



Biologia zelular eta Histologia Saila
Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea
Euskal Herriko Unibertsitatea

Birsortze neuralean erabiltzeko hortz muineko ama zelulen gaitasun funtzionalaren azterketa

Jon Luzuriaga Gonzalez

Leioa, 2018

Zuzendariak:

Dr. Gaskon Ibarretxe Bilbao

Dr. Fernando Unda Rodriguez

Aurkibidea

Laburpena.....	1
Laburdurak.....	5
Sarrera.....	9
Zelula amak.....	11
Zelula ama enbrionikoak.....	13
Zelula ama helduak.....	13
Zelula ama hematopoietikoak.....	13
Zelula ama oso txikiak /eplibasto moduko zelula amak.....	14
Zelula ama neuralak.....	15
Bihurtutako zelula amak.....	16
Zelula ama mesenkimalak.....	17
Hezur-muineko zelula amak.....	18
Gantz ehuneko zelula ama mesenkimalak.....	21
Zilbor-hesteko zelula amak.....	24
Hortz mamiko zelula amak.....	29
Metodologia.....	69
Hipotesia.....	77
Helburuak.....	81
Emaitzak eta Eztabaida.....	85
I.atala.....	87
II.atala.....	91
III.atala.....	95
Eztabaida Nagusia.....	99
Ondorioak.....	113
I.eranskina.....	117

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Laburpena

eman ta zabal zazu



UPV EHU



Ezaguna da hartz muin helduak zelula ama populazio garrantzitsu bat duela barnean, hauei, hartz muineko zelula amak deritze (ingelesez, dental pulp stem cells, DPSCs). Oinarritzko egoeran aurkezten dituzten zelula neuralen markatzaileak, zelula ama neuralek baino irisgarritasun handiagoa, jatorrizko organoaz kanpo hedatzeko ahalmena eta neurodesberdintzapen ahalmenak, bakarrak bilakatzen dituzte giza DPSCs-ak (gDPSCs-ak) gorputz helduan aurkitu daitezkeen beste zelulekiko. Izan ere, birsorkuntza neuraleko terapia zelular autologoetan erabilgarriak izan daitezke. Normalean erabiltzen diren hazkuntza eta mantentze medioek behi serum fetala (BFS) dute konposatu garrantzitsuena bezala, zeinek gDPSCs-en hazkuntza azkarra eta azalerako geruza bakar itxurako hazkuntza zelularra eragiten duen. Era berean, BFS-aren presentziak alergiak, zein erreakzio immunearen aktibazioa eragin ditzakela deskribatua dago *in vivo*, konposatu honen erabilera tratamendu klinikoetatik baztertzea ezinbestekoa delarik. BFS-ak sor ditzakeen arazo medikotik at erabilgarritasun arazoak ere sor ditzake, izan ere, serumaren presentzian gDPSCs-ak leinu mesenkimaletara bideratzen direla, eta beraz, potentzial neurogenikoa galera dagoela aztertu dute zenbait autorek literaturan. BFS-aren erabilerak dakartzan eragozpen guztiek ezinbestekoa egiten dute serum gabeko eragile neurogeniko berritzaileen diseinua eta hobekuntza.

Hurrengo lanean, serum gabeko hazkuntza mediotan ereindako zelulen ezaugarriak ezagutzea izan da gure xedea. Lortutako emaitzek inolako aldaketa genetiko edo epigenetikorik jasan izan ez duten gDPSCs-ak, zelula ama neuralek (ingelesez, neural stem cells, NSCs) sortzen dituzten neuro-esfera egituren antzeko hartz-esferak sortzeko duten ahalmena berretsi zuten. Hortaz aparte, bai serum gabeko zein serum-dun hazkuntza mediotan hazitako gDPSCs-ek zelula ama mesenkimal izaera eta ezaugarri pluripotenzialak mantentzeko gai zirela frogatu genuen. Hala ere, erabili genituen serum gabeko hazkuntza ingurune espezifikoek ezaugarri desberdinak erantsi zizkien gDPSCs-ei. gDPSCs-ak Neurocult™ desberdintzapen neurogeniko medioan, NSCs-ak egunerokotasunez desberdintzeko erabiltzen den serum gabeko hazkuntza medioa, izan zirenean haziak, hauek glia eta neurona markatzaile helduak adierazteko gaitasuna zutela ikusi genuen. Honetaz aparte, markatzaile ama mesenkimal eta neural goiztiarrak adierazten dituzten genetikoki aldatu bariko gDPSCs-ez gain, CD31, markatzaile endoteliala, adierazten zuten gDPSCs-ak deskribatzen lehenak izan gara serum gabeko hazkuntza ingurunea erabiliz. Kasu honetan, Neurocult™ hedapenerako medioa erabili genuen. Gainera, timo-gabeko xagu biluzietan garezur barneko gDPSCs-en txertaketa eta hilabete baten ostera, CD31⁺, Nestina⁺ zelulak burmuineko odol-hodien zelula endotelialekin batera elkarbizitzen eta hauen laminina adierazpena areagotzen aurkitu ziren. Bestalde, gDPSC-ak StemPro MSC™ (STP) izeneko, zelula ama mesenkimalentzako hazkuntza ingurune komertzialean haziak izan zirenen. Era berean, STP-k zelulei eskainitako aldaketa molekular eta fisiologikoak erabiliz, markatzaile pluripotenzialen eta gandor neuralen (GN) markatzaileen handipen bat antzeman genuen

gDPSCs-ek aurkeztutako ahalmen neurogenikoaren igotzearekin batera. Honek guztiak, gandor neuraleko ama zeluletarantz (ingelesez, neural crest stem cells, NCSCs), hau da leinu primitibo baterantz atzera pausu bat iradokitzen du.

Gure emaitzek, serum gabeko erabilera gDPSC-ak hazteko egokia dela adierazten dute. Ez ziren bakarrik serum-aren erabilerarekin erlazioatutako arazoak ekidin, baizik eta leinu neuraletara asko erraztu dezakeen gandor neuraleko ama izaeraren agerpena lortu zen. Neurodesberdintzapenetik harago, serum gabeko eragileak erabiliz gDPSCs-tatik eratorritako zelula endotelial funtzionalak, burmuinean integratzeko eta odol hodiak sortzeko gaitasuna erakutsi zuten, lortzen lehen taldea izan gara

Laburbilduz, gDPSCs-en zelulen bideragarritasunarekin, “amatasun”-arekin, ahalmen neurogenikoarekin zein sistema biziekin izan dezaketen elkarrekintzekin zerikusia duten serum gabeko zelula hazkuntzek sor ditzaketen zalantzak argituak izan dira. Gorago aipatutako ezaugarriekin batera gDPSCs-ek erakutsitako gaitasun neurogeniko eta berriki aztertutako zelula endotelialetara desberdintzeko ahalmenak ikusita, gDPSCs-ak nerbio-ehun birsortze terapietan erabiltzeko gizaki helduetan aurki daitezkeen zelula ama aproposenak direla ondorioztatu daiteke.

Hitz gakoak: Hartz muineko zelula amak, DPSCs, Hartz-esfera, Hazkuntza medioak, Serum-gabeko, Desberdintzapen zelularra, Neurogenikoa, Endoteliala, Biziraupen zelularra, Birsortze medikuntza.

Laburdurak

A β = Beta amiloidea

AG = Alzheimer-en Gaixotasuna

AT-MSCs= Adipose tissue mesenchymal stem cells

bFGF= fibroblast growth factor

BEML= Bizkarrezur-muineko lesio

BFS= Behi serum fetala

BHA= Hidroxianisol butilatua

BME= b-merkaptetanola

BDNF= Brain derived neurotrophic factor

BMPxxx= Bone morphogenetic protein xxx

BM-MSCs= Bone marrow mesenchymal stem cells

CCl₄= Carbon tetrachloride

CDxxx= Cluster Differentiation

CLECs = Cord lining epithelial cells

CLMCs= Cord lining mesenchymal cells

KT1= Kardiotrofiina-1

DA= Dopaminergikoa

DARPP = Cyclic AMP regulated phosphoprotein

DFSCs= Dental follicule stem cells

DMEM= Dubbelco's modified eagle's medium

DMP1= Dentina matrizearen 1 proteina

DMSO= Dimetilsulfoxidoa

DSPP = Dentina sialofosfoproteina

ECCs= Embryonal carcinoma cells

EGF = Epidermal growth factor

EMSCs= Ectomesenchymal stem cells

EMT= Epitelio-mesenkima trantsizioa
EPSCs= Endothelial progenitor cells
ESC= Embryonic stem cells
FPO= Fabrikazio prozedura onak
GDNF = Glial cell line derived neurotrophic factor
gDPSCs= Giza DPSCs
gESC= Giza ESCs
GAB= Gune azpibentrikularra
GAG= Hipokanpoko gune azpigranularra
GFAP= Glial fibrillary acidic protein
HHF= Hepatozitoen hazkuntza faktorea
HNF-4 α = Nuclear factor 4 α
HSC= Hematopoietic stem cells-ak
IBMX= 3-isobutil-1-metilxantina
ICM= Inner cell mass of the blastocyst
IDO= Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IL-xx= Interleukina-xx
ITSx= Insulin-Transferrin- Selenium-x
LMX1a = LIM homoeo- box transcription factor 1 α
MAP-2= Microtubule-associated protein-2
MCAO= Middle cerebral artery occlusion
MI = Miokardioko infartua
MOE= Munduko Osasun Elkarte
MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MTSCC= Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee
MSC= Mesenchymal stem cells-ak
NCSCs= Neural crest stem cells-ak
NeuN= Neuronal nuclei protein
NGF= Nerve growth factor

NTRK_{xx}= Neurotrophic tyrosine kinase

NT-3= Neurotrophin 3

NSC= Neural stem cells

NSP= Nerbio sistema periferikoa

NSZ= Nerbio sistema zentrala

OSX= Osterix

OGD= Oxigeno-glukosa depribazioa

Pdx1= Duodenal homeobox 1

PDLSCs= Periodontal ligament stem cells

PG= Parkinsonen Gaixotasuna

PitX= Paired-like homeodomain transcription factor

POSS-PCL= Polyhedral oligosilsesquioxane poly (ϵ -caprolactone)

POSS-PCU= Polyhedral oligomeric silsesquioxane poly (carbonate-urea) urethane

PPSCs= Primitive pluripotent stem cells

PSCs= Pluripotent stem cells-

RA = Azido erretinoikoa

RGCs= Retinal ganglion cells

RhoA= Ras homolog gene family member A

RUNX2= Runt-related transcription factor 2

SCAP= Stem cells from apical papilla

SFCs = Synovial fluid cells

SHED= Stem cells from primary exfoliated deciduous teeth

Shh= Sonic hedgehog

SSEA= State-specific embryonic antigens

STP= StemPro MSCTM

SUR1= Sulfonyl- urea receptor1

TERT= Telomerase reverse transcriptase

TGF- β 3=Transforming growth factor- β III

TH = Tirosina hidroxilasa

TLR x= Toll-like receptor x

TNF- α = Tumor necrosis factor- α

TON= Traumatic optic neuropathy

TZEI= Terapia Zelularrentzako Elkartea Internazionala

UCB-SCs = Umbilical cord blood stem cells

UC-MSCs= Umbilical cord mesenchymal stem cells

VMAT = Vesicular monoamine transporter

VSELS = Very small embryonic-like stem cells

xESC = xagu ESCs

ZAEMB= Zelula Ama Ehun eta Mesenkimen Batzordea

ZKM= Zelulaz Kanpoko Matrisea

ZOPM= zeluletan-oinarritutako produktu medikoak

6-OHDA= 6-hidroxidopamina

Sarrera

eman ia zabal zazu



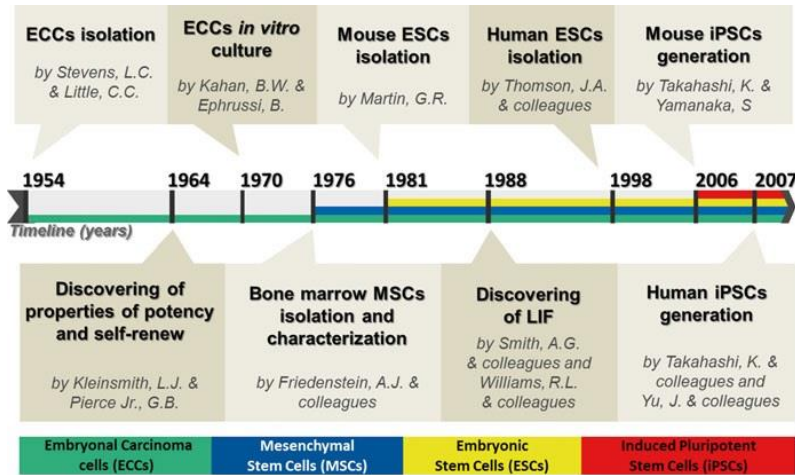
UPV EHU

1. Zelula amak

Zelula amak, klasikoki auto-berritzeko gaitasuna, beraien kopiak egitea, eta baldintza fisiologiko eta esperimental batzuen menpe organo eta ehun desberdinetako zelula helduetara desberdintzeko ahalmena duten zelulak bezala izan dira definituak (Potten and Loeffler, 1990).

Zelula amak 1950-ean izan ziren lehenengoz deskribatuak, ikertzaileek teratokartzinomatik kartzinoma enbrionarioko zelulak (ingelesez, embryonal carcinoma cells, ECC) isolatu zituztenean (Stevens and Little, 1954; Yu and Thomson, 2008). Urte batzuk beranduago 1964-an, Kleinsmith eta Pierce-k zelula hauen hiru hozi-geruzatara desberdintzeko ahalmena frogatu zuten. Auto-berritze eta leinu desberdinetara desberdintzeko abilezia kontuan izanda, zelula ama pluripotenteen (ingelesez, pluripotent stem cell, PSC) kontzeptua jaio zen, horrela lehen giza eta xagu ama zelula enbrionarioen (ingelesez, embryonic stem cell, ESC) deskripzioa sustatuz. Ikasketa eta hedapenarekin batera eman ziren aurkikuntza guzti hauek *in vitro* eredutan baino ez landu ikertzaile batzuk *in vivo* ereduekin hasi ziren arte (Kahan and Ephrussi, 1970). ECC-en antzerako *in vivo* eredua bilatzeko lanetan, blastozisto barneko zelula masa (ingelesez, inner cell mass, ICM) aztertu zen (Martin, 1980). ICM-ak oraindik ECC-ek zuten baino desberdintzapen ahalmen handiagoa zuten, hauen erabilera asko hedatu zelarik garapenerako *in vitro* eredutan. ICM-a blastozistoan dago kokaturik garapen enbrionarioan. Zigotoa zatitu eta morula egitura osatu denean, kanpo geruzako zelulak trofektodermora desberdintzen dira, zeintzuk plazenta eratuko duten. ICM-ak berriz, gorputz helduko zelula guztiak sortuko ditu. Bai giza ESCs-ak (gESCs) zein xagu ESCs-ak (xESCs), giza eta xagu blastozistotik lortutako ICM-tik eratorriak izan ziren. gESC-ak kariotipikoki normalak dira eta hiru hozi-geruzatara desberdintzeko gaitasuna mantentzen dute (Amit et al., 2000).

Laburki, ama zelula mesenkimalen (ingelesez mesenchymal stem cells, MSCs) pluripotentzia hauek leinu zelular mesenkimaletara; osteoblasto, kondrozito, adipozito eta mioblastoetara alegia, desberdintzeko erakutsitako gaitasunaren arabera izan zen deskribatua. Hain zuzen ere, hozi-geruza batera desberdintzeko ahalmena multipotentzia bezala deskribatu zen. Lehenengo MSCs-ak hezur muineko zelulak hazi eta itsaskorak aukeratzen lortu ziren (Chamberlain et al., 2007; Friedenstein et al., 1976) (1. irudia).



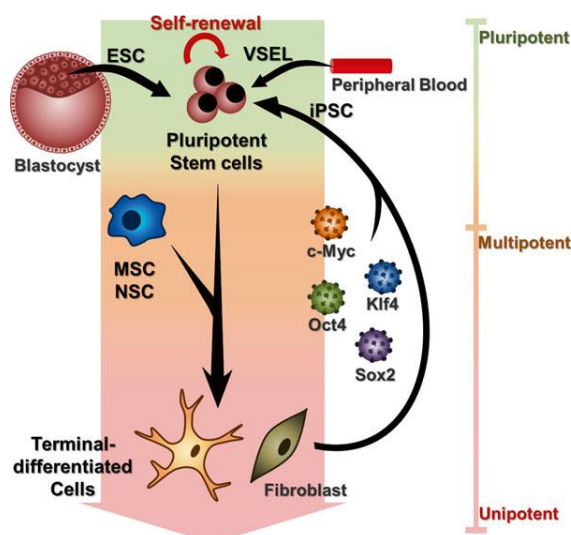
1. irudia. Zelula aman ikerketa historian zehar jasotako lorpenik garrantzitsuenak (Oliveira et al., 2016).

Ama zelulen desberdintzapen potentziala zelula aurkitzen den garapen aldiaren araberakoa da. Hau kontuan izanda ama zelulak hiru taldetan bana ditzakegu:

Totipotenteak: Zelula hauek banako bat sor dezakete, enbrioia eta denboraldiko sostengu ehunak (plazenta eta zilbor-hestea) sortzeko ahalmena dute. Zelulen totipotenzialtasuna ernalketatik lehenengo zatiketa arte, hau da 4 eguneko aldi blastomeriko arte irauten du (Brook and Gardner, 1997).

Pluripotenteak: Blastozistoa, lehenengo 4 egunetan zelula enbrionarioek jasaten duten desberdintzapenean zehar eratzen da. Blastozisto barneko ICM-ak dira pluripotente bezala deskribatu diren zelula amak. Hauek 3 hozi-geruzetako edozein zeluletara desberdintza daitezke, eta ondorioz edozein organo edo ehun sortu. Hala ere, zelula hauek ez dute plazenta bezalako enbrioi kanpoko ehunik sortzeko gaitasunik (Smith, 2001).

Multipotenteak: Goian aipatutako 2 zelula motekin konparatuz ama zelula multipotentzialen desberdintzapen gaitasuna oso mugatua dago. Zelula hauek zelula mota gutxi batzuetan baino ezin dira desberdindu, hozi- bateko zeluletara normalean. Hauen funtzio biologikoa jatorrizko ehunaren konponketarekin dago erlazionatua (Slack, 2000; Spangrude et al., 1988).



2. irudia. Zelula ama pluripotenteen desberdintzapen ahalmena eta beraien jatorria (Oliveira et al., 2016).

Zelula amak bi taldetan bana ditzakegu; i) Zelula ama enbrionarioak, zelula totipotenteak eta pluripotenteak barneratzen ditu eta ii) Zelula ama helduak (jaio eta ondorengoak), zelula pluripotente eta Multipotenteak daude talde honetan (2. irudia).

1.1 Zelula ama enbrionarioak (ESCs)

Gorputzeko edozein ehun heldura desberdintzeko gaitasuna mantentzen duten zelula ama pluripotenzial hauek blastozistoko ICM-an daude kokaturik. 1981-ean ESCs-ak isolatuak izan zirenetik, pluripotenzian eta auto-berritzean zerikusia duten mekanismo molekularrak ikasiak izan ziren beraien erabilgarritasun terapeutikoa dela eta (Evans and Kaufman, 1981). Mekanismo hauen artean, kromatinaren aldaketa epigenetikoak, seinale bideak eta transkripzio faktoreen efektuak izan dira pluripotenzialtasunaren arduradun bezala deskribatuak. Transkripzioa faktoreak papel garrantzitsua jokatzen du pluripotenzialtasunaren mantenuan *in vivo* eta *in vitro* (Dunn et al., 2014; Takashima et al., 2014), hauen artean Oct4 eta Nanog-ek ezinbestekoak dirudite erregulazioan (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006).

1.2 Zelula ama helduak

Aztertutako 3 zelula ama motak atera daitezke enbrioietatik, banako heldutik, ordea, bi baino ezin dira lortu. *In vivo*, ehun berezi batzuetan baino ezin dira aurkitu zelula pluri- eta multi-potenteak, laborategiko teknika bitartez eratu baitaitezke ere.

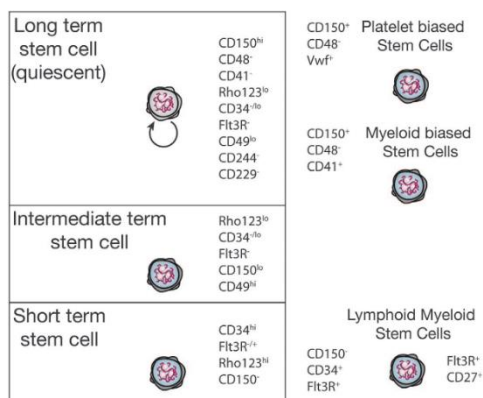
1.2.1 Zelula ama hematopoietikoak (HSCs)

Zelula ama hematopoietikoak (ingelesez, hematopoietic stem cells, HSC) odol zelula txuri eta gorrien aitzindariak dira. Sistema hematopoietiko osoa auto-berritze ahalmena eta gaitasun pluripotentea duten zelula hauetatik dator. Odol zelulen produkzioa organismoen bizitza osoan zehar ematen da hezur muinean (Ng and Alexander, 2017). Miloika odol zelula izan behar dira ordezkaturik egunero, eta milaka zelula ama baino ez daudenez bizi osoan zehar, argi geratzen da erregulazio aproposaren beharra produkzioaren homeostasia mantendu eta gaixotasun eta erasoei aurre egiteko. Ugaztunetan hezur muinaren barnean kokatzen dira HSCs-ak, hauek mikroingurune hematopoietikoarekin batera hematopoiesia kontrolatuko duen sare modulatzailerak osatuko dute (Hoggatt et al., 2016). Aintzinako zelula ama pluripotenteak (ingelesez, primitive pluripotent stem cells, PPSCs), oso txikiak diren zelula ama enbrionarioen antzekoak (ingelesez, very small embryonic-like stem cells, VSELs) CD45⁻ izenarekin ere ezagunak, hezur muineko zelula amen hierarkiaren gorenean daudela dio hipotesirik ezagunenak. Zelula hauetatik denbora luzearako CD45⁺ HSCs-ak, denbora motzerako HSC-ak, MSCs-ak eta zelula progenitore endotelialak eratorri daitezke (ingelesez, endothelial progenitor



cells, EPCs) (Ratajczak, 2008). Denbora luzerako HSCs helduak gune berezi batean daude kokaturik, hypoxia erlatiboko baldintzan endosteum-aren gertu, alegia (Morrison and Scadden, 2014; Nombela-Arrieta et al., 2013). Zelula hauek egoera kieszentean mantentzen dira kanpo seinale batek kitzikatzen dituen arte, adibidez; zitokina tronbopietinak, megakariozitoen presentziak edota interferoiaren bideak (Baldrige et al., 2010; Nakamura-Ishizu et al., 2015; Yoshihara et al., 2007). Gainera, HSC-en leinu espezifikotasuna hierarkia hematopoietikoko HSCs zelula progenitoretan oso goiz konprometitu daitekeela iradoki da. Horrela, auto-berritze ahalmena duen aintzindaria zuzenki HSCs-etatik lortu daiteke (Yamamoto et al., 2013). Egia ere bada, HSCs-tik zelula heldurako bidezidorraren teoriak aparte aintzindare zelula heldurako bidezidorraren idea ere existitzen dela. Hare gehiago, ikerketa berriek bizitza luzeko aitzindarien hautaketak odol populazio zelularra egoera egonkor batean mantentzen duela iradokitzen dute (Sun et al., 2014). Aitzindari mieloide primitiboenari aitzindari mieloide komuna deritze (ingelesez, common myeloid progenitor, CMP) eta aitzindari linfoideei (ingelesez, common lymphoid progenitor, CLP) (Iwasaki and Akashi, 2007). Hala ere, ikasketa berriek linfoide/mieloide bidezidor klasikoa baino lehen, konprometitu mielo-eritroide eta mielo-linfoidea ematen direla diote (Arinobu et al., 2005) (3. irudia).

