de calcio y vacuolas lipídicas. En nuestro trabajo las CLP fueron aisladas de un paciente de 19 años, lo que explicaría la respuesta positiva hacia el linaje osteogénico y adipogénico. Estos resultados demuestran que las CLP aisladas en la presente investigación poseen características de células mesenquimales multipotentes.

3.3 Perfil de proteínas de las células derivadas de ligamento periodontal

El gel de electroforesis unidimensional mostró múltiples bandas de proteínas con un peso molecular de 30-50 kDa (Fig. 3A). Por su parte, el gel de electroforesis bidimensional reveló el perfil de proteínas de las CLP. En él,

se observaron múltiples spots de proteínas que mostraron un peso molecular de 20-150 kDa y un valor de pI de 3-10. En los cuales se detectó la sobreexpresión de spots de proteínas con un peso molecular de 30-50 kDa y un valor de pI de 3-7 (Fig. 3B).

El perfil de electroforesis bidimensional es una herramienta que permite detectar proteínas de interés que podrían ser marcadores moleculares en los procesos de autorrenovación y diferenciación en células troncales. En este contexto, autores como Eleuterio y colaboradores (2013) y Xiong y colaboradores (2016) reportaron proteínas derivadas de CLP con un PM de 30-50 kDa y un valor de pI de 3-7, entre las cuales se encuentran la proteína 1 del canal intracelular de cloruro (30 kDa y pI 5.40), la proteína 3-oxoácido CoA-transferasa 1 (34.6 kDa y pI 6.10), la proteína anexina A10 (35.5 kDa y pI 5.89), la proteína 2 similar a la estomatina (38.6 kDa y pI 6.9), la proteína reguladora de actina CAP-G (39 kDa y pI 6.0), la proteína citrato sintasa mitocondrial (40 kDa y pI 7.78) y la proteína vimentina (53.7 kDa y pI 5.1)