Adult Murine Stem Cell Markers
Lineage⁻ cKit⁺Sca1⁺



3. irudia. Immunophenotypic markers of adult murine HSCs and ‘lineage-restricted’ HSC populations (Ng and Alexander, 2017).

1.2.2Oso zelula enbrionario txikia /epliblasto moduko zelula ama (VSELs)

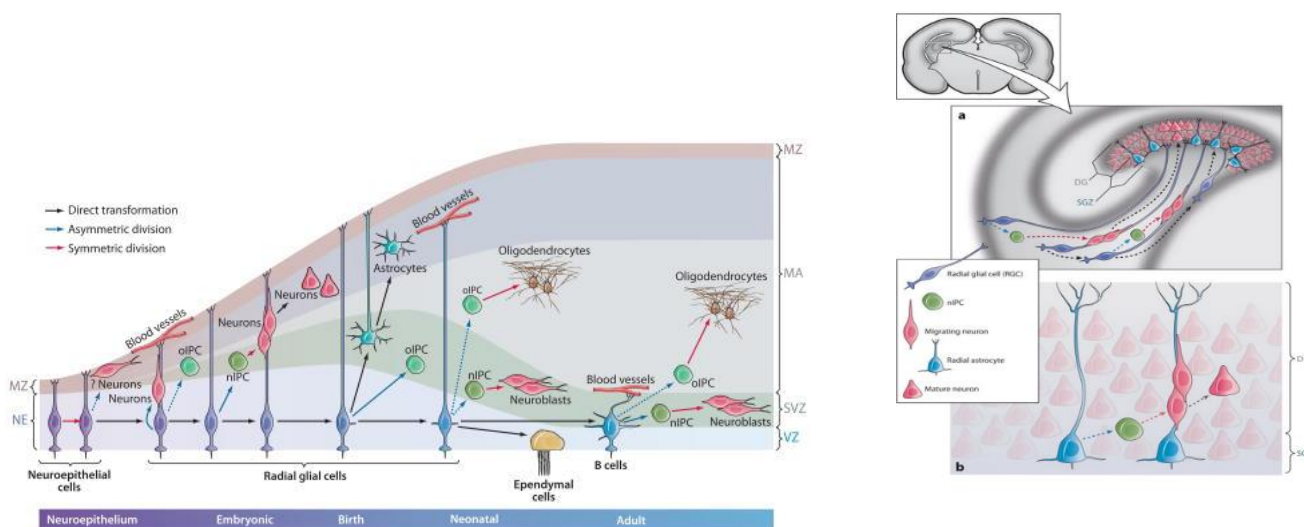
Konprometitutako zelula amen populazio multzoak berritzen dituen ehun helduetan bizirik irauten duten zelula amen segurtasunerako populazio desberdinu gabe hau 2006-an izan zen lehen aldiz deskribatua (Kucia et al., 2006). Odol periferikotik ibiltzeko ahalmena dute

estres baldintzatan eta Oct4, Nanog eta SSEA markatzaile pluripotenzialak adierazten dituzte, 3 hozi-geruzetara desberdintzeko gaitasunarekin batera (Ratajczak et al., 2012).

1.2.3 Zelula ama neuralak (NSCs)

Zelula ama neuralen (ingelesez, neural stem cells, NSCs) izaera multipotentek , nerbio sistema zentraletako (NSZ) zelula neuralek desberdintzeko aukera ematen die. Urte batzuk atzera uste zenaren kontra, NSCs-ak ez dira bakarrik garapen enbrionarioan aurkitzen, baizik eta hauek burmuin helduan ere badaude. Enbriogenezian zehar zelula neuroepitelialek hodi neurala osatu ostean, hauek NSZ-ko eratzeke zona bentrrikularrean hazten jarraitzen dute (Merkle and Alvarez-Buylla, 2006). Era berean, edozein zelula neural motatan desberdintzeko ahalmena duten zelula glial radialek eraldatzen dira NSCs-ak (Götz et al., 2015). Zelula glial radialak hasieran neuronak migratzeko aldamio bat bezala baino ez bazen ikusten ere, ikertzaile askok zelula ama bezala deskribatu zituzten, hauen hazkuntza tasa altua eta zelula neuronalak sortzeko gaitasuna kontuan hartuta (Hartfuss et al., 2001; Mo et al., 2007; Noctor et al., 2004). Banaketa asimetrikoaren bitartez zelula desberdinak eratzen diren heinean, zelula radial glial gehiago sortzen dira zelula ama populazioa mantentzeko garun garapenean zehar (Miyata et al., 2004). Beranduago, zelula hauek NSCs multipotentetan bihurtuko dira jaio osteko ugaztun burmuinean (Merkle and Alvarez-Buylla, 2006; Merkle et al., 2004). Era berean, ezaguna da neurogenesi areagotua duten ornodunek oraindik ere zelula radial glialak badituztela burmuin helduan (Adolf et al., 2006; Grandel et al., 2006). Ugaztunetan neurogenesia burmuin garapenera mugatua badago ere, gaur egun garun helduan bi gune neurogeniko daudela dago onartua. Zelula neuralen hazkuntza berria hipokanpoko horzdun giroko gune azpigranular (GAG) (Gage et al., 1998) eta gune azpibentrrikularrean (GAB) (Doetsch et al., 1999) ikusi da. GAB-ak bereziki sailkatutako NSCs-ak ditu bere baitan. Zelula glial radialak jaio ondoren desagertzen dira, B zelulak bakarrik mantentzen direlarik, eta era berean hauek Mash1 adierazpenaren bitartez identifikatuko diren C motako zeluletan bihurtuko dira. C zelulak neuroblasto, A zelula bezala ezagunak, eta oligodendrozoitoen aitzindari izango dira (Parras et al., 2004) (3. irudia). GAB gertatzen denaren kontra, burmuin helduko GAG-reko NSCs-ei astrozito radialak deritze, “ama” ezaugarri eta ezaugarri astrozitikoak partekatzen dituzte (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Hauek, zelula neural berrien aitzindari bezala (Garcia et al., 2004; Steiner et al., 2004) jokatzen dute horzdun giroan, aldi berean neurogenesi berria ikasketa eta memoriarekin dago erlazionatua (Zhao et al., 2008). Astrozito radialak, I. motako progenitore bezala ere ezagunak, zelula granularren geruza gurutzatzen duen luzakin bertikala dute, GAG horizontalki gurutzatzen duen elongazio txiki batekin batera (Fukuda et al., 2003). Beste astrozito batzuek ez bezala, astrozito radialek GFAP eta nestina adierazteko gai dira (Seri et al., 2004; Steiner et al., 2006). Gainera, astrozito glialak ez dira zuzenki neuronetan bihurtzeko gai, baina D motako zelula, II. motako aitzindari bezala ere ezagunak, luzakin gabetan bihurtzeko gai (Seri et al.,

2004). Bai D motako zelulak eta zein astrozito radialak Sox2 adierazteko gai badira ere, zelula neuronalak eta glialak sortzeko ahalmena zelula ez radialek baino ez dutela uste da (Suh et al., 2007). Banaketa ostein, D zelulek beste banaketa simetrikoko bat jasan dezakete D2 motako zeluletan bihurtu aurretik. Hauek luzakin luzea eta doblekortina, PSA-NCAM, NeuN, etab. Bezalako etapa menpeko markatzaile neuronalak adierazten dute (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009) (4. irudia). Oligodendrozito gutxi sortzen dira *in vivo* GAG-ean GAB-ean sortzen direnekin konparatuz, Mash 1 gainadierazpena ezinbesteko delarik NSCs en patu neuronalak oligodendrozitotara bideratzeko GAG-an (Jessberger et al., 2008).



4 irudia. Zelula ama neuralen jatorria eta antolakuntza. (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)

1.2.4Bihurtutako zelula ama pluripotenteak (iPSCs)

Zelulen ingeniarietza lehen aldiz erabili zenean genetikoki eraldatutako zelula amak lortzeko, zelula desberdinu baten nukleoa xagu baten obozito enukleatu batera transferitu zen zelula somatikoaren nukleoen transplantearen teknika (ingelesez, somatic cell nuclear transplantation technique (SCNT) (Wakayama et al., 1998). Urtebete lehenago, Wilmut et al-ek Dolly ardiaren klonazio arrakastatsua berry eman zuten zelula desberdinu baten nukleoa ernaldutako obozito enukleatu batera transferituz (Wilmut et al., 1997). Hala ere, giza zelulekin erlazio naturala arazo etikoak zeuden. Izan ere, metodo honen bitartez bakarkako baten klonazioa lor daiteke, oraindik gaur egun zabalki eztabaidatuaren gai polemikoa. Teknika honek dakartzan muga etikoak kontuan izanda birprogramatutako zelula somatikoak garatzea bilakatu zen xede. Beraz, helburua ESCs-en antzeko auto-berritze gaitasun eta ahalmen pluripotenziala zuten zelulak lortzea zen. Takahashi eta Yamanaka izan ziren iPSCs kontzeptua barneratu zutena, xagu fibroblastoak birprogramatzea lortu zutenean. Hau Yamanaka faktore izenez ezagututako Oct4, Sox2, Klf4 eta c-Myc-en transdukzioa erretrobiralaren bitartez lortu zuten



(Takahashi and Yamanaka, 2006). Talde berbera izan zen gizakien zelulak birprogramatzeko aukera izan zuena teknika berdina erabiliz urtebete beranduago (Takahashi et al., 2007). Birprogramazio prozedura fintzeko asmoarekin zenbait aldaketa egin ziren metodologian; besteak beste, Nanog eta Lin28 erabili zen Klf4 eta c-Myc-en ordean (Yu et al., 2007) eta giza fibroblastoen iPSCs-en eraginkortasuna handitzeko 6 faktoreen konbinazioa (Liao et al., 2008). Zenbait onura eta jakintza lortu ziren; c-Myc ezinbestekoa da pluripotenzialtasuna garatzeko (Wernig et al., 2008) eta faktore hauek proteina, RNA eta peptidoekin elkartzean infekzio biralekin erlazionaturiko arazoak ekiditen dira (Malik and Rao, 2013; O'Malley et al., 2009).

Eskuragarritasuna eta lortu daitekeen kantitatea kontuan izanda, birsortze probak egiteko MSCs-ak dira erabilienak zelula ama helduen artean *in vitro* eta *in vivo*.

1.2.5 Zelula ama mesenkimalak (MSCs)

Caplan-ek 1990-an zelula ama mesenkimal-aren modan jarri zuenetik, ikertzaile askok modu honetan “ama” ezaugarriak ziztuen zelulei buruz hitz egitea ekidin zuten (Caplan, 1991). Hala ere, 2000.en urtean egin zen Terapia Zelularrentzako Elkarte Internazionala-ren (TZEI) elkarretaratzean, terminologia hau onartua izan zen eta ondorioz baita MSCs akronimoa ere (Horwitz and Keating, 2000). TZEI-k aurkeztutako posizio adierazpenean MSCs-ak era egokian deskribatzeko eta gaizki ulertuak ekiditeko irizpideak bildu ziren (Horwitz et al., 2005). Adierazpen honi jarraituz birsortze lana duten ehun mesenkimatikoetara desberdintzeko ahalmena duten aitzindari ez hematopoietikoko aitzindari zelularrak dira MSCs-ak. Hauek hezurreen, kartilagoan, muskuluan, lotailuetan, tendoietan, gantz-ehunetan (Chamberlain et al., 2007), baskulatura ondoko gunetan (Crisan et al., 2008), eta plazentan, odol menstrualean, heste-hodian eta hortz egituretan ere aurki daitezke gorputz helduan (Du et al., 2016; Ma et al., 2014; Portmann-Lanz et al., 2006; Tirino et al., 2011) (5. irudia).

MSCs-en fenotipo immune ezagunena CD13, CD44, CD105, CD73 eta CD90-entzat positibo bezala izan da deskribatua, CD34, CD45 eta CD14 markatzaile hematopoietikoentzat negatiboa zen bitartean.

Ezaugarri hauek kontuan izanik TZEI-n barneko Zelula Ama Ehun eta Mesenkima Batzordeak (ZAEMB) MSCs-ak definitzeko gutxienekoak proposatu zituen (Dominici et al., 2006):

1. Plastiko-itsaskorrek izan behar dute MSCs-ak hazkuntza baldintza estadarretan.
2. MSC-ak leinu osteogeniko, adipogeniko, eta kondrogenikoetara desberdintzeko ahalmena izan behar dute.

3. MSCs-ek CD73, CD90, eta CD105 azalerako markatzaileak adierazi behar dituzte (1. taula).
4. MSCs-ek ez ditu leinu hematopoietikoen c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 α , eta giza leukozitoen antigenoa (HLA)-DR markatzaileak adierazi behar.

Garrantzitsua da MSCs-en ehun iturriaren arabera fenotipo immunea alda daitekeela azpimarratzea (1. taula).

MSCs-en ezaugarriak nabarmenenak auto-berritze ahalmena eta desberdintzapen pluripotenziala jasateko gaitasunak dira. Adipozito, fibroblasto, osteozito eta kondrozitoak bezalako leinu mesenkimaletako zeluletara desberdintzeaz gain, zeharkako desberdintzapena deritzon prozesua pairatu ostean, leinu ez-mesenkimaletara ere desberdindu daitezke zelula hauek. (Hass et al., 2011; Ullah et al., 2015).

Ahalmen pluripotenziala alde batera utzita, MSCs-ek mantentze homeostatikoa zein ehun zahartze, mintze eta hanturan dituzten eraginak interesgarriak izan daitezke aplikazio klinikoetara begira (Le Blanc et al., 2003; Sordi et al., 2005).

	BM-MSCs	AT-MSCs	UC-MSCs
Positiboa	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, STRO-1	CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I, STRO-1 CD11b,	CD29, CD44, CD90, CD73, CD105
Negatiboa	CD14, CD34, CD45	CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD133, CD144, HLA-DR	CD31, CD34, CD45, CD117, HLA-DR

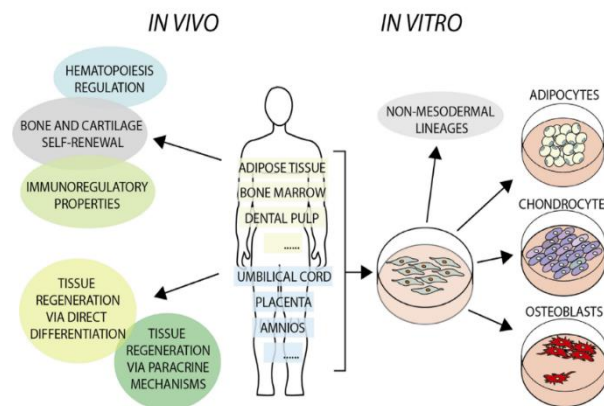
Table1. BM-MSCs, AT-MSCs eta UC-MSCs fenotipo immunea.

1.2.5.1 Hezur muineko zelula ama mesenkimalak (BM-MSCs)

Zelula ama hematopoietikoez gain, hezur muineko zelula ama mesenkimal (ingelesez hezur muineko zelula ama mesenkimalek, BM-MSCs) eta aitzindari endotelialak moduko zelula ama ez hematopoietikoak ere badaude hezu muinean (Anjos-Afonso and Bonnet, 2007). BM-MSCs-ek sepsia eta hantura erantzunaren inhibizioa eragiteko gaitasuna dute (McLean et al., 2011; Wang et al., 2015; Yang et al., 2013). Ezaguna da CD44, CD73, CD90, CD105 eta

CD166-entzako markaketa positiboa dutela, CD14, CD34, CD45-entzako, berriz, negatiboa duten bitartean (1 taula) (De Ugarte et al., 2003; Pittenger et al., 1999).

ESCs-ekin alderatuta MSCs-en desberdintzapen ahalmena mugatua badago ere, BM-MSCs-ek ustekabeko desberdintzeko ahalmena erakutsi dute *in vitro*. Izan ere, hiru hozi-geruzetako (ektodermoa, mesodermoa eta endodermoa) edozein zeluletara desberdintzeko ahalmena dute (Ullah et al., 2015; Zhang et al., 2018a).



5. irudia. Zelula ama mesenkimalen iturri desberdinak. (Guasti et al., 2018)

Etodermoa: BM-MSCs-en izaera mesenkimala bada ere, talde batzuek leinu ektodermalerantzko desberdintzapena lortu dute, hazkuntza faktore desberdinen koktel bat daraman ondo ezaguna den indukzio neurala lortzeko ingurune bat erabiliz. 2000. urtean DMEM/2% dimetilsulfoxidoa (DMSO)/200 μ M hidroxianisol butilatua (BHA)-an datzan hazkuntza ingurunea erabiliz arratoi eta giza BM-MSCs-ak zelula neuroaletara desberdinduak izan ziren (Woodbury et al., 2000). Zenbait taldek bide hau jarraitu zuten desberdintzapen protokolo eraginkorrago bat eskuratzeko. bFGF, FGF-8 eta BDNF nahasketa 7 egunez xagu eta arratoi BM-MSCs-etan etabiliz hauek zelula neuroaletarantz bideratu ziren (Jiang et al., 2002).. Gainera, zelula neuronal espezifikoko lortzeko protokolo bereziak ere diseinatu ziren. Horrela, BM-MSCs-ak LMX1a-rekin, zeinek *in vivo* eta *in vitro* desberdintzapen dopaminergikoan garrantzia handia duen, birprogramatu ostein zelula neuronal dopaminergikoak lortu zituzten (Barzilay et al., 2009; Wilkins et al., 2009). Bideratze dopaminergikoari so eginez, ikerketa berriek zelula pase kantitatearen garrantzia azpimarratu dute, zenbat eta pase gehiago orduan eta desberdintzapen dopaminergiko, leherketa frekuentzia baxuago eta buruxka baxuagoko zelulak lortzen dira (Shall et al., 2018). Desberdintzapen dopaminergikoaren kontra, neurona kolinerjikoak ere lortu ziren 1 mM b-merkaptotoetanol (BME) eta nerbio hazkuntza faktorea (ingelesez, nerve growth factor, NGF) (100 ng/mL) zeraman desberdintzapen protokoloa erabiliz (Naghdi et al., 2009).

Mesodermoa: BM-MSCs-ek jatorri mesenkimala izanda, ez da ezustekoa zelula mesodermikotako leinuetara desberdintzeko duten ahalmena. Lan desberdinek berretsi dute protokolo desberdinen bitartez adipozitoetara, osteozitoetara eta kondrozitoetara *in vitro* desberdintzeko gaitasuna. Lehenengo aldiz kondrozitoetara lortu zen desberdintzapena BM-MSCs-tan izan zen (Mackay et al., 1998). Lehenengo desberdintzapen hau eta gero, desberdintzapen ahalmena beste taldek olio tanten eraketa, mineralizazioa eta II.motako kolagenoaren sekrezioa neurtuz berretsi zuten (Gronthos et al., 1994; Muruganandan et al., 2009; Ranera et al., 2013; Wagner et al., 2005; Zhang et al., 2011). *In vitro* desberdintzapena eta gene birkonbinazio teknika berriak nahastuz, birsortze terapietan erabiltzeko BM-MSCs sendagarriagoak lortu ziren. Kasu honetan, BMP-7-ren gain adierazpena eragin zen sendaketa jarduera handiagoa erakusten zuten BM-MSCs-eak lortzeko eraldatu gabeko BM-MSCs-kin alderatuz (Yan et al., 2018). Hiru zelula mota hauetatik at, kardiomyozitoak ere lortu ziren BM-MSCs-etatik. 5-azazitidina erabiliz arratoi BM-MSCs-tatik miotubo nukleo-anitzak lortu eta 9 urte beranduago (Wakitani et al., 1995), protokolo Berbera erabili zen β -miozina kate, α -aktina kardiakoa, desmina eta kaltzio-potasio menpeko kaltzio kanalak adierazten zituzten giza BM-MSCs desberdinak lortzeko (Xu et al., 2004). Desberdintzapen endoteliala ere lortu zen lncRNA MEG3 azpi adierazpena zein kaltzio potasio zeramika bifasikoa erabiliaz (Chen et al., 2018; Sun et al., 2018; Urbich and Dimmeler, 2004).

Endodermoa: Hepatozitoak bakarrik endodermoko zelula aitzindarietatik datozela uste bazen ere, MSCs-ek espero gabeko gaitasun hepatogenikoa zutela erakutsi zuten. BM-MSCs-ak aste betez bFGF, EGF eta nikotinamida-rekin ornitutako oinarritzko ingurunean hazi, eta ondoren onkostatina M, dexametasona eta ITS+ (intulina, transferrina, selenioa)-ren presentzian heltze prozesua pairatzean datzan 2 pausuko protokoloarekin tratatzean zelula hepatikotan bihurtu daitezke. Protokoloa eta gero albumina gibel espezifikoko transkripzio markatzailea, α -fetoproteina eta faktore nuklear 4 α (HNF-4 α) adierazten zituzten, gainera, albumina produkzioa, glikogeno metaketa, urea sekrezioa, dentsitate txikiko lipoproteina jasotzea eta fenobarbital bitartez induzitutako zitokromo P450 sortzea bezalako gibeletako zelulen funtzio bereziak egiteko gai ziren (Lee et al., 2004; Stock et al., 2014). Animalia espezie desberdinetan ere aurkeztu da desberdintzapen hepatozitikoak, xagutik hasi eta tibeteko ardi-txakurra arte (Xu et al., 2017b; Zhang et al., 2018a). *In vivo* txertaketa erraztearekin batera *in vitro* hazkuntza zelularra, desberdintzapen hepatikoa eta funtzio hepatiko espezifikoen hobetzea lortzeko substratu estaltzaileen erabilera bihurtua da xedea azken urtetan. Zelulaz kanpoko matrizea (ZKM)-rekin eta matrigelarekin plaken estaltzeak BM-MSCs-en desberdintzapen eta biziraupenean abantailak ekarri ditzake (Wang et al., 2018).

Hepatozitoekin gertatu bezala, ez zen espero pankreozitoak lortzea BM-MSCs-etatik. Hala ere, zenbait lan txukunek BM-MSCs-ak intulina sortzeko gai diren β -zeluletan bihurtzeko

aukera dutela frogatu dute *in vitro* eta *in vivo*. *In vitro* desberdintzapena ez da bakarrik aldaketa morfologiko hutsean geratzen, baizik eta estreptozotozinak eragindako baldintza hiperglizemikoa konpontzeko ahalmena dute zelula hauek (Gabr et al., 2013, 2014; Tang et al., 2012). *In vivo* leinu zelular pankreatiko endokrinoetara desberdintzeko ahalmena ere frogatua izan da faktore parakrino, eta zelulaz kanpoko besikulen mimetikoaren presentzian, besteak beste (Bhonde et al., 2014; Oh et al., 2015; Phadnis et al., 2011).

1.2.5.2 Gantz ehuneko zelula ama mesenkimalak (AT-MSCs)

Gantz ehuna zelula desberdinez eratutako energia metaketarako erabilia den ehuna da. Ehun adipotsuan adipozitoak, zelula endotelialak, zelula hematopoiéticoak, fibroblastoak eta zelula ama mesenkimalak aurki daitezke (ingelesez, adipose tissue mesenchymal stem cells, AT-MSCs), guztiak baskulatura nahasi batez irrigaturik (Eto et al., 2009). AT-MSCs-ak BM-MSCs-kiko oso antzekoak badira ere, desberdintasun asko daude zelulen isolamendu eta etekinean (Markarian et al., 2014). Gainera, ezaguna da transkriptoma desberdina dela MSCs-en iturriaren arabera. Horrela, hazkuntzarekin zerikusia duten geneak gain adieraziak dira AT-MSCs-tan BM-MSCs-ekin alderatuz, honek bat egiten du AT-MSCs-ek erakutsitako 20 aldiz hazkuntza tasa handiagoarekin (Wagner et al., 2005). AT-MSCs-ak paziente beretik izan daitezke isolatuak emailearen erikortasun txikiarekin, terapia zelular autologoetan erabiliak izan daitezke larrik. Zelula hauek gune inginal eta abdominaleko azal azpiko ehun adipotsuan aurki daitezke (Hu et al., 2014; Maharlooei et al., 2011; Zografou et al., 2013). (Gadelkarim et al., 2018; Schäffler and Büchler, 2007; Ullah et al., 2015). AT-MSCs izateko desberdintzapen gaitasun eta fenotipo immune berezi batzuk betetzea beharrezkoak dira. Fibroblasto moduko nukleo luzeko zelula bezala deskribatutako zelula hauek hurrengoko fenotipo immunea dute; positiboak CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73 (SH3), CD90, CD105 (SH2), CD106, CD146, CD166, HLA I, STRO-1-rako eta negatiboak CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79a, CD133, CD144, HLA-DR- rako (1. taula) (Chen et al., 2013; Schäffler and Büchler, 2007; Zuk et al., 2002).

BM-MSCs-ekin gertatzen den bezala, AT-MSCs-ak ere hiru hori-geruzako zeluletara desberdintzeko gaitasuna daukate (Gadelkarim et al., 2018; Schäffler and Büchler, 2007; Ullah et al., 2015) (1. taula).

Ectodermoa: Safford et al. izan ziren AT-MSCs-en desberdintzapen neurala argitaratzen lehenak, zeintzuk desberdintzapen neurala NeuN eta Nestina-ren adierazpenarekin berretsi zuten (Safford et al., 2002). Urte batzuk beranduago, hainbat taldek jarraitu zuten AT-MSCs-en desberdintzapen neuralean lanean. Horretarako ingurune induzitzaile desberdinak erabili ziren, besteak beste; neurobasala (Dave et al., 2018), FGF2, EGF, BMP-9, azido erretinoiko eta heparinaz ornituriko oinarriko medioa, neurona kolinergiko eta dopaminergikoak lortzeko



(Marei et al., 2018), usaimen zelula ingurutzaila (ingelesez, olfactory ensheathing cells, OECs) edo Schwann-en zelulen (ingelesez, Schwann cells, SCs) medio baldintzatua (Lo Furno et al., 2018), eta talde batek NSCs-ak lortu zituen neurobasalari EGF eta bFGF gehituz (Petersen et al., 2018). Grafeno oxidoan, neurobideratzerako material ezagunenean, oinarritutako eta kaltzioan, migrazio, hazkuntza eta funtzio neuronaletako bitartekari garrantzitsuenetarikoan, oinarritutako probek, hauek AT-MSCs-ak leinu neuraletara desberdintzean duten garrantzia frogatu dute (Feng et al., 2018; Goudarzi et al., 2018).

Mesodermoa: Osteozito (Lian et al., 2004; Zhao et al., 2018), kondrozito (Otto and Rao, 2004), adipozito (Rosen, 2002) eta miozito (Brand-Saberi, 2005) leinu mesodermikotako zeluletara desberdintzapena eragiten duten erantzule transkripzional eta molekularrak dagoeneko ondo ikasiak eta ezagunak dira. AT-MSCs-etatik eratorritako adipozitoek adipozito nabar eta zurien ezaugarri helduak gara ditzakete, besteak; beste ahalmen lipotilikoa katekolaminaren estimulazio bitartez, α_2 -adreno-hartzaile bitarteko aktibitate anti-lipotilikoa eta adiponektina eta leptina, ohiko adipokinen jariaketa (Dicker et al., 2005; Kilroy et al., 2018; Rashnonejad et al., 2018). Preadipozitoen erabilera adipozito helduen erabilera baino onuragarriagoa izan liteke ehun bigunen tratamendutan, tamaina txikiagoari esker hauek erakutsitako baskularizazio azkarra, *in vivo* desberdintzapen eraginkorra eta oxigeno gutxiaren erabilera kontuan hartuta (Heimburg et al., 2005). Aitzindari osteogenikoen iturri berriak beharrezkoak dira hezur ehunaren ingeniariatzak eskatzen duen osteozito kopurua kontuan izanda. Deskribatua dago BM-MSCs ek eta AT-MSCs-ek duten desberdintzapen osteogeniko antzerakoa dela, emailaren adina igota ere (Shi et al., 2005). Hala ere, argitaratua dago baita AT-MSCs-ek MSCs-ek dutena baino osteogenesi ahalmen txikiagoa dutela eta baita arrakasta txikiagoa hazkunde atxiloketa partzialeko tratamendutan karraskari eredutan (Hui et al., 2005; Im et al., 2005). Xagu eta giza AT-MSCs-ek ohiko desberdintze osteogenikoaren ikurrak lor ditzakete, adibidez; zelulaz kanpoko matrize mineralizatua produzitzea, osteokalzina eta fosfatasa alkalina proteinak adieraztea, zizail estresari erantzuteko gaitasuna, eta mekanikoki kargaturiko gene mekanosentikorren (osteopontina, kolagen I α 1 mota eta COX-2) adierazpena (Ardeshirylajimi et al., 2014; Jia et al., 2018; Knippenberg et al., 2005). Seinalizazio bidezidor asko identifikatu dira osteo-desberdintzapenaren arautzaile bezala; TGFB/BMP, Wnt/B-Katenina, Notch, fibroblastoen hazkuntza faktorea eta Hedgehog. BMP oso garrantzitsua da osteogenesian, bereziki BMP2 eta 7-a. AT-MSCs-a BMP2 eta BMP7 errekonbinanteekin tratatzean desberdintzapen osteogeniko eta adipogenikoa kitzikatzen dira, hurrenez hurren (Dragoo et al., 2003; Knippenberg et al., 2006). Horrela, BMP2 gainadierazitako AT-MSCs-ak eraginkorrak suertatu ziren huts femoralak sendatzeko (Peterson et al., 2005). BMP-k desberdintzapen BMPR I eta II hartzaileak kitzikatuz edo hezur garapeneko kontrolatzaile nagusiak, Runx-2 eta OSC, aktibatuz eragin dezake desberdintzapena (Heldin et al., 1997; Lian et al., 2006). Tbx3 (Lee et

al., 2007b) eta FOXO1 (Zhao et al., 2018)-ek ere garrantzitsuak dira AT-MSCs-en desberdintzapen osteogenikorako. Desberdintzapen faktore espezifikoez haratago, zelulaz kanpoko matrize ordezkioak eta hiru dimentsiotako aldamiok ere ezinbestekoak izan daitezke desberdintzapen apropos bat lortzeko. Adibidez, kitosan partikula-aglomerazio aldamiok, fibrin aldamiok, α -trikaltzio fosfato aldamiok zein tragakant goma hidrogelak aldamiogokiak izan daitezke (B Malafaya et al., 2005; Haeri et al., 2016; Hattori et al., 2006).

Desberdintzapen kondrogenikoa lortzeko ere hainbat protokolo daude; faktorerik gehitu ez zitzaien, protokolo errazenetik hasita (Wagner et al., 2005), DMEM-a ITS+, azido linoleikoa, azido selenioso, pirubatoa, askorbato 2-fosfatoa, dexametasona eta hazkuntza faktore β III eraldatzailea (ingelesez, transforming growth factor- β III (TGF- β III))-rekin konbinatzen dituen ohiko protokolora arte. Aski ezaguna da, desberdintzapen kondrogenikoko indukzio aurreko etapan MSCs-ek I eta II. motako kolagenoak adierazten dituztela. Gene eta itsaspen molekula kondrogenikoen adierazpena TGF- β familiako (TGF- β 1, TGF- β 2 eta TGF- β 3) faktore disolbagarrien menpe daude. Kondrozitoen heltzea hauek Sox9, L-Sox5 eta Sox6 transkripzio faktoreak adierazten dituztenean lortzen da (Chimal-Monroy and Díaz de León, 1999; Ikeda et al., 2004). TGF- β 1-az gain, zeinek gizakietan Wnt/ β -kateninarekin interakzionatzen duen kondrogenesia eragiteko osteogenesiari aurka eginez (Zhou, 2011), beste hazkuntza faktore batzuk, besteak beste; intsulina moduko hazkuntza I faktorea (ingelesez, insulin like growth factor-I, IGF-I) eta BMP-2-k desberdintzapen kondrogenikoa eragiten dutela ezaguna da (An et al., 2010; Wei et al., 2006). Ehun ingeniartzan erabilitako POSS-PCU eta POSS-PCL bioaldamio zito-bateragarriek eraginkortasuna dute ere desberdintzapen kondrogenikoan (Griffin et al., 2017; New et al., 2017).

Ikerketa askok frogatu dute AT-MSCs-tatik eratorritako kardiomiotoen lorpena. Batzuk pauso markagailu jarduera eta markatzaile kardiako bereziak adierazten zituzten zelulak aurkitu zituzten (Planat-Bénard et al., 2004), beste batzuek angiogenesisia sustatzeari, kardiomiotoetara desberdintzapenari eta lesio miokardiakoaren sendaketari buruz hitz egin zuten xagu eredutan (Miyahara et al., 2006; Strem et al., 2005). Gizakietan ere lortu zituzten jarduera uzkurkorra zuten kardiomiotoak (Choi et al., 2010) eta azido askorbikoak MER/ERK bidezidorrean eraginez kardiomiotoen desberdintzapenean zuen eragina ere frogatu zuten (Liu et al., 2018b).

Ustekabean, BM-MSCs-ekin gertatzen den moduan, AT-MSCs-ak, ahalmen proangiogenikoa, iskemia osteko neobaskularizazioa eta hodi itsurako egiturak eratze gaitasunarekin batera zelula endotelialekin erlazionatutako elementuak (VEGF, hepatozitoen hazkuntza faktorea (HHF), plazentako hazkuntza faktorea, FGF-2, TGF- β , eta angiopoietina-1)

jariatzeko gaitasuna duten zelula endotelialetera desberdindu daitezke (Bekhte et al., 2014; Cao et al., 2005; Rehman et al., 2004).

Endodermoa: Fenotipo pankreatiko endokrinotara desberdintutako lehenengo giza AT-MSCs-ak activin-A, exendin-4, HHF, eta pentagastrin desberdintze faktoreak erabiliz lortu ziren. Lortutako zelulek intsulina, glukagoia eta somatostatina hormona pankreatiko endokrinoak Pax-6, Ipf-1, eta Ngn-3 garapen pankreatikoko transkripzio faktoreekin batera adierazteko gai ziren (Timper et al., 2006). Ikerketa berriek AT-MSCs-ek BM-MSCs-ekin alderatuta duten desberdintzapen gaitasunari buruz asko argitu bazuten ere, ez dago garbi zein zen AT-MSCs-ek jasandako prozesuak (Gabr et al., 2014). Desberdintzapen endokrino pankreatikoaren mekanismoa ulertzeko helburuarekin zenbait taldek AT-MSCs-ak genetikoki eraldatu zituzten. Horrela, arratoi AT-MSCs-tatik eratorritako zelula intsulina produzitzaileetan Pdx1 eta Shh-en gain adierazpenaren efektu batuak, insulinararen produkzioa eta MafA, Nkx2.2, Nkx6.1, Ngn3, intsulina eta Isl1 markatzaileen adierazpena ekar dezake. Aldi berean, zelula hauek arratoi diabetikotako odol glukosa balioak orekatu zitzaketela (Hashemi Tabar et al., 2018). Beste ikerketa batek Wnt bidezidorraren garrantzia azpimarratu zuen desberdintzapenean zehar (Wang et al., 2017b). Seguraski 3D aldamioren erabilera etorkizuna izango da diabetes mellitus I.motako terapia zelular autologoetan. PVA 3D aldamia eta plaketetan aberatsa den plasma (ingelesez, platelet-rich plasma, PRP) bateratuz, AT-MSCs-etatik intsulina produzitzaileak lortzeko desberdintzapen protokoloak hobetuak izan dira (Enderami et al., 2018).

HHF, onkostatina M (OSM), eta dimetil sulfoxidoarekin hazitako AT-MSCs-ak albumina eta α -fetoprotein adierazten zituzten hepatozito moduko urea produzitzaileetan bihurtu ziren (Seo et al., 2005). Karraskari ereduak AT-MSCs-en desberdintzapen hepatozitikoa bideragarria zein frogatu zuten, hepatozito periportal eta perizentral funtzionalak lortuz. Gainera, hauek gibel funtzionamendua berreskuratzeko ahalmena erakutsi zuten karboi tetraklorido (CCl_4) bidezko gibel hutsegite ereduak (Winkler et al., 2015; Xu et al., 2015a). Giza AT-MSCs-ek ere hepatozito moduko zelula funtzional eta ehun bateragarriko eratzeko ahalmena erakutsi dute protokolo desberdinak erabiliz (Aurich et al., 2009; Lee et al., 2012; Wang et al., 2014).

1.2.5.3 Zilbor- hesteko zelula ama mesenkimalak (UC-MSCs)

Giza zilbor-hestearen garapena enbriogenesiaren 5. astean hasten da (Ellis, 1989). Ohiko ehun helduetatik at (gantz-ehuna, hezur muina), MSCs-ak jaiotzari lotuak diren ehunetatik ere lor daitezke placentan, amnionan eta zilbor-hestean barne (5. irudia). Zilbor-hesteko zelula ama mesenkimalak (ingelesez, umbilical cord stem cells, UC-MSCs) oso eskuragarri eta

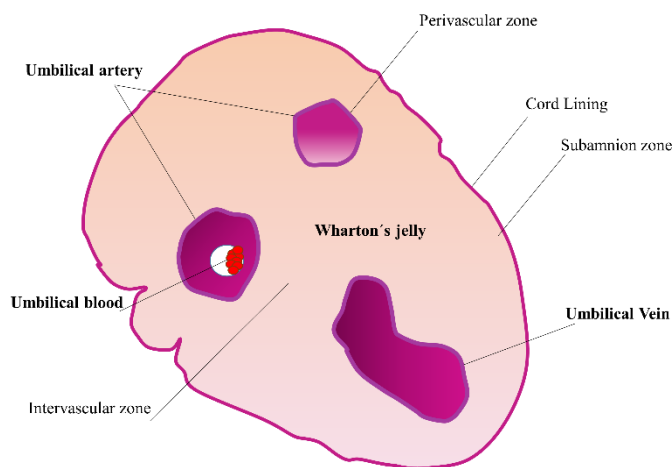
etikoki onartuak diren zelula iturri berriak dira. Zelula hauek inbazio gabeko esku-hartzeko bitartez lortu daitezke jaió eta gero, gainera zelula hauek ehun helduetan kokatutako gainontzeko MSCs-ak baino primitiboak direa, zelula ama heldu eta zelula ama enbrionarioen bitarteko ezaugarriak adierazten dituztelarik, alegia (El Omar et al., 2014). UC-MSCs-ekin egindako azken ikerketak kontuan izanda, hauen fenotipo inmunea for CD29, CD10, CD13, CD58, CD59, CD61, CD44, CD90, CD73, CD106, CD166, CD325, CD56, CD51 eta CD49(b-e)-rentzat positibo eta CD31, CD3, CD11b, CD14, CD19, CD31, CD33, CD34, CD38, CD40, CD49a, CD34, CD45, CD117, CD133, CD86, CD80, CD71, CD56, CD53, CD50 eta HLA-DR- rentzat negatibo bezala izan da deskribatua. Emaidza batzuk kontraesankorrak izan dira argitalpenaren arabera; CD54, CD105, CD106, CD117, CD144 eta CD146. CD105-aren kontraesakortasuna bereziki ustekabea da, zelula ama mesenkimalak identifikatzeko honek duen garrantzia dela eta. Hala ere, CD105 adierazpena positiboa da ikusitako lan gehienetan, lan batzuk baino ez dute honen adierazpena ukatu edota paseak aurrera doazela honen adierazpena jeisten doala adierazi (1. taula) (Batsali et al., 2013; Can and Karahuseyinoglu, 2007; El Omar et al., 2014; Seo et al., 2009). Lehenengoz UC-MSCs-ak 1656-an deskribatu ondoren burututako ikerketek, zelula hauen kantitate handia, hazkuntza tasa altua eta terapia zelularretan erabiltzeko segurtasuna frogatu dute (Fong et al., 2011; Friedman et al., 2007). Animalia eredutan UC-MSCs-ekin egindako frogetatik hainbat ondorio atera dira. Bihotz, azal, muskulu-eskeletoko, oftamologiko, birika, endokrino, gibel, hematologiko eta gaixotasun neurologikotan erabilitako UC-MSCs-ek ezaugarri anti-apoptotiko, immuno-erregulatzaile, anti-fibrotiko eta angiogenikoak erakutsi zituzten zelula amekin erlazonatutako onurekin batera. Are gehiago, ez zuten infusioarekin erlazonaturiko toxikotasunik erakutsi, terapia zelularretarako iturri ezin hobea bihurtzen direlarik UC-MSCs-ak Hala ere, lan guztiek nomenklatura fintzeko beharra eskatzen dute zilbor-hestean dauden zelula mota guztiak behar bezala ezagutzeko (Arutyunyan et al., 2016; Can et al., 2017).

Horregatik garrantzia osokoa da UC-MSCs-ak zilbor-hesteko gune desberdinetatik isolatu daitezkeela nabarmentzea. Hauek Wharton-en gelatinatik, kordoi estalduratik eta zilbor-hesteko odolatik lortu daitezke. Kordoi estaldurak eta zilbor-hesteko odolak zelula mota bakarra baino gehiago dituzte, bakar batzuk baino ez dira MSCs-ak (Maria et al., 2010).

1.2.5.3.1 Wharton-en gelatina

1991-an zilbor hesteko fibroblasto antzerako zelulak aurkitu ziren arte, ehun hau hondakin mediko bezala zegoen ikusia (McElreavey et al., 1991). Urte batzuk beranduago, hauen fenotipo inmunea eta desberdintzapen ahalmena kontuan izanda MSCs kategoria egotzi zieten (Wang et al., 2004). Bi arteria eta zain batek, guzti hauek Wharton-en gelatina izeneko ehun konektibo mukitsu batez inguratutik, osatzen dute zilbor-hestea (6. Irudia). Ehun

konektibo gelatinotsuak odol hodiak babesten ditu beharrezkoa duten malgutasuna emanez, era berean hau kordoi estaldura bezala ezagutzen den amniotik eratorritako epitelio batez dago inguraturik. Wharton-en gelatina glikosaminoglikanoz dago osaturik, bereziki azido hialuronikoz eta kondroitin sulfatoz. Zuntz malguen absentsian kolageno zuntzak dira osagai nagusiak, konposaketa zelularrari dagokionez, fibroblasto, miofibroblasto, muskulu leuneko zelula eta zelula ama mesenkimalez dago eratua (Arutyunyan et al., 2016). MSCs-ak gene peribaskular, interbaskular eta amnion azpiko gunetatik izan daitezke isolatuak Whartonen gelatinan (Maria et al., 2010).



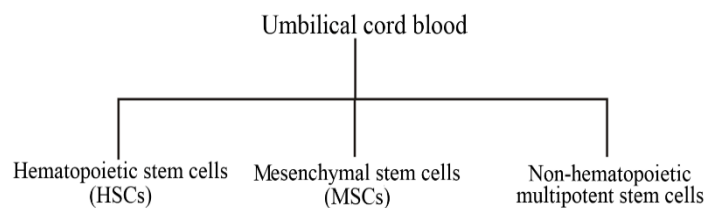
6. irudia UC-MSCs-ak (Ding et al., 2015)-etik eraldatutako irudia.

1.2.5.3.2 Kordoi estaldura

Hemen bi zelula mota aurkitu daitezke, kordoi estaldurako zelula mesenkimalek (ingelesez, cord lining mesenchymal cells, CLMCs) eta kordoi estaldurako zelula epitelialak (ingelesez, cord lining epithelial cells, CLECs). CLMCs-eak Wharton-en gelatinazko gune azpi amniotikotik lortuak dira eta erredura eta lesio diabetikoak sendatzeko erabili daitezke. CLECs-ak era berean, ikus arazoak, azaleko proba kosmetikoak, insulina menpeko diabetesa, giltzurrun akatsak, zauri osaketa eta korneako arazo epitelialak tratatzeko erabili daitezke (Lim and Phan, 2014; Saleh and Reza, 2017).

1.2.5.3.3 Zilbor hesteko odol zelula amak (UCB-SCs)

Zilbor hesteko odol zelula amak (ingelesez, umbilical cord blood stem cells, UCB-SCs) isolatu ziren lehen zelula ama fetalak dira. 1974 UCB-SCs-ak ama zelula hematopoietiko eta aitzindarien iturria zirela aitortu zen (Ali and Al-Mulla, 2012; Knudtzon, 1974). Gaur egun, zilbor hesteko odol terminoak barneratzen dituen zelula ama populazio desberdinak definituak izan dira. 7. Irudiko diagraman ikusi daitekeenez, 3 zelula ama mota daude UCB-SCs en artean.



7. irudia. UCB-SCs motak (Ali and Al-Mulla, 2012).

Zelula ama hematopoietikoak: Lehenago aipatu den bezala (HSCs, 1.2.1 atala) odol zelula guztiak zelula ama multipotente hauetatik eratorriak dira. Zilbor-hesteko odolean dauden HSCs-ak konpromiso maila desberdinetan aurkitzen dira. Beste MSCs-ekin alderatuz, hauen ezaugarri nagusia azaleko markatzaile hematopoietikoen adierazpena da; CD133, CD34 eta CD45 (McGuckin et al., 2003).

Ama zelula mesenkimalak: Hauek dira zilbor-hesteko odol zelulen parte mesenkimatikoa, zilbor-hesteko odoleko zelula ama mesenkimalak, alegia (ingelesez, umbilical cord mesenchymal stem cells, UC-MSCs). Beste MSCs-en antzera, hauek leinu mesodermaleko zein ez mesodermaleko zeluletara desberdindu daitezke (da Silva Meirelles et al., 2006). Hazkuntza proportzio handia erakusten dute zelula hauek (Bieback et al., 2004).