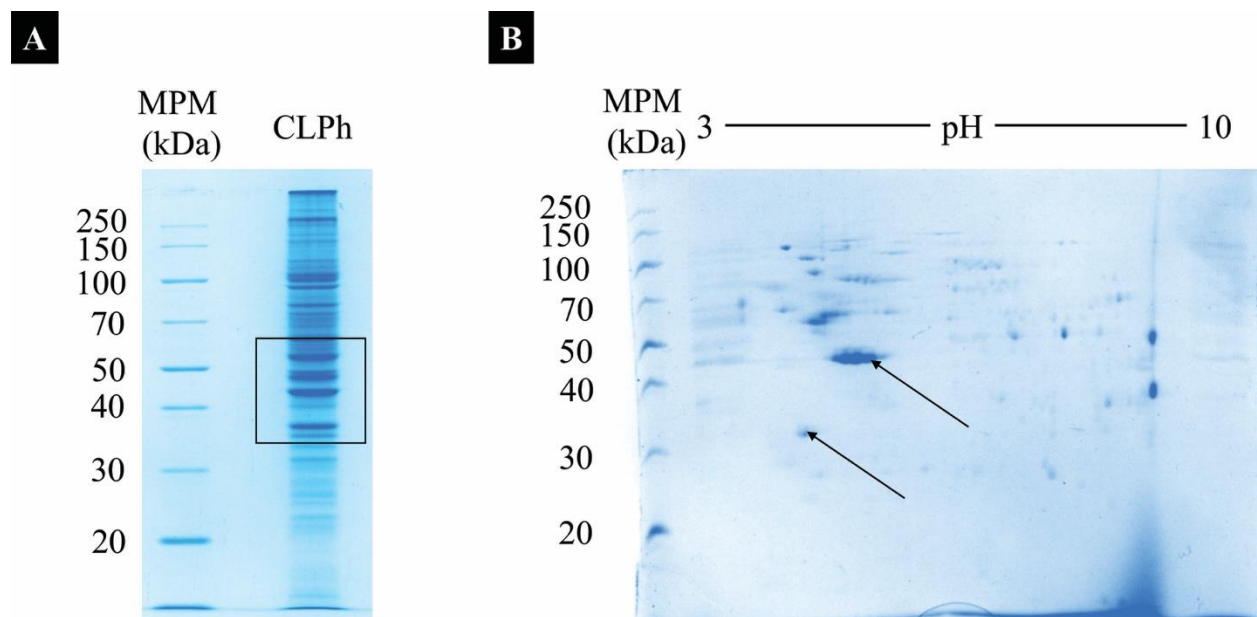


Figura 3. Perfil de proteínas en células de ligamento periodontal en P4. (A) patrón de bandas de la 1D-E para demostrar la calidad de las proteínas, en negro se indica la sobreexpresión de bandas de proteínas con un PM de 30-50 kDa. (B) Perfil de proteínas de CLP en 2D-E, las flechas señalan la sobreexpresión de spots de proteína con un PM de 30-50 kDa y pI de 3-7. Geles SDS-PAGE al 12% teñidos con Azul de Coomassie.

Algunas de estas proteínas poseen características de interés terapéutico. De acuerdo con Takenouchi et al. (2004), la disminución en los niveles de la proteína vimentina se asocia con el reordenamiento de la proteína actina y la acumulación de gotas lipídicas en la adipogénesis de preadipocitos bovinos. Por su parte, Feng et al. (2017) reportó que el incremento en los niveles de la proteína 2 similar a la estomatina se encuentra asociada con la proliferación y diferenciación de células troncales durante la decidualización en modelos murinos y humanos. Finalmente, los estudios de Peretti et al. (2018) sugieren que la proteína 1 del canal intracelular de cloruro es decisiva para la proliferación de células troncales cancerosas en modelos humanos, lo cual la convierte en un objetivo terapéutico para tumores cerebrales. Todo esto muestra el

alcance que los análisis proteómicos pueden tener como objetivos terapéuticos.

Sin embargo, nuestros resultados aún no son concluyentes, ya que se requiere de estudios que permitan la identificación precisa de las proteínas que se expresaron bajo las condiciones de trabajo. Por ejemplo, la espectrometría de masas es una técnica ampliamente aceptada para el análisis de perfiles de proteínas (Flores-Luna et al. 2018). Esto permitiría comparar los resultados de la presente investigación con reportes previos en condiciones similares y proporcionar información que contribuya con la comprensión de las CLP desde un enfoque proteico.

4 Conclusiones

Estos resultados preliminares sugieren que las células aisladas de LP poseen características mesenquimales y respuesta positiva a la diferenciación celular. Además, el perfil proteómico mostró que existen proteínas que incrementan su expresión bajo condiciones estándar de cultivo, lo cual podría proporcionar una visión temprana de lo que estaría sucediendo hacia el compromiso celular.

5 Agradecimientos

La presente investigación es financiada por el CONACYT en el marco del programa Cátedras-CONACYT (proyecto número 1882). También se agradece a la Facultad de Ingeniería Química y a la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán, así como a la M. en C. Ligia Brito Argaez y al Dr. Víctor Aguilar Hernández de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por el apoyo brindado en la presente investigación.