Zelula ama multipotente ez hematopoietikoak: Hauen agerpena oso txikia da eta CD45 markatzaile hematopoietikorako adierazpen negatiboa dute (McGuckin et al., 2005; Zhao et al., 2006). Pluripotenzialtasun enbrionikoarekin erlasionaturiko OCT4, SOX2 eta NANOG markatzaileak dituzte, SSEA-3 eta SSEA-4, azaleko enbrioi estatu-espezifikoko antígeno espezifikoekin batera (Inamdar et al., 2009). Zelula hauek hiru hozi-geruzatako zeluletara desberdintzeko gaitasuna erakutsi dute; ektodermoko leinu neuraletara (Zangiacomi et al., 2008), endodermoko leinu hepatoiko eta pankreatikotara (Denner et al., 2007; McGuckin et al., 2005) eta mesodermoko leinu endotelialetara (Ma et al., 2006). Desberdintzapen ahalmenak eta

irisgarritasunak, UC-MSCs-ak ikerketarako eta baita terapia zelularretan erabiltzeko iturri aproposa bihurtzen dituzte (Ali and Al-Mulla, 2012).

Ektodermoa: UC-MSCs-ak neurona, astrozito eta beste zelula glialetan desberdintzeaz gain fakotro neurotrofiko eta β -integrina areagotuz garun istripu bat erreskatatu dezakela frogatu da arratoi ereduan (Ding et al., 2007; Liu et al., 2010). Desberdintzapen protokoloak zelula neuronal bereziak lortzeko izan dira hobetuak, %65-eko desberdintzapen eraginkortasunez; tirosina hidroxilasa (TH), dopamina, AMP ziklikoak erregulatutako fosfoproteina (DARPP) 32, pare-moduko homeodomeinu 3 transkripzio faktorea (PitX) eta garraiatzaile amino bakar besikular 2-a (VMAT) bezalako markatzaile dopaminergiko espezifikokoak adieraziz (Datta et al., 2011; Fong et al., 2011; Mitchell et al., 2003). Oligodendrozitoak eta astrozitoak ere izan dira lortuak (Leite et al., 2014; Mitchell et al., 2003).

Lan gutxi batzuk daude non UCB-MSCs-tatik leinu neuraleko zelulak lortzen diren. BDNF eta TERT-en konbinazioak UCM-MSCs-en hazkuntza, bideragarritasuna eta desberdintzapen neurala hobetu zuten (Zhao et al., 2014). Beste kasu batean, kariotrofina 1-ak (KT1) UCB-MSCs-en desberdintzapena eta PI3/AKT seinalizazio bitarteko biziraupena kitzikatu zuen (Peng et al., 2017).

Mesodermoa: UC-MSCs-tatik eratorritako adipozitoak lipido bakuolo txikiak baino ezin dituztela sortu ikusi bada ere, hauek BM-MSCs-ek baino luzeagoz mantentzen dute multipotentzia ahalmena (Fong et al., 2012; Mennan et al., 2013). Ikerketa batzuek desberdintzapen adipogenikoan parte hartzen duten mekanismoak ikasten saiatu dira. BMP-9 desberdintzapen adipogeniko, kondrogeniko eta osteogenikoko giltza ei da (Shu et al., 2018). Beste MSCs ikusi den bezala, UC-MSCs-ak ere aldazio desberdinetara erein daitezke, hala ere, substratuaren zurruntasunak desberdintzapenean izan zezakeen garrantzia ez zen inoiz kontutan hartu. Materialaren gogortasunaren arabera leinu desberdinetara bidera daitezke zelulak. UC-MSCs-ak adipozitoetara desberdintzen dira matrize bigunetan eta osteoblastoetara gogorretan (Xu et al., 2017a).

UC-MSCs-en desberdintzapen osteogenikoa ez da beste MSCs-ek dutenaren bezain handia (Ishige et al., 2009), hala ere, zilbor-hesteko zein gunetako zelula izatearen arabera ahalmen osteogenikoak alda daiteke. Wharton-en gelatinako MSCs-ek beste UC-MSCs-ek baino desberdintzapen osteogeniko eraginkorragoa azaltzen dute (Mennan et al., 2013).

Zilbor-hesteko zein tokitatik isolatuak izan ziren axola gabe, zelula guztiek ahalmen kondrogeniko antzerakoa erakutsi zuten, BM-MSCs-ek erakutsitakoa 3 aldiz handitzen (Mennan et al., 2013).

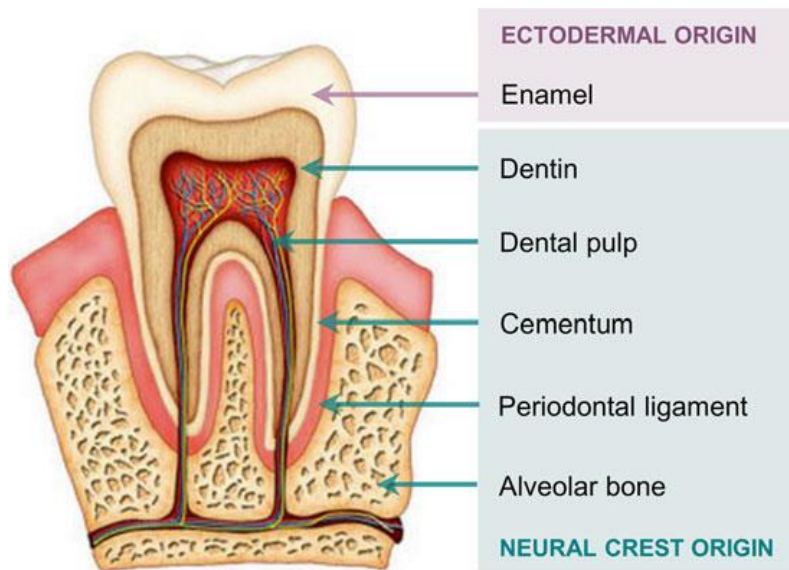
Endodermoa: Giza UC-MSCs-ak markatzaile hepatikoak adierazteko ahalmena dute eta *in vivo* eta *in vitro* desberdintzeko. UC-MSCs-ak kimikoki lesionatutako arratoi eredu batean transplantatzean hauek hepatozitotan desberdinu ziren eta eraginkortasunez integratu ziren gibel erian (Campard et al., 2008; Lin et al., 2010).

Intsulina zelula produzitzaileei dagokienez, eraginkortasunez *in vitro* desberdindutako UC-MSCs-ak balio glizemiko normalak berreskuratu ditzakete porta zaineko injekzioa eta gero xagu eta arratoietan (Tsai et al., 2012; Wang et al., 2011).

1.2.5.4 Hartz mamiko zelula amak (DPSCs)

Beste ehunetan gertatzen den bezala, ahoa zuloan ere MSCs-ak daude gorputz helduan (Huang et al., 2009). 2000. urtean Gronthos et al.-ek BM-MSCs-en oso antzerakoak ziren hartz mamiko ehunetik eratorritako zelula ama populazio baten existentzia frogatu zuen (Gronthos et al., 2000). Hauek erakutsitako auto-berritze eta leinu neural eta mesenkimalak desberdintzeko gaitasuna zela eta, hartz mamiko zelula ama deitu zitzaion (ingelesez, dental pulp stem cells, DPSCs) (Gronthos et al., 2002). Hartz zuloan dagoen hartz mamia inguratzen duen dentina geruza (odontoblastoek eratua) estaltzen duen kanpoko esmalte batez (ameloblastoek eratua) dago osatua hartz (Shi and Gronthos, 2003). Hartz mamia nerbioz, odol hodiz, ehun mesenkimalez, zelula immunez eta zelula mesenkimalez (zelula ama mesenkimalak, fibroblastoak) osaturik dagoen ehun konektibo laxoa da. Honek garrantzi handia du hartzaren lehenen eta bigarren mailako garapenean eta lesio eta txantxarra bezalako erasoen aurreko babesean. DPSCs-ek hazkuntza tasa handia erakutsi dute eta are garrantzitsuago, esku-hartze ez-inbasibo bidez eskuragarriak dira (Gardin et al., 2016) (8. irudia) (9. irudia, gorria). Gaur egun ez dago behin betiko fenotipo immunerik DPSCs-entzako. Hala ere, zelula ama mesenkimaltzat hartzeko TZEI-k eskatzen dituen CD73, CD90, CD105 azaleko markatzaile ama mesenkimalen adierazpena guztiz definitua dago DPSCs-etan. Beste hainbat lanek CD27, CD29, CD44, CD146, CD166, CD271 eta STRO-1 adierazpen positiboa frogatu dute. Bestalde, DPSCs-ek CD34, CD45 (markatzaile hematopoietikoa), CD14 (monozito edo makrofago markatzailea), CD19 (B zelula markatzailea) eta HLA-DR (giza leukozito antigenoa) ez dituztela adierazten ere argitaratu da (Anitua et al., 2018; Gronthos et al., 2002; Kawashima, 2012). Harago joanda, DPSCs-ek zelula ama neural (Nestina, Vimentina) eta zelula ama mesenkimal (Vimentina, I. Kolagenoa)-en markatzaileekin batera Oct-4, Nanog eta Sox2 markatzaile ama pluripotenzialak adierazteko gai dira. DPSCs-ek gainera, GFAP, β -III tubulina eta MAP-2 gandor neuraleko

zelulekin erlazionatutako markatzaileak ere adierazten dituzte (Feng et al., 2013; Ibarretxe et al., 2012; Király et al., 2009).

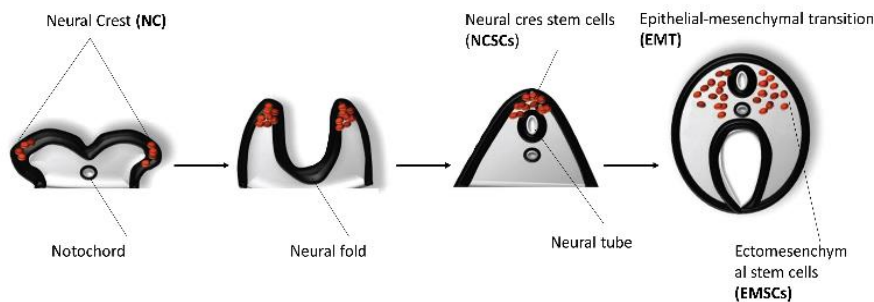


8. irudia. Hortz baten irudi longitudinala (Gardin et al., 2016).

1.2.5.4.1 Gandor neuraleko jatorria eta izaera ektomesenkimala

Ornodunen enbrioietan hodi neuralaren aldameneko ertzean zelula pluripotentez osaturiko egitura iragankor bat da gandor neurala (GN). Gandor neuraleko zelula amak (ingelesez, neural crest stem cells, NCSCs) gorputz osoan zehar migratzeko gai dira izaera desberdineko ehun desberdinak sortuz. Hala nola, azaleko melanozitoak, guruin adrenal eta tiroideoko zelula endokrinoak, nerbio sistema periferikoa (NSP) eta garezur-aurpegiko egitura gehientsuak, hezur, mingain, muskulu eta nerbioak, besteak beste sor ditzakete (Shyamala et al., 2015; Vega-Lopez et al., 2017). Izan ere, garezur-aurpegiko egiturak NCSCs bereziz daude osaturik. Hodi neuralaren garapenean, neuroektodermoko ertzak batu egiten dira tolestura neurala gertatu ondoren. Behin, forma tubularra lortuta NCSCs-ek epitelio-mesenkima trantsizioa (EMT) jasaten dute, zelula ama ektomesenkimatikotan bihurtuz (ingelesez, ectomesenchymal stem cells, EMSCs). Beraz, NCSCs-ak, garezur-aurpegiko egiturak sortzeko migratzean, onezkero EMSCs-ak dira, zeintzuk hortz mamia eta lotailu periodontala bezalako ehun konektiboak eratuko dituzten enbrioiaren garapenean zehar (9. irudia) (Ibarretxe et al., 2012). Ondorioz, DPSCs-ak eta goian aipaturiko beste zelula ama neuralak, NCSCs-en iturritzat

hartu dira, hauen GN-ko jatorri eta GN markatzaileen adierazpena kontuan hartuta (Chai et al., 2000; Janebodin et al., 2011).



9. irudia. Gandor neuraleko zelulen jatorria (Ibarretxe et al., 2012).

1.2.5.4.2 Beste zelula ama batzuk

Ikerketarako zelularik erabilienak DPSCs-ak badira ere, azpimarratu beharra dago bestel hartz zelula ama batzuen existentzia. Hartz folikuluko zelula amak (ingelesez, dental follicle stem cells, DFSCs) eta papila puntako zelula amak (ingelesez, stem cells from apical papilla, SCAP) aurki daitezke garapenean dauden hartz ehunetan, eta lotailu periodontaleko zelula amak (ingelesez, periodontal ligament stem cells, PDLSCs) eta hasieran esfoliatu hartz erorkorretako zelula amak (ingelesez, stem cells from primary exfoliated deciduous teeth, SHED) aurki daitezke hartz helduetan (Ibarretxe et al., 2012; Sharpe, 2016) (9. irudia).

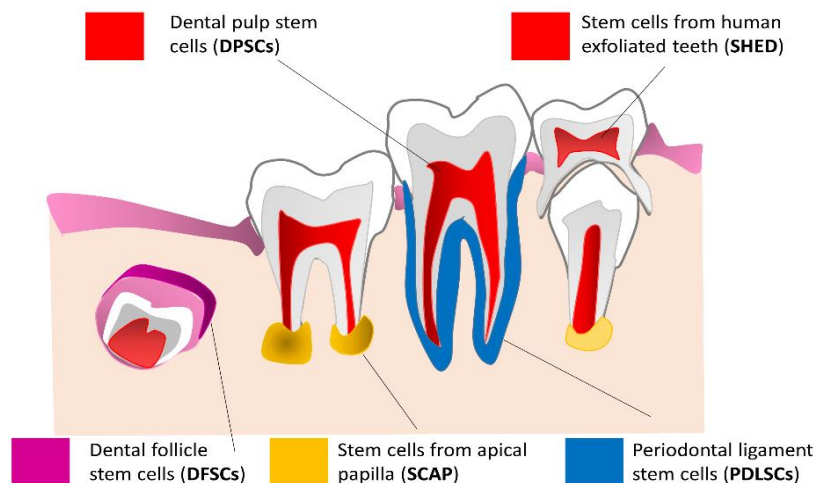
DFSCs: Hartz garapenean hartz-hozia inguratzen duen ehun enbrioniko ektomesenkimaletatik isola daitezke zelula hauek. Helduetan, DFSCs-ak irtetzeko dauden azkenaginen folikuluetatik lor daitezke (10. irudia, morea) (Morsczeck et al., 2005). DFSCs-ek ehun periodontalekin zerikusia duten zeluletara desberdintzeaz gain, beste leinu batzuetara ere bidea daitezke *in vitro* (Honda et al., 2010; Morsczeck et al., 2017).

SCAP: Garapenean dauden hortzen sustriaiak inguratzen dituen hazkuntza ratio handia duen populazio ektomesenkimala da. (10. irudia, horia). Normalean zelula hauek hartz morfogenesiaren garapenean badaude ere, SCAP- irtetzekotan dauden azkenaginetan aurki

daitezke helduetan (Bakopoulou et al., 2011). SCAP-ek ez dute bakarrik leinu neuraletara desberdintzeko abilezia erakutsi, baizik eta baita potentzial neurogeniko eta angiogenikoak (Nada and El Backly, 2018).

PDLSCs: 2004.ean Seo et al.-ek DPSCs-ek dituzten hazkuntza tasa, desberdintzapen klonogeniko ahalmen eta markatzaile pluripotenzial antzekoak zituzten MSCs-ak lortu zituen periostioko gune peribaskularretik, hauei lotailu periodontaleko zelula amak (ingelesez, periodontal ligament stem cells, PDLSCs) deritze (Liu et al., 2018a; Seo et al., 2004; Trubiani et al., 2010) (10. irudia, urdina).

SHED: DPSCs-en antzera SHED-ak ere EMSCs-ak dira. Hazkuntza handia, oinarritzko markatzaile neuralen eta pluripotenzialen adierazpena eta burmuin ehun ostalariaren integrazio eta biziraupen gaitasuna duten zelulak dira (Kerkis et al., 2006; Miura et al., 2003) (10. irudia, gorria). SHED-ek leinu mesenkimal (Bento et al., 2013; Sakai et al., 2010) eta leinu neurogenikotara desberdintzeko ahalmen azpimarragarria dute (Brar and Toor, 2012; Zhang et al., 2016b). Ezaugarri hauek kontuan izanez hauek EMSCs iturri bezala erabili daitezke, hala ere, hauen erabilera mugatua dago gizakian eta lortu daitekeen material kantitatea gutxi da esfoliazio bitartean gertatzen den sustrai birxurgapena dela eta.



10. irudia. Hortzetako ama zelula motak (Sharpe, 2016)-tik eraldatua.

Birsortze terapia zelularretan DPSCs-ak benetan iturri erabilgarriak diren jakiteko beste zelula ama iturri batzuekin alderatu dira. DPSCs-ak BM-MSCs-ekin alderatu ziren lehenatariko lanean, desberdintzapen gaitasun eta markatzaile neural eta glial espezifiko antzekoak zituztela frogatu zen. Hala ere, DPSCs-ek metabolismo aktibo eta garatuagoa zutela ere ikusi zen eta

azkenean DPSCs-ek zelula amen ezaugarri neural eta epitelial gehiago zituztela ondorioztatu zen (Karaöz et al., 2011). DPSCs-eak beste MSCs iturri batzuekin konparatu ziren. Hurrengo lanean, UC-MSCs, odol menstrualeko zelulak eta DPSCs-eak izan ziren konparatuak. UC-MSCs-ek DPSCs-ek baino hazkuntza tasa handiagoa zutela erakutsi bazuten ere, DPSCs-ek seneszentzia txikiagoa eta desberdintzapen osteogeniko ahalmen handiago zutela ikusi zen beste bi mota zelularrekin konparatuta (Ren et al., 2016). Emaiza hauek hurrengo ikerketetan lortutako emaitzekin guztiz bat egiten dute, non hazkuntza faktoreen aktibitatea, hartzaileen aktibitatea eta seinale transdukzioa gain erregulatuta zuedela frogatu zen. Bestalde, UC-MSCs-tan hazkuntza zelularra eta erantzun immune eta angiogeniarekin erlazionatutako geneak gainadierazita zeudela ikusi zuten. Beraz, UC-MSCs-en hazkuntza tasa handia, hazkuntza zelularren geneen gain adierazpenarekin eta DPSCs-en seneszentzia baxua hazkuntza faktoreen aktibitate geneen areagotzearekin erlazionatu zitezkeen (Kang et al., 2016). Beste ikerketa lan batean DPSCs, SHEDs, BM-MSCs eta fluido sinobialeko zelulak (ingelese, synovial fluid cells, SFCs) arteko desberdintze ahalmena alderatu zen. BM-MSCs eta SFCs-ek ahalmen ostogeniko eta kondrogenikoa zuten bitartean, DPSCs eta SHEDs-ek ahalmen neurogeniko handiagoa erakutsi zuten. Ikerketa berdinean SHED-ek DPSCs eta BM-MSCs-ek baino hazkuntza ratio handiagoa zutela ere frogatu zen (Isobe et al., 2016). Garapen jatorri desberdina kontuan izanda espero zen bezala SHEDs-ek DPSCs-ek baino zelula ama markatzaile gehiago zituzten, eta hauek baino ahalmen osteogeniko handiagoa. Gainera BM-MSCs-ek baino osteogenesis gaitasun gutxiago erakutsi zuten, zeintzuk zelula ama markatzaile gutxiago ere adierazten zituzten (Aghajani et al., 2016). iPSCs-ak sindrome neurogenetikoak ikasteko zelula ama iturri nagusiak dira. Badago literaturan DPSCs-en birprogramazio eraginkor eta seguruan fokaturiko zenbait ikerketa. Izan ere, ezaguna da DPSCs zelula ama markatzaileak adierazten dituela oinarritzko baldintzetan inolako indukziorik gabe, beraz, zelula hauek iPSCs-ak sortzerako orduan beste batzuk baino eraginkorragoak izan daitezkeela hipotetizatu dute autore batzuek (Pisal et al., 2018; Yan et al., 2010).

1.2.5.4.3 Serum gabeko hazkuntzak eta hortz-esferen eraketa

Desberdintzapen tratamendu gehienek serum fetala (behi edo txahal) daramate osagarri bezala, zelulen ugartitze eta geruza bakar itsaskor moduko hazkuntza sustatzeko. Serumaren erabilerak DPSCs-eak leinu osteo/odontoblastikoetara bideratzen ditu, beraien berezko bidea jarraituz (Pisciotta et al., 2012; Yu et al., 2010). Horretaz aparte, elementu xenogenikoek erantzun immunea eta zelula transplantatuen errefusa eragin dezake terapia zelularretan (Gregory et al., 2006; Horwitz et al., 2002). MSCs-eak zeluletan-oinarritutako produktu mediko (ZOPM) bezala izendatua izan zirenetik, DPSCs-eak fabrikazio prozedura onak (FPO) betetzeko beharrezkoak

diren arau zorrotzen menpe prestatu behar ziren 2003/94/EC EU erregulazioak eskatzen duen bezala (Pacini, 2014). Serum gabeko hazkuntza inguruneen protokoloak azaldutako arazo horiek ekiditeko xedearekin izan dira garatuak. Ez da giza DPSCs-ekin (gDPSCs) bat-bateko desberdintzapen osteo/odontoblastikorik ikusi, xagu DPSCs-ekin (xDPSCs) gertatzen den bezala (Zainal Ariffin et al., 2013). Serum gabeko inguruneetan oinarritutako ikerketek gDPSCs-en bideragarritasuna eta amatasun ezaugarrien mantentzea frogatu dute baldintza horretan (Hirata et al., 2010). Lehen aipatu bezala GN-eko jatorriak zenbait ezaugarri berezi esleitzen dizkie DPSCs-ei.

Neurosferen *in vitro* eraketa neural ama/aitzindari zelularren ezaugarri berezi bat bada ere (Pineda et al., 2013), ez da ezustekoa beraien jatorri EMSCs kontuan hartuta, gDPSCs-ek hartz-esfera deituriko, neurosfera antzeko egiturak eratze gaitasuna izatea. Literaturan nolabaiteko kontraesana dago DPSCs-etatik eratorritako hartz-esferen desberdintzapen gaitasunaren erregulazioarekiko. Autore batzuek hartz-esfera moduko DPSCs-ek lortutako aurre-biderapen osteogenikoa komentatzen dute serum gabeko baldintzetan (Bakopoulou et al., 2017; Bonnamain et al., 2013), beste lan batzuek bitartean, DPSCs-ak zenbait egun serum gabeko ingurunean haztean hartz-esferek markatzaile pluripotenzialak areagotzen dituztela diote (Hirata et al., 2010; Lee et al., 2017; Xiao and Tsutsui, 2013). Idazle guztiak ez datoz bat desberdintzapen neuralean ematen den hartz-esferen eraketa denborarekin, Gervois et al.-ek hartz-esferak hasierako desberdintzapen alditan ematen zela zioten eta Karbanova et al.-ek, berriz, eraketa azkenengo faseetan ematen zela erakutsi zuten. Hala ere, biek bat egin zuten, beste ikerketa askorekin batera, hartz-esferen markatzaile neural desberdinen adierazpena eta leinu neuraletara, baita giza neurona dopaminergikotara ere, desberdintzeko gaitasunaren arteko loturan (Chun et al., 2016; Gervois et al., 2015a; Karbanová et al., 2011; Osathanon et al., 2014).

1.2.5.4.DPSCs-en ezaugarri neuro-babesle eta immuno-modulatzailak

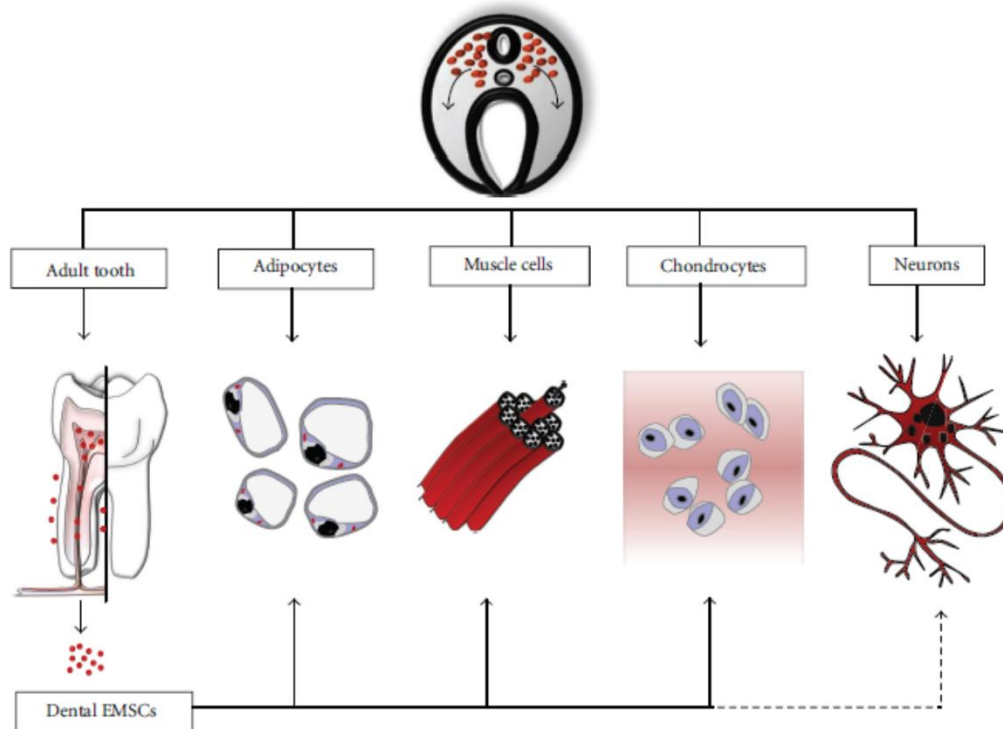
DPSCs-ek erakutsitako desberdintzapen pluripotenziala bezain garrantzitsua NGF (ingelesez, nerve growth factor), BDNF (ingelesez, brain-derived neurotrophic factor), GDNF (ingelesez, glial cell line derived neurotrophic factor), NT-3 (ingelesez, neurotrophin 3), VEGF (ingelesez, vascular endothelial growth factor) eta PDGF (ingelesez, platelet-derived growth factor)-en adierazpen eta jariapen gaitasuna da (Mead et al., 2014a; Sakai et al., 2012). BM-MSCs eta AT-MSCs-ekin alderatuta *in vivo* eta *in vitro* frogatu da faktore hauek adierazteko DPSCs-ek duten gaitasun handiagoa (Caseiro et al., 2016). Emaitza hauek DPSCs-ek nerbio sistemarekin erlazionaturiko arazoei aurre egiteko ezaugarri neuro-babesle handiagoak dituztela sustatzen dute. Literaturan faktore hauek duten garrantzia zabalki deskribatu da. Adibidez,

zenbait taldek faktore trofikoek onurak jorratu dituzte, i) neuro-endekapenaren hasierako faseetan ematen den apoptosi neural eta neurona sentsozialen biziraupenean (Nosrat et al., 2001) edota ii) axoi hazkuntza inhibitzaileen presentzian axoi birsortzearen sustapenean (Arthur et al., 2009; Kolar et al., 2017) bizkarrezur-muineko lesio (BEML) eredutan. DPSCs-ek babes zelular zuzen eta zeharkakoa eman zuten lesio iskemikoa astrozitoen eredu esperimentalean (Song et al., 2017).

Faktore trofikoek jariatzen diren haratago, faktore immuno-modulatuak eta hanturak kontrako faktoreen garrantzia ondo dokumentatua izan da DPSCs-tan-oinarritutako ehun birsortze entseiatan. DPSCs-ek interleukina-8 (IL-8), interleukina-6 (IL-6), eta TGF- β bitarteko Toll-moduko hartzaile (TLR) 4, TGF- β , HIF eta indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) adieraz ditzaketela ere izan da argitaratua (Bianco et al., 2016; Özdemir et al., 2016; Tomic et al., 2011). TGF- β , HIF eta IDO-a T zelulen eta odol periferikoko zelula nukleo-bakarren aktibazioa zapaldu dezakete, erantzun immune alogenikoa inhibituz (Kwak et al., 2017; Sugita et al., 2015). Gainera, IL-8-ak axoien osotasuna kontserba dezakela ikusi da BEML istripu lesioan (He et al., 2013). T zelulak DPSCs-ekin batera ereitean giza leukozito antigeno-G, baskular itsaspen-1 molekula, zelula barneko itsaspen-1 molekula, IL-6, TGF- β , HIF, eta IL-10 jariatzen diren. Are gehiago, IL-2 elementu hanturazlea, IL-6 hartzailea, IL-12, IL-17A eta tumore nekrosi- α faktorea (TNF- α) zitokinak azpi-erregulatuak izan ziren (Demircan et al., 2011), T zelulen hazkuntza maila %90 jaistearekin batera (Pierdomenico et al., 2005). Beste ikerketa batean, DPSCs-ek izugarriko eragin modulatuak zutela frogatu zen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T zelula erregulatuak kantitatea areagotzen. Laburbilduz, efektu immuno-modulatuak hauek zelula ama terapia autogeniko eta alogenikoa seguru eta eraginkorrak lortzeko giltza izan daitezke.

1.2.5.4 DPSCs-en desberdintzapena

DPSCs-en izaera EMSC-a kontuan izanik, ez da arraroa adipocito, kondroblasto eta osteo/odontoblasto ehun konektibo berezietako zeluletan desberdintzeko erakutsitako erraztasuna (Gronthos et al., 2002; Kawashima, 2012). Hala ere, honezkerok hainbat aldiz aipatu den bezala, DPSCs-ek hiru hozi-geruzatako zelulak lortzeko ahalmena erakutsi badute ere, gutxienez bi hozi-geruzatako zeluletara desberdintzeko erraztasuna esleitzen die izaera berezi honek .



11. irudia. DPSCs derived cell types (Ibarretxe et al., 2012)

Ektodermoa: Beste MSCs batzuekin alderatuz DPSCs-ek dituzten abantailarik garrantzitsuenak, *in vitro* neurona funtzional bihurtzea errazten duten GN jatorria eta oinarritzko ezaugarri neuralak dira. Azken urteotan, desberdintzapen neuralentzako protokolo asko garatu dira. Fibroblastoen hazkuntza faktorea (bFGF), hazkuntza faktore epidermala (EGF), NGF, BDNF, GDNF, sonic hedgehog, NT-3, azido erretinoikoa (RA), forskolina eta heparina bezalako hazkuntza faktore, neurotrofina eta beste molekula txiki batzuk ezinbestekoak dira desberdintzapen neuro-induzitzailetan inguruetan. B27, ITSx, amino azido ez esentzialak eta N2 hazkuntza osagarriak ere maiz erabili dira protokolo hauetan (Arthur et al., 2008; Chang et al., 2014; Gervois et al., 2015; Kanafi et al., 2014; Király et al., 2011; Osathanon et al., 2014; Xiao and Tsutsui, 2013; Zhang et al., 2017) (11 eta 12. irudiak).

Orain aipatutako lanetan eta 1.3.4.3 atalean (Serum gabeko hazkuntzak eta hartz-esferen eraketa) aipatutako lan gehienek hartz-esferen eraketa desberdintzapen neuralaren beharrezko pausu bat bezala hartzen dute. Badaude zenbait talde, berriz, pausu hau saltatzen dutela. Ingurune faktore endogenoak eta pausu anitzeko potrokolo induzitzaileak erabiliz, azpi-leinu motore eta dopaminergiko neuronal bereziak lortu zituzten (Chang et al., 2014; Gnanasegaran et al., 2018; Kanafi et al., 2014). BDNF, NT-3 eta GDNF erabiliz gongoil espiraleko neurona-modukotara ere izan ziren desberdinduak DPSCs-ak (Gonmanee et al., 2018).

NeuN, MAP-2, DCX eta itsaspen molekula neuralak bezalako, desberdintzapen neurala berresteko erabili diren ezaugarri ohikoak albo batera utzita, zenbait ikerketek entsaio elektrofisiologikoak egin zituzten DPSCs-en desberdintzapen neuralaren funtzionaltasuna sakonago aztertzeko xedearekin. Oraindik ez denez DPSCs-etatik eratorritako neuronen ekintza potentzialik inoiz ikusi, ez dago batere argi ea neurona heldu funtzionalik lortzeko protokolo eraginkorrik badagoen, hala ere, boltai menpeko sodio eta potasio kanal funtzionalak deskribatu dira DPSCs-etan (Arthur et al., 2008; Gervois et al., 2015a; Király et al., 2009).

DPSCs-eak ere desberdindu daitezke zelula glial edo aitzindarietara. xDPSCs-en desberdintzapen oligodendrozitikoa hortz mamiko heterogeneitate klonala azaltzeko erabili zen, non bakarrik Nestina positiboak zirenak jasan zuten desberdintzapena (Young et al., 2016). Genetikoki eraldatutako gDPSCs-ak oligodendrozi to aitzindaritan bihurtzen ziren *Olig2* genea gain adierazi ondoren (Askari et al., 2014). Gainera, Martens et al. DPSCs-ak, I. motako kolagenoz egindako 3D hidrokeletan axoiak mielinizatzeko gai ziren Schwannen zelula funtzionaletara desberdintzeko gai izan ziren (Martens et al., 2014).

Mesodermoa: DPSCs-ak MSCs kontsideratzeko TZIE-ek eskatutako ezaugarrietako bat osteoblasto, adipozito eta kondroblastotara desberdintzeko ahalmena da (Dominici et al., 2006).

Desberdintzapen osteogenikoa ondo dokumentatua izan da zenbait ikerketa lanetan. Beste desberdintzapen protokoloekin gertatzen den bezala, osteo-desberdintzapenak ere errezeta gehienetan errepikatzen diren osagarriak behar ditu. Dexametasona, L-azido askorbikoa eta β -glizerol fosfatoa beharrezkoak dira DPSCs-etatik eratorritako fosfatasa alkalinoa, I. motako kolagenoa, osteokalzina, osteonektina, osteopontina, osterix eta runt-ekin erlazionatutako 2. transkripzio faktorea (RUNX2) adierazten dituzten osteoblasto-moduko zelulak lortzeko (Ajlan et al., 2015; Atari et al., 2012a; Bhuptani and Patravale, 2016; Goto et al., 2016; Riccio et al., 2010). Hain zuzen ere RUNX2 erregulatzaile osteo/odontoblastiko garrantzitsuenetarikoa da. Honek osteoblastoen gene adierazpena eta mineralizazioa aktibatzen ditu desberdintzapen osteoblastikoare hasierako faseetan (Vimalraj et al., 2015; Xu et al., 2015b). Gainera, RUNX2-k potentzial odontoblastikoaren arduradu du dentina sialofosfoproteina (DSPP) aktibatuz, zeinek dentina sialoproteina eta fosfoproteina kodifikatzen dituen (Han et al., 2014). DSPP eta dentina matrizearen 1 proteina (DMP1)-ren adierazpenaren gain-erregulazioa eta fosfatasa alkalinoaren aktibitatearen areagotzea desberdintzapen odontoblastikoaren ezaugarriak dira (Abuarqoub et al., 2015; Paduano et al., 2016).

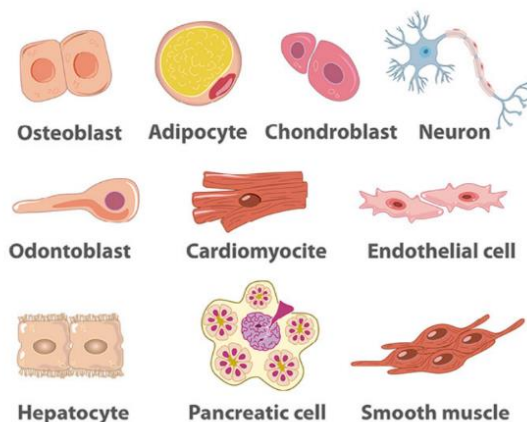
DPSCs-en desberdintzapena adipogenikoa intsulina, dexametasona eta 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) daramatzen ingurune induktiboak erabiliz lor daiteke. Bai O tanta lipidikoen tindaketa, zein peroxisoma ugaritzaileak aktibatutako γ hartzailearen, 4. motako glukosa garraiatzailearen, gantz azido lotzaileen 4. proteinaren eta lipoproteina lipasa

markatzaile adipogenikoen adierazpena beharrezkoa da desberdintzapena berresteko (Grottkau et al., 2010; Lee et al., 2015; Zhang et al., 2006).

Desberdintzapen kondroblastikoa ITSx, dexametasona, L-azido askorbikoa, L-prolina , sodio pirubatoa eta TGF- β 3-rekin osatutako ingurune inductiboa erabiliz lortu daiteke (Hilkens et al., 2013; Jang et al., 2016; Nemeth et al., 2014). TGF- β proteina superfamiliak erantzukizun galanta dauka kondrogenesiaren fase garrantzitsutan, kartilagoko desberdintze/de-desberdintze aktibatetetan erregulatuzaile izanik (Dexheimer et al., 2016).

DPSCs-ak zelula mota ez ohikotara desberdintzeko gai dira, kardiomiocito (Ferro et al., 2012) eta muskulu leuneko zeluletara (Song et al., 2016), adibidez. Zelula endotelialak gutxienez 30 egunez BSF %20-an zuen a-MEM-an hazita lortu ziren DPSCs-tatik (d'Aquino et al., 2007). Marchionni et al.-ek ere DPSCs-ak, BSF %2-a eta 50 ng/ml VEGF-rekin ornitutako DMEM ingurunean 7 egunez hazita lortu zituen zelula endotelialak (Marchionni et al., 2009) (11 eta 12. irudiak).

DIFFERENTIATED DPSCs



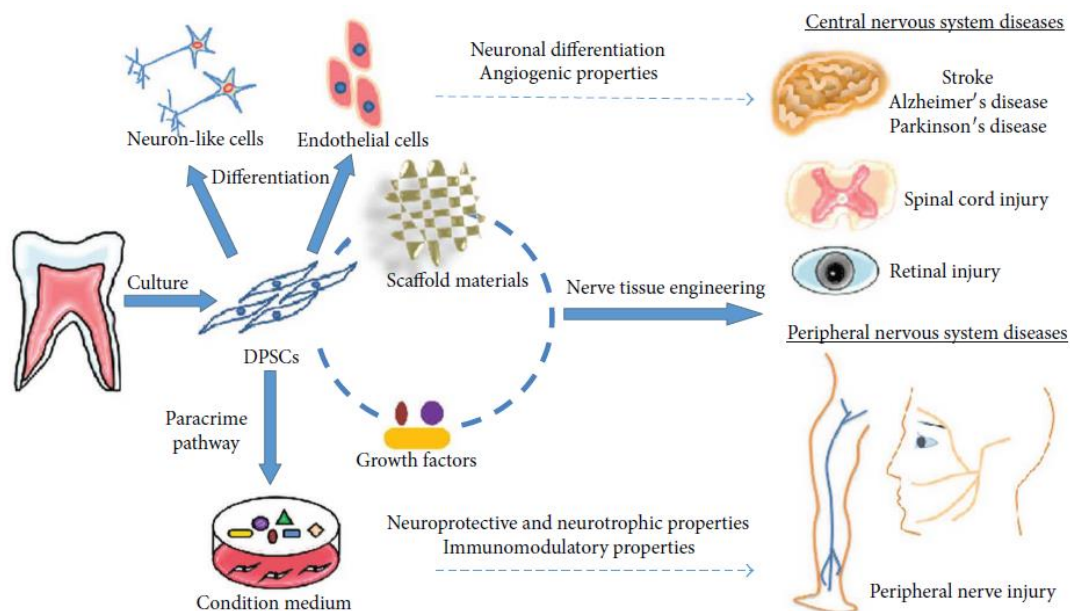
12. irudia. DPSCs-tatik eratorritako hiru hozi-geruzatako zelula mota desberdinak (Anitua et al., 2018)

Endodermoa: Orain dela urte batzuk uste zenaren aurka, DPSCs-tatik ez dira bakarrik leinu ektodermiko eta mesodermikoko zelulak lortzen. Ikerketa berriek DPSCs-en gaitasun pluripotenziala aztertu dute, honi buruzko zalantzak argituz. Azkeneko bost urtetan, zelula hauek duten malgutasun zelularra frogatu da, leinu endodermaleko zeluletara desberdintzeko

gaitasuna erakutsi ostean (12. irudia). DPSCs-en desberdintzapen hepatikoa markatzaile hepato espezifikoen adierazpenarekin berretsi da. Desberdintzapen hepatikoa aztertu zuten ikerketak serum gabeko edo serum gutxiko (%1-%2) kontzentrazioak zituzten inguruneak gutxienez hurrengo elementuetatik; HGF, ITSx, dexametasona eta M onkostatina, bi-rekin konbinatuz burutu ziren (Chen et al., 2016; Ferro et al., 2012; Han et al., 2017; Ishkitiev et al., 2012). DPSCs-tatik zelula pankreatikotara desberdintzea ere ikusi da. Lortutako zelulek intulina, glukagoia, somatostatina eta polipeptido pankreatikoa produzitu zezaketen markatzaile pankreatikoen adierazpenaren areagotzearekin batera. Ishkitiev et al.-ek CD117+ zelulak desberdintzapen pankreatikoa jasateko zelula aproposenak zirela erakutsi zuten. Yagi Mendoza et al.-ek, berriz, desberdintzapen pankreatikoan PI3K/AKT eta WNT-ek jotzen duten paper garrantzitsua argitu zuten, Carnevale et al.-ek desberdintzapena 7. egunean hasten zela ikusi zuten bitartean (Carnevale et al., 2013; Ishkitiev et al., 2013; Yagi Mendoza et al., 2018).

1.2.5.4. DPSCs-tan oinarritutako birsortze terapiak

Desberdintzapen ahalmenetik at, DPSCs-en ezaugarri angiogeniko, immuno-modulatzaile eta neuro-babesleak hartu behar dira kontutan (Luo et al., 2018). Bereizgarri guzti hauek DPSCs-ak birsortze terapiatan erabiltzeko iturri aproposenean bihurtzen ditu, zehazki nerbio ehun birsortzean NSP-koarekin partekatutako NC jatorria kontuan hartuta. Gainera, baskulogenesia garrantzitsua izan liteke ehun birsorkuntzan, elikagai eta oxigenoa zuzkituz



ehun gune minduei (13.irudia).

13. irudia. DPSCs eta aldazio egiturak nerbio sistemako gaixotasunetan erabiltzeko (Luo et al., 2018).

1.2.5.4.6.1 DPSCs bitarteko baskulogenesia eta angiogenesia

Baskulogenesia eta angiogenesia garapen enbrionarioan zehar sare baskular osatzeko beharrezkoak diren prozesuak dira. Bi termino hauek askotan sinonimo bezala erabili badira ere, baskulogenesia odol hodi berrien *de novo* eraketa da angiogenesia existitzen ziren hodietatik odol hodi berrien eratzea den bitartean. Zein baino zein beharrezkoak dira ehun eta organoek beharrezkoak duten odol hornitzea lortzeko hauen funtzionamendu normala mantentzeko (Patan, 2004). Faktore trofiko angiogenikoak dira odol hodi berrien sortzearen erantzule (Carmeliet, 2000). MSCs gehienek bezala, DPSCs-ek ere hurrengo faktore angiogenikoak jaria ditzakete; kolonia-kitzikatzaile faktorea, interleukina-8, angiogenina, endotelina-1, angiopoietina-1, eta intsulina-bezalako hazkuntza faktorearen-3 proteina lotzailea (Bronckaers et al., 2013; Ratajczak et al., 2016). VEGF, PDGF, bFGF, eta NGF hazkuntza faktore estimulatzaileak (Mead et al., 2014a; Tran-Hung et al., 2008) jariatzearekin batera, DPSCs-ek zelula endotelialen biziraupena, hazkuntza eta tubulogenesia eragin dezakete (Tran-Hung et al., 2006). Are gehiago, Bronckaers et al.-ek zelula endotelialen migrazio eta baskulogenesia PI3K/AKT eta MEK/ERK bideen aktibazio bitartez ematen zela aurkitu zuten. DPSCs-en desberdintzapen endotelial ahalmena eta faktore angiogeniko eta estimulatzaileen adierazpena kontuan hartuta, zelula hauek angiogenesi terapeutiko eragin dezakete (Psaltis et al., 2008).

Jada 1999.an Takahashi et al.-ek zelula ama eta EPCs-ak erabili zituzten iskemia gaixotasuna sendatzeko (Takahashi et al., 1999). Beranduago, 2008.urtean, arratoiaren DPSCs-ak miokardioko infartu (MI) ereduan transplantatu ziren. Odol hodi berrien eraketa eta funtzionamendu hobetu eta infartatutako gunea txikitu zen DPSCs-en presentziaren eraginez (Gandia et al., 2008). Hiru urte beranduago, cd31⁺/cd146⁻ DPSCs-ak burmuineko iskemia fokatuko arratoi ereduan txertatu ziren, baskulogenesia areagotzea eta burmuineko iskemia lesioa txikitzea lortu zuten MCAO eredu horretan (Sugiyama et al., 2011). gDPSCs-tan oinarritutako ikasketa gutxietako batek arratoinen burmuin lesio-osteko sendatzean DPSCs-ek duten efektu parakrinoak garrantzia iradokitzen du, ordezkapenean ez oinarritutako terapia garrantzia emanez (Leong et al., 2012). DPSCs-ak HUVECs-ekin konbinatzean mikro-hodien eraketa erakutsi zuten, DPSCs-ek *in vivo* angiogenesisian zelula peribaskular bezala jokatu zezaketela iradoki zutelarik (Nam et al., 2017). Orain dela gutxi, 3D inprimagailu teknika erabili zen dentina/mami egitura baskularizatua sortzeko (Hilkens et al., 2017).