Referencias

- Denes, B.J., Bolton, C., Illsley, C.S., Kok, W.L., Walker, J.V., Poetsch, A., Tredwin, C., Kiliaridis, S., Hu, B. (2019). Notch Coordinates Periodontal Ligament Maturation through Regulating Lamin A. *Journal of Dental Research*, 98(12), 1357-1366. <http://doi.org/10.1177/0022034519871448>
- Eleuterio, E., Trubiani, O., Sulpizio, M., Di Giuseppe, F., Pierdomenico, L., Marchisio, M., Giancola, R., Giammaria, G., Miscia, S., Caputi, S., Di Ilio, C., & Angelucci, S. (2013). Proteome of Human Stem Cells from Periodontal Ligament and Dental Pulp. *PLoS ONE*, 8(8), e71101. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071101>
- Feng, Q., Hu, Z.-Y., Liu, X.-Q., Zhang, X., Lan, X., Geng, Y.-Q., Chen, X.-M., He, J.-L., Wang, Y.-X., Ding, Y.-B. (2017). Stomatin-like protein 2 is involved in endometrial stromal cell proliferation and differentiation during decidualization in mice and humans. *Reproductive BioMedicine Online*, 34(2), 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2016.11.009>
- Flores-Luna, M. G., López-Ávila, B.E., Liceaga-Escalera, C. G., Trejo-Iriarte, C., Rodríguez, M. A., Gómez-Clavel, J. F., Hernández-López H. R. & García-Moñuz, A. (2018). Analysis of proteinic profile in oral lichen planus. *Integrative Molecular Medicine*, 5(1), 1-7. <http://doi.org/10.15761/IMM.1000318>
- Guadix, J. A., Zugaza, J. L., y Gálvez-Martín, P. (2017). Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clínica*, 148(9), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.033>
- Kadkhoda, Z., Rafiei, S. C., Azizi, B., & Khoshzaban, A. (2016). Assessment of Surface Markers Derived from Human Periodontal Ligament Stem Cells: An In Vitro Study. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 13(5), 325–332.
- Iezzi, I., Cerqueni, G., Licini, C., Lucarini, G., & Mattioli, M. (2018). Dental pulp stem cells senescence and regenerative potential relationship. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 7186–7197. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27472>

- Li, X., Zhang, B., Wang, H., Zhao, X., Zhang, Z., Ding, G., & Wei, F. (2020). The effect of aging on the biological and immunological characteristics of periodontal ligament stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01846-w>
- Lindroos, B., Mäenpää, K., Ylikomi, T., Oja, H., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2008). Characterisation of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 368(2), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.01.081>
- Lu, R., Markowetz, F., Unwin, R. D., Leek, J. T., Airoidi, E. M., MacArthur, B. D., Lachmann, A., Rozov, R., Ma'ayan, A., Boyer, L., Troyanskaya, O., Whetton, A., Lemischka, I. R. (2009). Systems-level dynamic analyses of fate change in murine embryonic stem cells. *Nature*, 462(7271), 358–362. <https://doi.org/10.1038/nature08575>
- Navabazam, A. R., Sadeghian-Nodoshan, F., Sheikhhha, M. H., Miresmaeili, S. M., Soleimani, M., & Fesahat, F. (2013). Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(3), 235–242.
- Niu, L., Zhang, H., Wu, Z., Wang, Y., Liu, H., Wu, X., & Wang, W. (2018). Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PloS ONE*, 13(12), e0202238. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202238>
- Peláez-García, A., Barderas, R., Batlle, R., Viñas-Castells, R., Bartolomé, R. A., Torres, S., Mendes, M., Lopez-Lucendo, M., Mazzolini, R., Bonilla, F., García de Herreros, A., Casal, J. I. (2014). A Proteomic Analysis Reveals That Snail Regulates the Expression of the Nuclear Orphan Receptor Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 6 (Nr2f6) and Interleukin 17 (IL-17) to Inhibit Adipocyte Differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 14(2), 303–315. <http://doi.org/10.1074/mcp.M114.045328>
- Peretti, M., Raciti, F.M., Carlini, V., Verduci, I., Sertic, S., Barozzi, S., Garré, M., Pattarozzi, A., Daga, A., Barbieri, F., Costa, A., Florio, T., Mazzanti, M. (2018). Mutual Influence of ROS, pH, and CLIC1 Membrane Protein in the Regulation of G1-S Phase Progression in Human Glioblastoma Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(11), 2451-2461. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-1223>
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83(2), 346-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90043-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90043-4)
- Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 7(5), 839–851. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i5.839>
- Qu, C., Brohlin, M., Kingham, P.J., Kelk, P. (2020). Evaluation of growth, stemness, and angiogenic properties of dental pulp stem cells cultured in cGMP xeno-/serum-free medium. *Cell and Tissue Research*, 380, 93–105. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03160-1>