1.2.5.4.6.2 DPSCs bitarteko birsortze neurala

Pazientek eta beraien gertukoek jasandako gizarte, ekonomiko eta dependentzia zamek terapia neuro-birsortzaileak ikerketa lehentasuna izan dute. NSCs-en erabilera ezinbestekoa izan

beharko litzateke nerbio ehun birsortze terapietan, baina, bai organismo helduan aurkezten duen intzidentzia txikiak zein eskuragarritasun zailak, ikertzaileak zelula ama berrien iturriak aurkitzera bultzatu ditu. Dagoen kantitate handia eta eskuragarritasun erlatiboki errazak, MSCs-ak NSCs-ek utzitako lekua betetzeko hautagai aproposan bilakatzen ditu (Kerkis et al., 2006; Kim et al., 2012). Alabaina, MSCs guztiak ez dira aproposak helburu hortarako, izan ere, DPSCs-ek beharrezko ezaugarriak azaltzen dituzte, besteak beste, markatzaile pluripotenzial enbrionikoak eta zelula ama neuralen markatzaileak, GN jatorria, desberdintzapen neurala lortzeko gaitasuna eta paziente beretik lortu daitezke inolako esku-hartze mingarririk gabe. DPSCs-ak beste MSCs-ak bezain kantitate haundian ez badaude ere, hauek ugaritze tasa handiak dituzte (Gronthos et al., 2000). Pazienteen zelula propioak erabiliz terapia autologoetan erabiltzeko nerbio ehunean larria izan daitekeen erreakzio immunea ekidin daiteke. Ikerketa asko egin dira nerbio sistema zentralean (NSZ) eta nerbio sistema periferikoan (NSP). Haietako batzuk zelula-zelula ordezkapenean daude oinarriturik baina orokorrean, sekretoman oinarrituriko terapia zelularrak dira.

1.2.5.4.6.2.1 Nerbio Sistema zentrala (NSZ)

Nerbio sistema zentrala inguruneko seinaleak jaso eta hauei eman beharreko erantzunak kontrolatu eta koordinatzen dituen organoa da. Hau burmuina eta bizkarrezur muinaz dago osaturik. Jadanik erabili dira zelula amak NSZ-ko gaixotasunen terapietan (Tatullo et al., 2015; Varga and Gerber, 2014). Aitzindari zelularren populazio urriak (Mead et al., 2017), mielinari lotutako hazkuntza faktore inhibitzaileak (Geoffroy and Zheng, 2014) eta orban glialaren eraketak (Stichel and Müller, 1998), erasoen aurrean NSZ-ak duen birsortze eta sendatze asko ahultzen dute.

-Gaixotasun neuro-endekatzaileak: Azlheimerren (AG) eta Parkinsonen gaixotasunak (PG), zahartzaroari loturiko lehenengo eta bigarren gaixotasun ohikoenak dira, hurrenez-hurren. Biak oso ikasiak izan dira eta DPSCs-etan oinarrituriko zenbait terapia argitaratu dira azkenengo urteetan (Apel et al., 2009). Zelula barneko neuro-zuntzen desantolakuntzak, galtze neuronalak eta peptide disolbaezinen metaketek sortzen dute AG-a. Aldaketa fisiologiko hauek sintomatologia ezagun bat eragiten dute; memoria galtzea, hutsegite kognitiboak eta hizkuntza akatsak, besteak beste (Huang and Mucke, 2012). DPSCs-tan oinarrituriko terapia zelularrek izaera defizit eta akats fisiologikoetan dituzten onurak erakusteko *in vivo* eta *in vitro* AG ereduak erabili izan dira (Apel et al., 2009; Shin et al., 2014). Beste AG eredu batzuk ere izan dira erabiliak. Horrela, azido okadaikoak eragindako AG-a DPSCs-ek sustatutako birsortze neuronal, mikrotubuluaren egonkortasunaren babesa eta egitura zitoeskeletikoaren mantentzearen bitartez sendatu zen (Wang et al., 2017a). Bi ikerketek DPSCs-ek erakutsitako VEGF,

fraktalkina, RANTES, eta fms-ri lotutako tirosina 3 kinasen jariapen handiak, beta amiloide (A β) peptidoak bideratutako apoptosi eta zitotoxikotasunaren aurrean duen babespen ahalmena frogatu zuten (Ahmed et al., 2016; Mita et al., 2015).

DPSCs-ak oso erabiliak izan dira neurona dopaminergikoak (DA) lortzeko *in vitro* (Chang et al., 2014; Gnanasegaran et al., 2018; Kanafi et al., 2014). PD-aren neuroendekapen jarraituak bide nigrostriatal-eko neurona DA-en galera dakar. Galtze honek bradykinesia, muskulu gogortzea, dardara eta ez-egonkortasun postural eragiten du pazienteetan (Dauer and Przedborski, 2003). NSZ-ko beste gaixotasun batzuetan deskribatu den bezala, DPSCs-ek hantura kontrako aktibitatea ezinbestekoa da ehun sendaketan. Horrela, MPTP bitartez eragindako zahartze-PG xagu ereduan, jokabide hutsegitea sendatzea eta neurona DA-en funtzioen leheneratzea lortu zen. Hau IL2, IL4, eta TNF- β hanturaren aurkako faktoreen gainerregulazioaren eta IL-1 α , IL-1 β , IL6, IL8, eta TNF- α hantura eragiten duten faktoreen jariapenaren murrizketaren bitartez lortu zen (Gnanasegaran et al., 2017a). *In vitro* ikusitako beste kasu batean MPTP-ri lotutako eskasiak DPSCs-en neuro-immunomodulazioari esker murriztu ziren (Gnanasegaran et al., 2017b). 6-hidroxidopamina (6-OHDA) bidez sortutako PG eredu DPSCs-ek sustatutako neurona DA biziraupenari esker *in vitro* (Chun et al., 2016; Nosrat et al., 2004) eta *in vivo* (Fujii et al., 2015) izan ziren konponduak.

-Garuneko hodietako istripua edo istripu zerebrobaskularra: Garuneko odol horniduraren murrizketa edo etena da, garun heriotza, luzaroko ezintasuna edota heriotza sortu ditzake burmuin ehuneko gabezi honek (Sughrue et al., 2004). Afekzio honekiko interesa oso handia da, mundu osoko prebenitu daitekeen heriotza kausen artean 2. zergatia zen eta produkzio galeraren kausen artean 4. zergatia zen 2012.urtean (Kuklina et al., 2012). Luzaroan gosetean egon den burmuinak jasandako kalteak atzeraezinak izan daitezke. Gainera, ez daude oso terapia eraginkorrik oraindik (Hossmann, 2006). Gaur egun, terapia zelularretan zelula amen erabilerak baikortzat hartu daitezke erakutsitako ezaugarri bereziak begiratuta (Lemmens and Steinberg, 2013). DPSCs-en erabilerari dagokionez, zenbait *in vivo* lanek DPSCs-en eraginkortasun terapeutikoa frogatu zuten MCAO jasandako arratoien gune iskemikoetan zelula hauek txertatuz. Eragina bai DA neuronon zelula-zelula ordezkapenari (Yang et al., 2009) zein jariapen trofikoari esker lortu zen (Sugiyama et al., 2011). Orain dela gutxi argitaratutako ikerketa batek, zain barnetik arratoi DPSCs-ak BDNF-rekin batera MCAO arratoi eredutan administratzean, bakarrik txertatutako BDNF edo DPSCs alderatuz funtzio neurologikoak errazago berreskuratu ditzaketela frogatu du (Zhang et al., 2018b). Faktore trofiko eta hantura-kontrako faktoreen jariapenaren garrantzia erakutsi zuten Song et al.-ek, DPSCs-ak zein DPSC-etatik eratorritako medio baldintzatua oxigeno-glukosa deprivazioz (OGD) sortutako iskemia *in vitro* eredu batean giza astrozitoen zito-babespenean frogatuz (Song et al., 2015).

-BEML: Honek, lesion gunearen eta larritasunaren arabera gorputzaren kontrol motorea eta sentsorialaren galera eragin dezake. 2018.urtean 250 000 eta 500 000 bitarteko pertsona kopuruak jasan zuen lesio hau munduko osasun elkartearen (MOE) arabera. BEML bi denboraldi fisiopatologiko independentetara bana daiteke. Lehenengoak nerbio ehun eta ehun baskularraren suntsipena hartzen du kontutan eta bigarrenak, neuro-hanturari loturiko erantzunak eragiten ditu, hala nola, apoptosia, estres oxidatiboa, orban glialaren eraketa eta zitotoxizitatea (Jiang et al., 2014). GN-eko jatorriak eta ezaugarri ektomesenkimalek oso erabilgarri bihurtu dituzte DPSCs-ak BEML terapietan. DPSCs-ak hasierako ehun suntsipena murrizteko zelula iturri berria dira hauek duten desberdintzapen neuronal eta oligodendrozitikoa ahalmenari esker (Yamamoto et al., 2014a, 2014b). Era berean, DPSCs-ak ondorengo hantura prozesua eraso dezake, IL-1 β -rekin, ras homologoaren gene familiako kidea (Rhoa), loturiko nekrosi hemorragiko jarraia murriztuz eta sulfonil-urea 1 hartzailea (SUR1) adieraziz, zeinek birsortze axonala eragiten duen faktore neurotrofikoaren produkzioa eraginez (Nosrat et al., 2001; Yang et al., 2017). DPSCs-ak kitosanarekin bateratzean, BEML-ren erruz eragindako zelula apoptosia ekiditu eta motore funtzionala berreskuratu daiteke (Zhang et al., 2016a).

-Erretinako Kaltea: Fotohartzaiak, zelula bipolarrak eta erretinako gongoil zelula (ingelesez, retinal ganglion cells, RGCs) eratzen dute erretina (Ramsden et al., 2013). Zenbait gaitzek eragin dezakete erretinako lesioak, besteak beste, neuropatia optiko traumatikoa (ingelesez, traumatic optic neuropathy, TON) eta RGCs-en endekapen glaukoma kaltegarriak (Munemasa and Kitaoka, 2015). Hazkuntza faktore neurotrofikoaren produkzio urriak eta hazkuntza axonalaren molekula inhibitzaileek erretinaren birsorkuntza ekiditen dute (Berry et al., 2008). Horren aurka, DPSCs-ek pazientearen beraren erretinako neuronen biziraupena eragiteko faktoreak jarria ditzakete eta DPSCs-ak RGCs-moduko (Roozafzoon et al., 2015) zeluletan eta fotohartzailetan (Bray et al., 2014) desberdin daitezke *in vivo*. Izan ere, Mead et al.-ek arratoi eredu baten nerbio optikoaren lesioa eta gero gorputz beirakaren txertatutako DPSCs-ek NGF, BDNF eta NT-3 bidezko berreskuratzea eragin zutela frogatu zuten RGCs-en neurobabespenarekin batera (Mead et al., 2013). Haratago joanda, DPSCs-ak gorputz beirakaren transplantatu eta ondoren 35 egunez murriztu zen glaukoma, RGCs-en heriotza eragotziz (Mead et al., 2016).

1.2.5.4.6.2 Nerbio sistema periferikoa (NSP)

Nerbio kranialek, III-tik XII-ra, eta goi zein behe adarrak hornitzen dituzten nerbioek osatzen dute NPS-a. Hauek SNZ, gorputz adarra eta organoen arteko lotailu bezala jokatzen dute (Catala and Kubis, 2013). Nerbio periferikoko gaixotasun eta lesioak ezgaitasun fisiko eta min neuropatikotan erortzen dira. Nerbio amaierako jostea, ehun txertaketa eta hazkuntza estimulazio terapiak dira tratamendu kliniko ohikoenak (Battiston et al., 2005; Matsuyama et

al., 2000; Pfister et al., 2011). Nerbioko txertaketa autologoa nerbio periferiko luzeko hutsegiteak sendatzeko urre-patroia da (Tamaki et al., 2016). Auto-txertaketarekin zerikusia duten desabantailek, nerbio emaile eskuragarritasuna eta hutsegite morfometrikoak nerbio ehun ingeniariatza eta zelula ama terapiak bateratuz konpon daitezke (Pereira et al., 2014). Sasaki et al.-ek aurpegiko nerbio minduaren birsortze funtzionala lortu zuten DPSCs-ak erabiliz (Sasaki et al., 2011). Antzerako beste bi ikerketek DPSCs-tatik eratorritako Schwannen zelula-moduko zelulez beteriko kolagenozko hodiak erabiliz, nerbio ziatikoaren birsortzea lortu zuten (Martens et al., 2014; Sanen et al., 2017). Genetikoki eraldatutako DPSCs-ek, oligodendrozito funtzional bezala jokatu zuten *in vitro* eta nerbio periferikoaren konponketa sustatu zuten xagu ereduan (Askari et al., 2015).

Erreferentziak:

- Abuargoub, D., Awidi, A., and Abuharfeil, N. (2015). Comparison of osteo/odontogenic differentiation of human adult dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in the presence of platelet lysate. *Arch. Oral Biol.* *60*, 1545–1553.
- Adolf, B., Chapouton, P., Lam, C.S., Topp, S., Tannhäuser, B., Strähle, U., Götz, M., and Bally-Cuif, L. (2006). Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.* *295*, 278–293.
- Aghajani, F., Hooshmand, T., Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Edalatkhah, H., Zarnani, A.-H., and Kazemnejad, S. (2016). Comparative Immunophenotypic Characteristics, Proliferative Features, and Osteogenic Differentiation of Stem Cells Isolated from Human Permanent and Deciduous Teeth with Bone Marrow. *Mol. Biotechnol.* *58*, 415–427.
- Ahmed, N.E.-M.B., Murakami, M., Hirose, Y., and Nakashima, M. (2016). Therapeutic Potential of Dental Pulp Stem Cell Secretome for Alzheimer’s Disease Treatment: An In Vitro Study. *Stem Cells Int.* *2016*, 8102478.
- Ajlan, S.A., Ashri, N.Y., Aldahmash, A.M., and Alnbaheen, M.S. (2015). Osteogenic differentiation of dental pulp stem cells under the influence of three different materials. *BMC Oral Health* *15*, 132.
- Ali, H., and Al-Mulla, F. (2012). Defining umbilical cord blood stem cells. *Stem Cell Discov.* *02*, 15.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* *227*, 271–278.
- An, C., Cheng, Y., Yuan, Q., and Li, J. (2010). IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Ann. Biomed. Eng.* *38*, 1647–1654.
- Anitua, E., Troya, M., and Zalduendo, M. (2018). Progress in the use of dental pulp stem cells in regenerative medicine. *Cytotherapy* *20*, 479–498.
- Anjos-Afonso, F., and Bonnet, D. (2007). Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood* *109*, 1298–1306.
- Apel, C., Forlenza, O.V., de Paula, V.J.R., Talib, L.L., Denecke, B., Eduardo, C.P., and Gattaz, W.F. (2009). The neuroprotective effect of dental pulp cells in models of Alzheimer’s and Parkinson’s disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria* *116*, 71–78.
- d’Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* *14*, 1162–1171.
- Ardeshiryajimi, A., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., Parivar, K., and Yaghmaei, P. (2014). A Comparative Study of Osteogenic Differentiation Human Induced Pluripotent Stem Cells and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell J. Yakhteh* *16*, 235–244.
- Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., and Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18105–18110.
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A., and Gronthos, S. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 1787–1795.
- Arthur, A., Shi, S., Zannettino, A.C.W., Fujii, N., Gronthos, S., and Koblar, S.A. (2009). Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2229–2237.
- Arutyunyan, I., Elchaninov, A., Makarov, A., and Fatkhudinov, T. (2016). Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells Int.* *2016*.

- Askari, N., Yaghoobi, M.M., Shamsara, M., and Esmaeili-Mahani, S. (2014). Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate into Oligodendrocyte Progenitors Using the Expression of Olig2 Transcription Factor. *Cells Tissues Organs* 200, 93–103.
- Askari, N., Yaghoobi, M.M., Shamsara, M., and Esmaeili-Mahani, S. (2015). Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience* 305, 197–208.
- Atari, M., Caballé-Serrano, J., Gil-Recio, C., Giner-Delgado, C., Martínez-Sarrà, E., García-Fernández, D.A., Barajas, M., Hernández-Alfaro, F., Ferrés-Padró, E., and Giner-Tarrida, L. (2012). The enhancement of osteogenesis through the use of dental pulp pluripotent stem cells in 3D. *Bone* 50, 930–941.
- Aurich, H., Sgodda, M., Kaltwasser, P., Vetter, M., Weise, A., Liehr, T., Brulport, M., Hengstler, J.G., Dollinger, M.M., Fleig, W.E., et al. (2009). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58, 570–581.
- Aurrekoetxea, M., Garcia-Gallastegui, P., Irastorza, I., Luzuriaga, J., Uribe-Etxebarria, V., Unda, F., and Ibarretxe, G. (2015). Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Front. Physiol.* 6.
- B Malafaya, P.P., Pedro, A.J., Peterbauer, A., Gabriel, C., Redl, H., and Reis, R.L. (2005). Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 1077–1085.
- Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., and Geurtsen, W. (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch. Oral Biol.* 56, 709–721.
- Bakopoulou, A., Apatzidou, D., Aggelidou, E., Gousopoulou, E., Leyhausen, G., Volk, J., Kritis, A., Koidis, P., and Geurtsen, W. (2017). Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects “stemness” properties. *Stem Cell Res. Ther.* 8.
- Baldrige, M.T., King, K.Y., Boles, N.C., Weksberg, D.C., and Goodell, M.A. (2010). Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* 465, 793–797.
- Barzilay, R., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E., and Offen, D. (2009). Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 18, 591–601.
- Batsali, A.K., Kastrinaki, M.-C., Papadaki, H.A., and Pontikoglou, C. (2013). Mesenchymal stem cells derived from Wharton’s Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 8, 144–155.
- Battiston, B., Geuna, S., Ferrero, M., and Tos, P. (2005). Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery* 25, 258–267.
- Bekhite, M.M., Finkensieper, A., Rebhan, J., Huse, S., Schultze-Mosgau, S., Figulla, H.-R., Sauer, H., and Wartenberg, M. (2014). Hypoxia, leptin, and vascular endothelial growth factor stimulate vascular endothelial cell differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 23, 333–351.
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24, 353–360.
- Bento, L.W., Zhang, Z., Imai, A., Nör, F., Dong, Z., Shi, S., Araujo, F.B., and Nör, J.E. (2013). Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J. Dent. Res.* 92, 51–57.
- Berry, M., Ahmed, Z., Lorber, B., Douglas, M., and Logan, A. (2008). Regeneration of axons in the visual system. *Restor. Neurol. Neurosci.* 26, 147–174.
- Bhonde, R.R., Sheshadri, P., Sharma, S., and Kumar, A. (2014). Making surrogate β -cells from mesenchymal stromal cells: perspectives and future endeavors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46, 90–102.

- Bhuptani, R.S., and Patravale, V.B. (2016). Porous microcaffolds for 3D culture of dental pulp mesenchymal stem cells. *Int. J. Pharm.* *515*, 555–564.
- Bianco, J., De Berdt, P., Deumens, R., and des Rieux, A. (2016). Taking a bite out of spinal cord injury: do dental stem cells have the teeth for it? *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 1413–1437.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* *14*, 2919–2937.
- Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., and Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 625–634.
- Bonnemain, V., Thinard, R., Sergent-Tanguy, S., Huet, P., Bienvenu, G., Naveilhan, P., Farges, J.-C., and Alliot-Licht, B. (2013). Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front. Physiol.* *4*.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947–956.
- Brand-Saberi, B. (2005). Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development. *Ann. Anat. Anat. Anz. Off. Organ Anat. Ges.* *187*, 199–207.
- Brar, G.S., and Toor, R.S.S. (2012). Dental stem cells: dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies. *Indian J. Dent. Res. Off. Publ. Indian Soc. Dent. Res.* *23*, 393–397.
- Bray, A.F., Cevallos, R.R., Gazarian, K., and Lamas, M. (2014). Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin. *Neuroscience* *280*, 142–155.
- Bronckaers, A., Hilkens, P., Fanton, Y., Struys, T., Gervois, P., Politis, C., Martens, W., and Lambrechts, I. (2013). Angiogenic Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *PLoS ONE* *8*.
- Bronfman, F.C., Garrido, J., Alvarez, A., Morgan, C., and Inestrosa, N.C. (1996). Laminin inhibits amyloid-beta-peptide fibrillation. *Neurosci. Lett.* *218*, 201–203.
- Brook, F.A., and Gardner, R.L. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5709–5712.
- Bruzzo, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 13644–13649.
- Campard, D., Lysy, P.A., Najimi, M., and Sokal, E.M. (2008). Native umbilical cord matrix stem cells express hepatic markers and differentiate into hepatocyte-like cells. *Gastroenterology* *134*, 833–848.
- Can, A., and Karahuseynoglu, S. (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 2886–2895.
- Can, A., Celikkan, F.T., and Cinar, O. (2017). Umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantations: A systemic analysis of clinical trials. *Cytotherapy* *19*, 1351–1382.
- Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q., and Zhao, R.C. (2005). Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *332*, 370–379.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* *9*, 641–650.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* *6*, 389–395.
- Carnevale, G., Riccio, M., Pisciotta, A., Beretti, F., Maraldi, T., Zavatti, M., Cavallini, G.M., La Sala, G.B., Ferrari, A., and De Pol, A. (2013). In vitro differentiation into insulin-producing β -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig. Liver Dis.* *45*, 669–676.

- Caseiro, A.R., Pereira, T., Ivanova, G., Lu–, A.L., and Maur–cio, A.C. (2016). Neuromuscular Regeneration: Perspective on the Application of Mesenchymal Stem Cells and Their Secretion Products. *Stem Cells Int.* 2016, 16.
- Catala, M., and Kubis, N. (2013). Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 29–41.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1671–1679.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Dayt. Ohio* 25, 2739–2749.
- Chang, C.-C., Chang, K.-C., Tsai, S.-J., Chang, H.-H., and Lin, C.-P. (2014). Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* 113, 956–965.
- Chen, S.-H., Murphy, D.A., Lassoued, W., Thurston, G., Feldman, M.D., and Lee, W.M.F. (2008). Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol. Ther.* 7, 1994–2003.
- Chen, W.C.W., Park, T.S., Murray, I.R., Zimmerlin, L., Lazzari, L., Huard, J., and Péault, B. (2013). Cellular kinetics of perivascular MSC precursors. *Stem Cells Int.* 2013, 983059.
- Chen, Y., Wang, J., Zhu, X., Chen, X., Yang, X., Zhang, K., Fan, Y., and Zhang, X. (2018). The directional migration and differentiation of mesenchymal stem cells toward vascular endothelial cells stimulated by biphasic calcium phosphate ceramic. *Regen. Biomater.* 5, 129–139.
- Chen, Y.K., Huang, A.H.C., Chan, A.W.S., and Lin, L.M. (2016). Human dental pulp stem cells derived from cryopreserved dental pulp tissues of vital extracted teeth with disease demonstrate hepatic-like differentiation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 10, 475–485.
- Chimal-Monroy, J., and Díaz de León, L. (1999). Expression of N-cadherin, N-CAM, fibronectin and tenascin is stimulated by TGF-beta1, beta2, beta3 and beta5 during the formation of precartilaginous condensations. *Int. J. Dev. Biol.* 43, 59–67.
- Choi, Y.S., Disting, G.J., Stubbs, S., Arunothayaraj, S., Han, X.L., Collas, P., Morrison, W.A., and Dilley, R.J. (2010). Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 878–889.
- Chun, S.Y., Soker, S., Jang, Y.-J., Kwon, T.G., and Yoo, E.S. (2016). Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Dopaminergic Neuron-like Cells in Vitro. *J. Korean Med. Sci.* 31, 171–177.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.
- Datta, I., Mishra, S., Mohanty, L., Pulikkot, S., and Joshi, P.G. (2011). Neuronal plasticity of human Wharton’s jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 13, 918–932.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson’s disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.
- Dave, S.D., Patel, C.N., Vanikar, A.V., and Trivedi, H.L. (2018). In vitro differentiation of neural cells from human adipose tissue derived stromal cells. *Neurol. India* 66, 716–721.
- De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H., and Fraser, J.K. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol. Lett.* 89, 267–270.

- Demircan, P.C., Sariboyaci, A.E., Unal, Z.S., Gacar, G., Subasi, C., and Karaoz, E. (2011). Immunoregulatory effects of human dental pulp-derived stem cells on T cells: comparison of transwell co-culture and mixed lymphocyte reaction systems. *Cytotherapy* 13, 1205–1220.
- Denner, L., Bodenbun, Y., Zhao, J.G., Howe, M., Cappo, J., Tilton, R.G., Copland, J.A., Forraz, N., McGuckin, C., and Urban, R. (2007). Directed engineering of umbilical cord blood stem cells to produce C-peptide and insulin. *Cell Prolif.* 40, 367–380.
- Dexheimer, V., Gabler, J., Bomans, K., Sims, T., Omlor, G., and Richter, W. (2016). Differential expression of TGF- β superfamily members and role of Smad1/5/9-signalling in chondral versus endochondral chondrocyte differentiation. *Sci. Rep.* 6, 36655.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Aström, G., van Harmelen, V., Götherström, C., Blomqvist, L., Arner, P., and Rydén, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 308, 283–290.
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., Chiang, M.-F., Lin, S.-Z., Chang, Y.-C., Wang, H.-J., Su, C.-Y., and Li, H. (2007). Enhancement of neuroplasticity through upregulation of beta1-integrin in human umbilical cord-derived stromal cell implanted stroke model. *Neurobiol. Dis.* 27, 339–353.
- Ding, D.-C., Chang, Y.-H., Shyu, W.-C., and Lin, S.-Z. (2015). Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* 24, 339–347.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, D.A., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dragoo, J.L., Choi, J.Y., Lieberman, J.R., Huang, J., Zuk, P.A., Zhang, J., Hedrick, M.H., and Benhaim, P. (2003). Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 21, 622–629.
- Du, X., Yuan, Q., Qu, Y., Zhou, Y., and Bei, J. (2016). Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence. *Stem Cells Int.* 2016, 3573846.
- Dunn, S.-J., Martello, G., Yordanov, B., Emmott, S., and Smith, A.G. (2014). Defining an essential transcription factor program for naïve pluripotency. *Science* 344, 1156–1160.
- Egorov, A.V., and Draguhn, A. (2013). Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity. *Mech. Dev.* 130, 412–423.
- El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., and Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng. Part B Rev.* 20, 523–544.
- Ellis, H. (1989). *Gray's anatomy*. 37th ed. P. L. Williams, R. Warwick, M. Dyson, L. H. Bannister. 305 × 235mm. Pp. 1598. Illustrated. 1989. Edinburgh: Churchill Livingstone. £70.00. *BJS* 76, 1359–1359.
- Ellis, K.M., O'Carroll, D.C., Lewis, M.D., Rychkov, G.Y., and Koblar, S.A. (2014). Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 30.
- Enderami, S.E., Soleimani, M., Mortazavi, Y., Nadri, S., and Salimi, A. (2018). Generation of insulin-producing cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells on PVA scaffold by optimized differentiation protocol. *J. Cell. Physiol.* 233, 4327–4337.
- Eto, H., Suga, H., Matsumoto, D., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., and Yoshimura, K. (2009). Characterization of structure and cellular components of aspirated and excised adipose tissue. *Plast. Reconstr. Surg.* 124, 1087–1097.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

- Feng, X., Xing, J., Feng, G., Sang, A., Shen, B., Xu, Y., Jiang, J., Liu, S., Tan, W., Gu, Z., et al. (2013). Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with Wnt/ β -catenin signaling. *Cell. Mol. Neurobiol.* *33*, 1023–1031.
- Feng, Z.-Q., Yan, K., Shi, C., Xu, X., Wang, T., Li, R., Dong, W., and Zheng, J. (2018). Neurogenic differentiation of adipose derived stem cells on graphene-based mat. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* *90*, 685–692.
- Ferro, F., Spelat, R., D'Aurizio, F., Puppato, E., Pandolfi, M., Beltrami, A.P., Cesselli, D., Falini, G., Beltrami, C.A., and Curcio, F. (2012). Dental pulp stem cells differentiation reveals new insights in Oct4A dynamics. *PloS One* *7*, e41774.
- Fong, C.-Y., Chak, L.-L., Biswas, A., Tan, J.-H., Gauthaman, K., Chan, W.-K., and Bongso, A. (2011). Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* *7*, 1–16.
- Fong, C.Y., Gauthaman, K., Cheyyatraivendran, S., Lin, H.D., Biswas, A., and Bongso, A. (2012). Human umbilical cord Wharton's jelly stem cells and its conditioned medium support hematopoietic stem cell expansion ex vivo. *J. Cell. Biochem.* *113*, 658–668.
- Fournier, B.P., Loison-Robert, L.S., Ferré, F.C., Owen, G.R., Larjava, H., and Häkkinen, L. (2016). Characterisation of human gingival neural crest-derived stem cells in monolayer and neurosphere cultures. *Eur. Cell. Mater.* *31*, 40–58.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* *4*, 267–274.
- Friedman, R., Betancur, M., Boissel, L., Tuncer, H., Cetrulo, C., and Klingemann, H. (2007). Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* *13*, 1477–1486.
- Fujii, H., Matsubara, K., Sakai, K., Ito, M., Ohno, K., Ueda, M., and Yamamoto, A. (2015). Dopaminergic differentiation of stem cells from human deciduous teeth and their therapeutic benefits for Parkinsonian rats. *Brain Res.* *1613*, 59–72.
- Fukuda, S., Kato, F., Tozuka, Y., Yamaguchi, M., Miyamoto, Y., and Hisatsune, T. (2003). Two distinct subpopulations of nestin-positive cells in adult mouse dentate gyrus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 9357–9366.
- Fukuda, S., Fini, C.A., Mabuchi, T., Koziol, J.A., Eggleston, L.L., and del Zoppo, G.J. (2004). Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. *Stroke J. Cereb. Circ.* *35*, 998–1004.
- Gabr, M.M., Zakaria, M.M., Refaie, A.F., Ismail, A.M., Abou-El-Mahasen, M.A., Ashamallah, S.A., Khater, S.M., El-Halawani, S.M., Ibrahim, R.Y., Uin, G.S., et al. (2013). Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant.* *22*, 133–145.
- Gabr, M.M., Zakaria, M.M., Refaie, A.F., Khater, S.M., Ashamallah, S.A., Ismail, A.M., El-Badri, N., and Ghoneim, M.A. (2014). Generation of insulin-producing cells from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: comparison of three differentiation protocols. *BioMed Res. Int.* *2014*, 832736.
- Gadelkarim, M., Abushouk, A.I., Ghanem, E., Hamaad, A.M., Saad, A.M., and Abdel-Daim, M.M. (2018). Adipose-derived stem cells: Effectiveness and advances in delivery in diabetic wound healing. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* *107*, 625–633.
- Gage, F.H., Kempermann, G., Palmer, T.D., Peterson, D.A., and Ray, J. (1998). Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus. *J. Neurobiol.* *36*, 249–266.
- Gandia, C., Armiñan, A., García-Verdugo, J.M., Lledó, E., Ruiz, A., Miñana, M.D., Sanchez-Torrijos, J., Payá, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., et al. (2008). Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 638–645.

- Garcia, A.D.R., Doan, N.B., Imura, T., Bush, T.G., and Sofroniew, M.V. (2004). GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 7, 1233–1241.
- Gardin, C., Ricci, S., and Ferroni, L. (2016). Dental Stem Cells (DSCs): Classification and Properties. In *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*, B. Zavan, and E. Bressan, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–25.
- Gavazzi, I., Boyle, K.S., Edgar, D., and Cowen, T. (1995). Reduced laminin immunoreactivity in the blood vessel wall of ageing rats correlates with reduced innervation in vivo and following transplantation. *Cell Tissue Res.* 281, 23–32.
- Geoffroy, C.G., and Zheng, B. (2014). Myelin-Associated Inhibitors in Axonal Growth After CNS Injury. *Curr. Opin. Neurobiol.* 0, 31–38.
- Gervois, P., Struys, T., Hilkens, P., Bronckaers, A., Ratajczak, J., Politis, C., Brône, B., Lambrichts, I., and Martens, W. (2015). Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev.* 24, 296–311.
- Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., Simon, C., Gan, Q.F., Vincent-Chong, V.K., Mani, V., Krishnan Selvarajan, K., Subramaniam, V., Musa, S., and Abu Kasim, N.H. (2017a). Effect of dental pulp stem cells in MPTP-induced old-aged mice model. *Eur. J. Clin. Invest.* 47, 403–414.
- Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., Mani, V., and Abu Kasim, N.H. (2017b). Neuroimmunomodulatory properties of DPSCs in an in vitro model of Parkinson’s disease. *IUBMB Life* 69, 689–699.
- Gnanasegaran, N., Govindasamy, V., Kathirvaloo, P., Musa, S., and Abu Kasim, N.H. (2018). Effects of cell cycle phases on the induction of dental pulp stem cells toward dopaminergic-like cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 12, e881–e893.
- Gonmanee, T., Thonabulsombat, C., Vongsavan, K., and Sritanaudomchai, H. (2018). Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells. *Arch. Oral Biol.* 88, 34–41.
- Goto, N., Fujimoto, K., Fujii, S., Ida-Yonemochi, H., Ohshima, H., Kawamoto, T., Noshiro, M., Shukunami, C., Kozai, K., and Kato, Y. (2016). Role of MSX1 in Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016, 13.
- Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., and Irmeler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis. *Glia* 63, 1452–1468.
- Goudarzi, F., Tayebinia, H., Karimi, J., Habibitabar, E., and Khodadadi, I. (2018). Calcium: A novel and efficient inducer of differentiation of adipose-derived stem cells into neuron-like cells. *J. Cell. Physiol.*
- Grandel, H., Kaslin, J., Ganz, J., Wenzel, I., and Brand, M. (2006). Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295, 263–277.
- Gregory, C.A., Reyes, E., Whitney, M.J., and Spees, J.L. (2006). Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 2232–2243.
- Griffin, M.F., Ibrahim, A., Seifalian, A.M., Butler, P.E.M., Kalaskar, D.M., and Ferretti, P. (2017). Chemical group-dependent plasma polymerisation preferentially directs adipose stem cell differentiation towards osteogenic or chondrogenic lineages. *Acta Biomater.* 50, 450–461.
- Gronthos, S., Graves, S.E., Ohta, S., and Simmons, P.J. (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164–4173.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630.
- Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L.W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P.G., and Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81, 531–535.

- Grottkau, B.E., Purudappa, P.P., and Lin, Y. (2010). Multilineage Differentiation of Dental Pulp Stem Cells from Green Fluorescent Protein Transgenic Mice. *Int. J. Oral Sci.* 2, 21–27.
- Guasti, L., New, S.E., Hadjidemetriou, I., Palmiero, M., and Ferretti, P. (2018). Plasticity of human adipose-derived stem cells - relevance to tissue repair. *Int. J. Dev. Biol.* 62, 431–439.
- Guerzon, E.R., Pereira, B.P., Bhavanam, K., Khin, Z.A., and Nathan, S.S. (2011). Collagen membranes for host-graft integration: an animal study. *J. Orthop. Surg. Hong Kong* 19, 151–156.
- Haeri, S.M.J., Sadeghi, Y., Salehi, M., Farahani, R.M., and Mohsen, N. (2016). Osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells on gum tragacanth hydrogel. *Biol. J. Int. Assoc. Biol. Stand.* 44, 123–128.
- Han, N., Zheng, Y., Li, R., Li, X., Zhou, M., Niu, Y., and Zhang, Q. (2014). β -catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS One* 9, e88890.
- Han, Y.-J., Kang, Y.-H., Shivakumar, S.B., Bharti, D., Son, Y.-B., Choi, Y.-H., Park, W.-U., Byun, J.-H., Rho, G.-J., and Park, B.-W. (2017). Stem Cells from Cryopreserved Human Dental Pulp Tissues Sequentially Differentiate into Definitive Endoderm and Hepatocyte-Like Cells in vitro. *Int. J. Med. Sci.* 14, 1418–1429.
- Harrison, J.F., Rinne, M.L., Kelley, M.R., Druzhyna, N.M., Wilson, G.L., and Ledoux, S.P. (2007). Altering DNA Base Excision Repair: Use of Nuclear and Mitochondrial-Targeted N-Methylpurine DNA Glycosylase to Sensitize Astroglia to Chemotherapeutic Agents. *Glia* 55, 1416–1425.
- Hartfuss, E., Galli, R., Heins, N., and Götz, M. (2001). Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* 229, 15–30.
- Hashemi Tabar, M., Tabandeh, M.R., Moghimipour, E., Dayer, D., Ghadiri, A.A., Allah Bakhshi, E., Orazizadeh, M., and Ghafari, M.A. (2018). The combined effect of Pdx1 overexpression and Shh manipulation on the function of insulin-producing cells derived from adipose-tissue stem cells. *FEBS Open Bio* 8, 372–382.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., and Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal. CCS* 9, 12.
- Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K., and Ishihara, M. (2006). Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 76, 230–239.
- He, W., Qu, T., Yu, Q., Wang, Z., Lv, H., Zhang, J., Zhao, X., and Wang, P. (2013). LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int. Endod. J.* 46, 128–136.
- Heimburg, D. von, Hemmrich, K., Zachariah, S., Staiger, H., and Pallua, N. (2005). Oxygen consumption in undifferentiated versus differentiated adipogenic mesenchymal precursor cells. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 146, 107–116.
- Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.
- Hilkens, P., Gervois, P., Fanton, Y., Vanormelingen, J., Martens, W., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., and Bronckaers, A. (2013). Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res.* 353, 65–78.
- Hilkens, P., Bronckaers, A., Ratajczak, J., Gervois, P., Wolfs, E., and Lambrichts, I. (2017). The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an In Vivo Model of Dental Pulp Regeneration. *Stem Cells Int.* 2017, 14.
- Hirata, T.M., Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Calenic, B., Ishikawa, H., Nakahara, T., Mitev, V., Tanaka, T., and Haapasalo, M. (2010). Expression of multiple stem cell markers in dental pulp cells cultured in serum-free media. *J. Endod.* 36, 1139–1144.
- Hoggatt, J., Kfoury, Y., and Scadden, D.T. (2016). Hematopoietic Stem Cell Niche in Health and Disease. *Annu. Rev. Pathol.* 11, 555–581.

- Honda, M.J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., and Morsczeck, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J. Oral Sci.* 52, 541–552.
- Hong, J.W., Lim, J.H., Chung, C.J., Kang, T.J., Kim, T.Y., Kim, Y.S., Roh, T.S., and Lew, D.H. (2017). Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Regulatory T-Cells and Induced by TGF-β1 and IL-10. *Yonsei Med. J.* 58, 1031–1039.
- Horwitz, E.M., and Keating, A. (2000). Nonhematopoietic mesenchymal stem cells: what are they? *Cytotherapy* 2, 387–388.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 8932–8937.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A., and International Society for Cellular Therapy (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
- Hossmann, K.-A. (2006). Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 1057–1083.
- Hu, M.S., Hong, W., Senarath-Yapa, K., Zimmermann, A.S., Chung, M.T., Esquivel, M., McArdle, A., Walmsley, G.G., Maan, Z.N., Garza, R.M., et al. (2014). Adipose-Derived Stem Cells Promote Engraftment of Autologous Skin Grafts in Diabetic Mouse Models. *J. Surg. Res.* 186, 578–579.
- Huang, Y., and Mucke, L. (2012). Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies. *Cell* 148, 1204–1222.
- Huang, G.T.-J., Gronthos, S., and Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J. Dent. Res.* 88, 792–806.
- Hui, J.H.P., Li, L., Teo, Y.-H., Ouyang, H.-W., and Lee, E.-H. (2005). Comparative study of the ability of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, periosteum, and adipose tissue in treatment of partial growth arrest in rabbit. *Tissue Eng.* 11, 904–912.
- Ibarretxe, G., Crende, O., Aurrekoetxea, M., García-Murga, V., Etxaniz, J., and Unda, F. (2012). Neural crest stem cells from dental tissues: a new hope for dental and neural regeneration. *Stem Cells Int.* 2012, 103503.
- Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U. (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 3561–3573.
- Im, G.-I., Shin, Y.-W., and Lee, K.-B. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 13, 845–853.
- Inamdar, M.S., Venu, P., Srinivas, M.S., Rao, K., and VijayRaghavan, K. (2009). Derivation and characterization of two sibling human embryonic stem cell lines from discarded grade III embryos. *Stem Cells Dev.* 18, 423–433.
- Ishige, I., Nagamura-Inoue, T., Honda, M.J., Harnprasopwat, R., Kido, M., Sugimoto, M., Nakauchi, H., and Tojo, A. (2009). Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int. J. Hematol.* 90, 261–269.
- Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Imai, T., Tanaka, T., Nakahara, T., Ishikawa, H., Mitev, V., and Haapasalo, M. (2012). High-purity hepatic lineage differentiated from dental pulp stem cells in serum-free medium. *J. Endod.* 38, 475–480.
- Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Kozuharova, A., Tanaka, T., Okada, M., Mitev, V., Fukuda, M., and Imai, T. (2013). Pancreatic differentiation of human dental pulp CD117⁺ stem cells. *Regen. Med.* 8, 597–612.
- Isobe, Y., Koyama, N., Nakao, K., Osawa, K., Ikeno, M., Yamanaka, S., Okubo, Y., Fujimura, K., and Bessho, K. (2016). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 45, 124–131.

- Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 26, 6687–6696.
- Janebodin, K., Horst, O.V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., and Reyes, M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PloS One* 6, e27526.
- Jang, J.-H., Lee, H.-W., Cho, K.M., Shin, H.-W., Kang, M.K., Park, S.H., and Kim, E. (2016). In vitro characterization of human dental pulp stem cells isolated by three different methods. *Restor. Dent. Endod.* 41, 283–295.
- Jessberger, S., Toni, N., Clemenson, G.D., Ray, J., and Gage, F.H. (2008). Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nat. Neurosci.* 11, 888–893.
- Ji, K., and Tsirka, S.E. (2012). Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *J. Neuroinflammation* 9, 159.
- Jia, B., Zhang, Z., Qiu, X., Chu, H., Sun, X., Zheng, X., Zhao, J., and Li, Q. (2018). Analysis of the miRNA and mRNA involved in osteogenesis of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp. Ther. Med.* 16, 1111–1120.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.
- Jiang, Y., Gong, F.-L., Zhao, G.-B., and Li, J. (2014). Chrysin suppressed inflammatory responses and the inducible nitric oxide synthase pathway after spinal cord injury in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 12270–12279.
- Kahan, B.W., and Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 1015–1036.
- Kanafi, M., Majumdar, D., Bhonde, R., Gupta, P., and Datta, I. (2014). Midbrain cues dictate differentiation of human dental pulp stem cells towards functional dopaminergic neurons. *J. Cell. Physiol.* 229, 1369–1377.
- Kang, C.-M., Kim, H., Song, J.S., Choi, B.-J., Kim, S.-O., Jung, H.-S., Moon, S.-J., and Choi, H.-J. (2016). Genetic Comparison of Stemness of Human Umbilical Cord and Dental Pulp. *Stem Cells Int.* 2016, 12.
- Karaöz, E., Demircan, P.C., Sağlam, O., Aksoy, A., Kaymaz, F., and Duruksu, G. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem. Cell Biol.* 136, 455–473.
- Karbanová, J., Soukup, T., Suchánek, J., Pytlík, R., Corbeil, D., and Mokřý, J. (2011). Characterization of dental pulp stem cells from impacted third molars cultured in low serum-containing medium. *Cells Tissues Organs* 193, 344–365.
- Kaukua, N., Shahidi, M.K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Ahrlund-Richter, L., et al. (2014). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 513, 551–554.
- Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? *Arch. Oral Biol.* 57, 1439–1458.
- Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G.C., Gomes Massironi, S.M., Pereira, L.V., Caplan, A.I., and Cerruti, H.F. (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, 105–116.
- Kilroy, G., Dietrich, M., Wu, X., Gimble, J.M., and Floyd, Z.E. (2018). Isolation of Murine Adipose-Derived Stromal/Stem Cells for Adipogenic Differentiation or Flow Cytometry-Based Analysis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1773, 137–146.
- Király, M., Porcsalmy, B., Pataki, A., Kádár, K., Jelítai, M., Molnár, B., Hermann, P., Gera, I., Grimm, W.-D., Ganss, B., et al. (2009). Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem. Int.* 55, 323–332.

- Király, M., Kádár, K., Horváthy, D.B., Nardai, P., Rácz, G.Z., Lacza, Z., Varga, G., and Gerber, G. (2011). Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem. Int.* *59*, 371–381.
- Knippenberg, M., Helder, M.N., Doulabi, B.Z., Semeins, C.M., Wuisman, P.I.J.M., and Klein-Nulend, J. (2005). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng.* *11*, 1780–1788.
- Knippenberg, M., Helder, M.N., Zandieh Doulabi, B., Wuisman, P.I.J.M., and Klein-Nulend, J. (2006). Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *342*, 902–908.
- Knudtzon, S. (1974). In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* *43*, 357–361.
- Kolar, M.K., Itte, V.N., Kingham, P.J., Novikov, L.N., Wiberg, M., and Kelk, P. (2017). The neurotrophic effects of different human dental mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* *7*, 12605.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* *32*, 149–184.
- Kucia, M., Reza, R., Campbell, F.R., Zuba-Surma, E., Majka, M., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* *20*, 857–869.
- Kuklina, E.V., Tong, X., George, M.G., and Bansil, P. (2012). Epidemiology and prevention of stroke: a worldwide perspective. *Expert Rev. Neurother.* *12*, 199–208.
- Kwack, K.H., Lee, J.M., Park, S.H., and Lee, H.W. (2017). Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Alloantigen-induced Immunity by Stimulating T Cells to Release Transforming Growth Factor Beta. *J. Endod.* *43*, 100–108.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* *31*, 890–896.
- Lee, C.P., Colombo, J.S., Ayre, W.N., Sloan, A.J., and Waddington, R.J. (2015). Elucidating the cellular actions of demineralised dentine matrix extract on a clonal dental pulp stem cell population in orchestrating dental tissue repair. *J. Tissue Eng.* *6*, 2041731415586318.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007a). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1468–1475.
- Lee, H.S., Cho, H.H., Kim, H.K., Bae, Y.C., Baik, H.S., and Jung, J.S. (2007b). Tbx3, a transcriptional factor, involves in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose stromal cells. *Mol. Cell. Biochem.* *296*, 129–136.
- Lee, J.H., Lee, K.H., Kim, M.H., Kim, J.P., Lee, S.J., and Yoon, J. (2012). Possibility of Undifferentiated Human Thigh Adipose Stem Cells Differentiating into Functional Hepatocytes. *Arch. Plast. Surg.* *39*, 593–599.
- Lee, K.-D., Kuo, T.K.-C., Whang-Peng, J., Chung, Y.-F., Lin, C.-T., Chou, S.-H., Chen, J.-R., Chen, Y.-P., and Lee, O.K.-S. (2004). In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatol. Baltim. Md* *40*, 1275–1284.
- Lee, S.H., Inaba, A., Mohindroo, N., Ganesh, D., Martin, C.E., Chugal, N., Kim, R.H., Kang, M.K., Park, N.-H., and Shin, K.-H. (2017). Three-dimensional Sphere-forming Cells Are Unique Multipotent Cell Population in Dental Pulp Cells. *J. Endod.* *43*, 1302–1308.
- Leite, C., Silva, N.T., Mendes, S., Ribeiro, A., de Faria, J.P., Lourenço, T., dos Santos, F., Andrade, P.Z., Cardoso, C.M.P., Vieira, M., et al. (2014). Differentiation of human umbilical cord matrix mesenchymal stem cells into neural-like progenitor cells and maturation into an oligodendroglial-like lineage. *PLoS One* *9*, e111059.