- Raoof, M., Yaghoobi, M. M., Derakhshani, A., Kamal-Abadi, A. M., Ebrahimi, B., Abbasnejad, M., & Shokouhinejad, N. (2014). A modified efficient method for dental pulp stem cell isolation. *Dental Research Journal*, 11(2), 244–250.
- Rivas-Aguayo A. (2018). Establecimiento de metodologías para el aislamiento y cultivo in vitro de células troncales de la pulpa dental humana de terceros molares. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma De Yucatán
- Rodas-Junco, B. A., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A., De-la-Peña, C., & Nic-Can, G. I. (2017). Stem Cells from Dental Pulp: What Epigenetics Can Do with Your Tooth. *Frontiers in Physiology*, 8, 999. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00999>
- Romero, S., Córdoba, K., Martínez Valbuena, C. A., Gutiérrez Quintero, J. G., Durán Riveros, J. Y, y Munévar Niño, J. C. (2014). Marcadores candidatos, estrategias de cultivo y perspectivas de las DPSCs como terapia celular en odontología. *Revista Odontológica Mexicana*, 18(3), 156-163. [http://doi.org/10.1016/S1870-199X\(14\)72065-8](http://doi.org/10.1016/S1870-199X(14)72065-8)
- Soheilifar, S., Amiri, I., Bidgoli, M., & Hedayatipناه, M. (2016). Comparison of Periodontal Ligament Stem Cells Isolated from the Periodontium of Healthy Teeth and Periodontitis-Affected Teeth. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, 13(4), 271–278.
- Song, B., Jiang, W., Alraies, A., Liu, Q., Gudla, V., Oni, J., Wei, X., Sloan, A., Ni, L., & Agarwal, M. (2016). Bladder Smooth Muscle Cells Differentiation from Dental Pulp Stem Cells: Future Potential for Bladder Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2016, 6979368. <https://doi.org/10.1155/2016/6979368>
- Takenouchi, T., Miyashita, N., Ozutsumi, K., Rose, M. T., Aso, H. (2004). Role of caveolin-1 and cytoskeletal proteins, actin and vimentin, in adipogenesis of bovine intramuscular preadipocyte cells. *Cell Biology International*, 28(8-9), 615-23. <http://doi.org/10.1016/j.cellbi.2004.05.003>
- Tran Hle, B., Doan, V. N., Le, H. T., Ngo, L. T. (2014). Various methods for isolation of multipotent human periodontal ligament cells for regenerative medicine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 50(7), 597-602. <http://doi.org/10.1007/s11626-014-9748-z>
- Trejo-Iriarte, C. G., Ramírez Ramírez, O., Muñoz Garcia, A., Verdín Terán, L., Gómez Clavel, J. F. (2017). Isolation of periodontal ligament stem cells from extracted premolars. Simplified method. *Revista Odontológica Mexicana*, 21(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.rodex.2017.02.006>
- van Hoof, D., Krijgsveld, J., & Mummery, C. (2012). Proteomic analysis of stem cell differentiation and early development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a008177. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008177>
- Xiong, J., Menicanin, D., Zilm, P. S., Marino, V., Bartold, P. M., Gronthos, S. (2016). Investigation of the Cell Surface Proteome of Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1947157>
- Yalvac, M.E., Ramazanoglu, M., Gumru, O.Z., Sahin, F., Palotás, A. Rizvanov, (2009). Comparison and Optimisation of Transfection of Human Dental Follicle Cells, a Novel Source of Stem Cells, with Different Chemical Methods and Electro-poration.

Neurochemical Research 34, 1272–1277 (2009). <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9905-4>