- Lemmens, R., and Steinberg, G.K. (2013). Stem cell therapy for acute cerebral injury: What do we know and what will the future bring? *Curr. Opin. Neurol.* 26, 617–625.
- Leong, W.K., Henshall, T.L., Arthur, A., Kremer, K.L., Lewis, M.D., Helps, S.C., Field, J., Hamilton-Bruce, M.A., Warming, S., Manavis, J., et al. (2012). Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 177–187.
- Lian, J.B., Javed, A., Zaidi, S.K., Lengner, C., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., and Stein, G.S. (2004). Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 14, 1–41.
- Lian, J.B., Stein, G.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Montecino, M., Hassan, M.Q., Gaur, T., Lengner, C.J., and Young, D.W. (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 7, 1–16.
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., et al. (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* 18, 600–603.
- Lim, I.J., and Phan, T.T. (2014). Epithelial and mesenchymal stem cells from the umbilical cord lining membrane. *Cell Transplant.* 23, 497–503.
- Lin, S.-Z., Chang, Y.-J., Liu, J.-W., Chang, L.-F., Sun, L.-Y., Li, Y.-S., Luo, G.-H., Liao, C.-H., Chen, P.-H., Chen, T.-M., et al. (2010). Transplantation of human Wharton's Jelly-derived stem cells alleviates chemically induced liver fibrosis in rats. *Cell Transplant.* 19, 1451–1463.
- Liu, N., Zhou, M., Zhang, Q., Yong, L., Zhang, T., Tian, T., Ma, Q., Lin, S., Zhu, B., and Cai, X. (2018a). Effect of substrate stiffness on proliferation and differentiation of periodontal ligament stem cells. *Cell Prolif.* e12478.
- Liu, S.-P., Ding, D.-C., Wang, H.-J., Su, C.-Y., Lin, S.-Z., Li, H., and Shyu, W.-C. (2010). Nonsenescent Hsp27-upregulated MSCs implantation promotes neuroplasticity in stroke model. *Cell Transplant.* 19, 1261–1279.
- Liu, W., Liu, H., Wang, Y., Zhang, L., Wang, C., and Li, H. (2018b). Ascorbic acid induces cardiac differentiation of white adipose tissue-derived stem cells. *Mol. Cell. Biochem.*
- Lo Furno, D., Mannino, G., Giuffrida, R., Gili, E., Vancheri, C., Tarico, M.S., Perrotta, R.E., and Pellitteri, R. (2018). Neural differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells induced by glial cell conditioned media. *J. Cell. Physiol.* 233, 7091–7100.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* 38, 431–440.
- Lopez, O.L. (2011). The growing burden of Alzheimer's disease. *Am. J. Manag. Care* 17 Suppl 13, S339-345.
- Luo, L., He, Y., Wang, X., Key, B., Lee, B.H., Li, H., and Ye, Q. (2018). Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem Cells Int.* 2018, 1731289.
- Ma, N., Ladilov, Y., Kaminski, A., Piechaczek, C., Choi, Y.-H., Li, W., Steinhoff, G., and Stamm, C. (2006). Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant. Proc.* 38, 771–773.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 216–225.
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., and Pittenger, M.F. (1998). Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.* 4, 415–428.
- Maharlooeei, M.K., Bagheri, M., Solhjoui, Z., Jahromi, B.M., Akrami, M., Rohani, L., Monabati, A., Noorafshan, A., and Omrani, G.R. (2011). Adipose tissue derived mesenchymal stem cell (AD-MSC) promotes skin wound healing in diabetic rats. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93, 228–234.

- Malik, N., and Rao, M.S. (2013). A review of the methods for human iPSC derivation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 997, 23–33.
- Malinda, K.M., Wysocki, A.B., Koblinski, J.E., Kleinman, H.K., and Ponce, M.L. (2008). Angiogenic laminin-derived peptides stimulate wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 2771–2780.
- Marchionni, C., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Di Tullio, A., Costa, R., Montanari, M., Tazzari, P.L., Ricci, F., Pasquinelli, G., et al. (2009). Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 22, 699–706.
- Marei, H.E.S., El-Gamal, A., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Farag, A., Cenciarelli, C., Thomas, C., and Anwarul, H. (2018). Cholinergic and dopaminergic neuronal differentiation of human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* 233, 936–945.
- Maria, T., Conconi, Di Liddo, R., Tommasini, M., Calore, C., and Parnigotto, P. (2010). Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. 4.
- Markarian, C.F., Frey, G.Z., Silveira, M.D., Chem, E.M., Milani, A.R., Ely, P.B., Horn, A.P., Nardi, N.B., and Camassola, M. (2014). Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods. *Biotechnol. Lett.* 36, 693–702.
- Martens, W., Sanen, K., Georgiou, M., Struys, T., Bronckaers, A., Ameloot, M., Phillips, J., and Lambrechts, I. (2014). Human dental pulp stem cells can differentiate into Schwann cells and promote and guide neurite outgrowth in an aligned tissue-engineered collagen construct in vitro. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28, 1634–1643.
- Martin, G.R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 209, 768–776.
- Matsuyama, T., Mackay, M., and Midha, R. (2000). Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 40, 187–199.
- McElreavey, K.D., Irvine, A.I., Ennis, K.T., and McLean, W.H. (1991). Isolation, culture and characterisation of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord. *Biochem. Soc. Trans.* 19, 29S.
- McGuckin, C.P., Pearce, D., Forraz, N., Tooze, J.A., Watt, S.M., and Pettengell, R. (2003). Multiparametric analysis of immature cell populations in umbilical cord blood and bone marrow. *Eur. J. Haematol.* 71, 341–350.
- McGuckin, C.P., Forraz, N., Baradez, M.-O., Navran, S., Zhao, J., Urban, R., Tilton, R., and Denner, L. (2005). Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 38, 245–255.
- McLean, K., Gong, Y., Choi, Y., Deng, N., Yang, K., Bai, S., Cabrera, L., Keller, E., McCauley, L., Cho, K.R., et al. (2011). Human ovarian carcinoma-associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J. Clin. Invest.* 121, 3206–3219.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2013). Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 7544–7556.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2014a). Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, e109305.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2014b). Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, e109305.
- Mead, B., Hill, L.J., Blanch, R.J., Ward, K., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2016). Mesenchymal stromal cell-mediated neuroprotection and functional preservation of retinal ganglion cells in a rodent model of glaucoma. *Cytotherapy* 18, 487–496.

- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2017). Concise Review: Dental Pulp Stem Cells: A Novel Cell Therapy for Retinal and Central Nervous System Repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* 35, 61–67.
- Mennan, C., Wright, K., Bhattacharjee, A., Balain, B., Richardson, J., and Roberts, S. (2013). Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from different regions of the human umbilical cord. *BioMed Res. Int.* 2013, 916136.
- Merkle, F.T., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Neural stem cells in mammalian development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 704–709.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17528–17532.
- Mita, T., Furukawa-Hibi, Y., Takeuchi, H., Hattori, H., Yamada, K., Hibi, H., Ueda, M., and Yamamoto, A. (2015). Conditioned medium from the stem cells of human dental pulp improves cognitive function in a mouse model of Alzheimer's disease. *Behav. Brain Res.* 293, 189–197.
- Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., et al. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells Dayt. Ohio* 21, 50–60.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., et al. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat. Med.* 12, 459–465.
- Miyata, T., Kawaguchi, A., Saito, K., Kawano, M., Muto, T., and Ogawa, M. (2004). Asymmetric production of surface-dividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* 131, 3133–3145.
- Mo, Z., Moore, A.R., Filipovic, R., Ogawa, Y., Kazuhiro, I., Antic, S.D., and Zecevic, N. (2007). Human cortical neurons originate from radial glia and neuron-restricted progenitors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 4132–4145.
- Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327–334.
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., and Hoffmann, K.H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* 24, 155–165.
- Morsczeck, C., Reck, A., and Beck, H.C. (2017). The hedgehog-signaling pathway is repressed during the osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Mol. Cell. Biochem.* 428, 79–86.
- Munemasa, Y., and Kitaoka, Y. (2015). Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 47, 1–18.
- Muruganandan, S., Roman, A.A., and Sinal, C.J. (2009). Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 236–253.
- Muschler, G.F., Nakamoto, C., and Griffith, L.G. (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J. Bone Joint Surg. Am.* 86-A, 1541–1558.
- Nada, O.A., and El Backly, R.M. (2018). Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 6, 103.
- Nadarajah, B., Jones, A.M., Evans, W.H., and Parnavelas, J.G. (1997). Differential Expression of Connexins during Neocortical Development and Neuronal Circuit Formation. *J. Neurosci.* 17, 3096–3111.

- Naghdi, M., Tiraihi, T., Namin, S.A.M., and Arabkheradmand, J. (2009). Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy* *11*, 137–152.
- Nakamura-Ishizu, A., Takubo, K., Kobayashi, H., Suzuki-Inoue, K., and Suda, T. (2015). CLEC-2 in megakaryocytes is critical for maintenance of hematopoietic stem cells in the bone marrow. *J. Exp. Med.* *212*, 2133–2146.
- Nam, H., Kim, G.-H., Bae, Y.-K., Jeong, D.-E., Joo, K.-M., Lee, K., and Lee, S.-H. (2017). Angiogenic Capacity of Dental Pulp Stem Cell Regulated by SDF-1 α -CXCR4 Axis. *Stem Cells Int.* *2017*, 10.
- Nemeth, C.L., Janebodin, K., Yuan, A.E., Dennis, J.E., Reyes, M., and Kim, D.-H. (2014). Enhanced Chondrogenic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells Using Nanopatterned PEG-GelMA-HA Hydrogels. *Tissue Eng. Part A* *20*, 2817–2829.
- New, S.E.P., Ibrahim, A., Guasti, L., Zucchelli, E., Birchall, M., Bulstrode, N.W., Seifalian, A.M., and Ferretti, P. (2017). Towards reconstruction of epithelialized cartilages from autologous adipose tissue-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 3078–3089.
- Ng, A.P., and Alexander, W.S. (2017). Haematopoietic stem cells: past, present and future. *Cell Death Discov.* *3*, 17002.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., et al. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* *21*, 2000–2008.
- Noctor, S.C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., and Kriegstein, A.R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat. Neurosci.* *7*, 136–144.
- Nombela-Arrieta, C., Pivarnik, G., Winkel, B., Canty, K.J., Harley, B., Mahoney, J.E., Park, S.-Y., Lu, J., Protopopov, A., and Silberstein, L.E. (2013). Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat. Cell Biol.* *15*, 533–543.
- Nosrat, I.V., Widenfalk, J., Olson, L., and Nosrat, C.A. (2001). Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Dev. Biol.* *238*, 120–132.
- Nosrat, I.V., Smith, C.A., Mullally, P., Olson, L., and Nosrat, C.A. (2004). Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 2388–2398.
- Oh, K., Kim, S.R., Kim, D.-K., Seo, M.W., Lee, C., Lee, H.M., Oh, J.-E., Choi, E.Y., Lee, D.-S., Gho, Y.S., et al. (2015). In Vivo Differentiation of Therapeutic Insulin-Producing Cells from Bone Marrow Cells via Extracellular Vesicle-Mimetic Nanovesicles. *ACS Nano* *9*, 11718–11727.
- Oliveira, Á., Corrêa-Velloso, J. da C., Glaser, T., and Ulrich, H. (2016). Stem Cells: Principles and Applications. In *Working with Stem Cells*, H. Ulrich, and P. Davidson Negraes, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–13.
- Oliveira, S.L.B., Pillat, M.M., Cheffer, A., Lameu, C., Schwindt, T.T., and Ulrich, H. (2013). Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* *83*, 76–89.
- O'Malley, J., Woltjen, K., and Kaji, K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* *20*, 516–521.
- Osathanon, T., Sawangmake, C., Nowwarote, N., and Pavasant, P. (2014). Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols. *Oral Dis.* *20*, 352–358.
- Otto, W.R., and Rao, J. (2004). Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* *37*, 97–110.

Özdemir, A.T., Özgül Özdemir, R.B., Kırmaz, C., Sarıboyacı, A.E., Ünal Halbutoğlları, Z.S., Özel, C., and Karaöz, E. (2016). The paracrine immunomodulatory interactions between the human dental pulp derived mesenchymal stem cells and CD4 T cell subsets. *Cell. Immunol.* *310*, 108–115.

Pacini, S. (2014). Deterministic and stochastic approaches in the clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs). *Front. Cell Dev. Biol.* *2*.

Paduano, F., Marrelli, M., White, L.J., Shakesheff, K.M., and Tatullo, M. (2016). Odontogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells on Hydrogel Scaffolds Derived from Decellularized Bone Extracellular Matrix and Collagen Type I. *PloS One* *11*, e0148225.

Parras, C.M., Galli, R., Britz, O., Soares, S., Galichet, C., Battiste, J., Johnson, J.E., Nakafuku, M., Vescovi, A., and Guillemot, F. (2004). Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain. *EMBO J.* *23*, 4495–4505.

Patan, S. (2004). Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* *117*, 3–32.

Peng, L., Shu, X., Lang, C., and Yu, X. (2017). Cardiostrophin-1 stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *Cytotechnology* *69*, 933–941.

Pereira, T., Gärtner, A., Amorim, I., Almeida, A., Caseiro, A.R., Armada-da-Silva, P.A.S., Amado, S., Fregnan, F., Varejão, A.S.P., Santos, J.D., et al. (2014). Promoting Nerve Regeneration in a Neurotmesis Rat Model Using Poly(DL-lactide--caprolactone) Membranes and Mesenchymal Stem Cells from the Wharton's Jelly: In Vitro and In Vivo Analysis. *BioMed Res. Int.* *2014*, 17.

Petersen, E.D., Zenchak, J.R., Lossia, O.V., and Hochgeschwender, U. (2018). Neural Stem Cells Derived Directly from Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* *27*, 637–647.

Peterson, B., Zhang, J., Iglesias, R., Kabo, M., Hedrick, M., Benhaim, P., and Lieberman, J.R. (2005). Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* *11*, 120–129.

Pfister, B.J., Gordon, T., Loverde, J.R., Kochar, A.S., Mackinnon, S.E., and Cullen, D.K. (2011). Biomedical engineering strategies for peripheral nerve repair: surgical applications, state of the art, and future challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* *39*, 81–124.

Phadnis, S.M., Joglekar, M.V., Dalvi, M.P., Muthyala, S., Nair, P.D., Ghaskadbi, S.M., Bhonde, R.R., and Hardikar, A.A. (2011). Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy* *13*, 279–293.

Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., et al. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* *80*, 836–842.

Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J.M., Boussin, F.D., and Mouthon, M.-A. (2013). Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol. Med.* *5*, 548–562.

Pisal, R.V., Suchanek, J., Siller, R., Soukup, T., Hrebikova, H., Bezrouk, A., Kunke, D., Micuda, S., Filip, S., Sullivan, G., et al. (2018). Directed reprogramming of comprehensively characterized dental pulp stem cells extracted from natal tooth. *Sci. Rep.* *8*, 6168.

Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., Cavallini, G.M., Ferrari, A., Bruzzesi, G., and De Pol, A. (2012). Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PloS One* *7*, e50542.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* *284*, 143–147.

- Planat-Bénard, V., Menard, C., André, M., Puceat, M., Perez, A., Garcia-Verdugo, J.-M., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (2004). Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ. Res.* *94*, 223–229.
- Portmann-Lanz, C.B., Schoeberlein, A., Huber, A., Sager, R., Malek, A., Holzgreve, W., and Surbek, D.V. (2006). Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *194*, 664–673.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Dev. Camb. Engl.* *110*, 1001–1020.
- Psaltis, P.J., Zannettino, A.C.W., Worthley, S.G., and Gronthos, S. (2008). Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2201–2210.
- Ramsden, C.M., Powner, M.B., Carr, A.-J.F., Smart, M.J.K., da Cruz, L., and Coffey, P.J. (2013). Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 2576–2585.
- Ranera, B., Remacha, A.R., Álvarez-Arguedas, S., Castiella, T., Vázquez, F.J., Romero, A., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., and Rodellar, C. (2013). Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet. J. Lond. Engl.* *197*, 248–251.
- Rashnonejad, A., Ercan, G., Gunduz, C., Akdemir, A., and Tiftikcioglu, Y.O. (2018). Comparative analysis of human UCB and adipose tissue derived mesenchymal stem cells for their differentiation potential into brown and white adipocytes. *Mol. Biol. Rep.* *45*, 233–244.
- Ratajczak, M.Z. (2008). Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Hematol.* *15*, 293–300.
- Ratajczak, J., Bronckaers, A., Dillen, Y., Gervois, P., Vanganswinkel, T., Driesen, R.B., Wolfs, E., Lambrechts, I., and Hilkens, P. (2016). The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering.
- Ratajczak, M.Z., Shin, D.-M., Liu, R., Mierzejewska, K., Ratajczak, J., Kucia, M., and Zuba-Surma, E.K. (2012). Very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs) and their potential role in aging and organ rejuvenation – an update and comparison to other primitive small stem cells isolated from adult tissues. *Aging* *4*, 235–246.
- Ray, A., Zoidl, G., Weickert, S., Wahle, P., and Dermietzel, R. (2005). Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur. J. Neurosci.* *21*, 3277–3290.
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C.J., Bovenkerk, J.E., Pell, C.L., Johnstone, B.H., Considine, R.V., and March, K.L. (2004). Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* *109*, 1292–1298.
- Ren, H., Sang, Y., Zhang, F., Liu, Z., Qi, N., and Chen, Y. (2016). Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord, Dental Pulp, and Menstrual Blood as Sources for Cell Therapy. *Stem Cells Int.* *2016*, 3516574.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* *255*, 1707–1710.
- Riccio, M., Resca, E., Maraldi, T., Pisciotta, A., Ferrari, A., Bruzzesi, G., and Pol, A.D. (2010). Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *Eur. J. Histochem.* e46–e46.
- Roofzafzon, R., Lashay, A., Vasei, M., Ai, J., Khoshzaban, A., Keshel, S.H., Barabadi, Z., and Bahrami, H. (2015). Dental pulp stem cells differentiation into retinal ganglion-like cells in a three dimensional network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *457*, 154–160.
- Rosen, E.D. (2002). The molecular control of adipogenesis, with special reference to lymphatic pathology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *979*, 143–158; discussion 188–196.

- Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.-D.C., Wilkison, W.O., Gimble, J.M., and Rice, H.E. (2002). Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *294*, 371–379.
- Sakai, K., Yamamoto, A., Matsubara, K., Nakamura, S., Naruse, M., Yamagata, M., Sakamoto, K., Tauchi, R., Wakao, N., Imagama, S., et al. (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J. Clin. Invest.* *122*, 80–90.
- Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M. a. a. M., Shi, S., Santos, C.F., and Nör, J.E. (2010). SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J. Dent. Res.* *89*, 791–796.
- Saleh, R., and Reza, H.M. (2017). Short review on human umbilical cord lining epithelial cells and their potential clinical applications. *Stem Cell Res. Ther.* *8*, 222.
- Sanen, K., Martens, W., Georgiou, M., Ameloot, M., Lambrechts, I., and Phillips, J. (2017). Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *11*, 3362–3372.
- Sasaki, R., Aoki, S., Yamato, M., Uchiyama, H., Wada, K., Ogiuchi, H., Okano, T., and Ando, T. (2011). PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *5*, 823–830.
- Schäffler, A., and Büchler, C. (2007). Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells Dayt. Ohio* *25*, 818–827.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond. Engl.* *364*, 149–155.
- Seo, K.-W., Lee, S.-R., Bhandari, D.R., Roh, K.-H., Park, S.-B., So, A.-Y., Jung, J.-W., Seo, M.-S., Kang, S.-K., Lee, Y.-S., et al. (2009). OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB-MSCs). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *384*, 120–125.
- Seo, M.J., Suh, S.Y., Bae, Y.C., and Jung, J.S. (2005). Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *328*, 258–264.
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.* *478*, 359–378.
- Shall, G., Menosky, M., Decker, S., Nethala, P., Welchko, R., Leveque, X., Lu, M., Sandstrom, M., Hochgeschwender, U., Rossignol, J., et al. (2018). Effects of Passage Number and Differentiation Protocol on the Generation of Dopaminergic Neurons from Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* *19*.
- Sharpe, P.T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Dev. Camb. Engl.* *143*, 2273–2280.
- Shi, S., and Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *18*, 696–704.
- Shi, Y.-Y., Nacamuli, R.P., Salim, A., and Longaker, M.T. (2005). The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast. Reconstr. Surg.* *116*, 1686–1696.
- Shin, J.Y., Park, H.J., Kim, H.N., Oh, S.H., Bae, J.-S., Ha, H.-J., and Lee, P.H. (2014). Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy* *10*, 32–44.
- Shu, Y., Yang, C., Ji, X., Zhang, L., Bi, Y., Yang, K., Gong, M., Liu, X., Guo, Q., Su, Y., et al. (2018). Reversibly immortalized human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) are responsive to BMP9-induced osteogenic and adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.*
- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H., and Murgod, S. (2015). Neural crest: The fourth germ layer. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* *19*, 221–229.

- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* *119*, 2204–2213.
- Slack, J.M. (2000). Stem cells in epithelial tissues. *Science* *287*, 1431–1433.
- Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 435–462.
- Song, B., Jiang, W., Alraies, A., Liu, Q., Gudla, V., Oni, J., Wei, X., Sloan, A., Ni, L., and Agarwal, M. (2016). Bladder Smooth Muscle Cells Differentiation from Dental Pulp Stem Cells: Future Potential for Bladder Tissue Engineering. *Stem Cells Int.* *2016*, 11.
- Song, M., Jue, S.-S., Cho, Y.-A., and Kim, E.-C. (2015). Comparison of the effects of human dental pulp stem cells and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells on ischemic human astrocytes in vitro. *J. Neurosci. Res.* *93*, 973–983.
- Song, M., Lee, J.-H., Bae, J., Bu, Y., and Kim, E.-C. (2017). Human Dental Pulp Stem Cells Are More Effective Than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury. *Cell Transplant.* *26*, 1001–1016.
- Sordi, V., Malosio, M.L., Marchesi, F., Mercalli, A., Melzi, R., Giordano, T., Belmonte, N., Ferrari, G., Leone, B.E., Bertuzzi, F., et al. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood* *106*, 419–427.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* *241*, 58–62.
- Steiner, B., Kronenberg, G., Jessberger, S., Brandt, M.D., Reuter, K., and Kempermann, G. (2004). Differential regulation of gliogenesis in the context of adult hippocampal neurogenesis in mice. *Glia* *46*, 41–52.
- Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H., and Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia* *54*, 805–814.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *40*, 1080–1087.
- Steward, M.M., Sridhar, A., and Meyer, J.S. (2013). Neural Regeneration. In *New Perspectives in Regeneration*, E. Heber-Katz, and D.L. Stocum, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 163–191.
- Stichel, C.C., and Müller, H.W. (1998). The CNS lesion scar: new vistas on an old regeneration barrier. *Cell Tissue Res.* *294*, 1–9.
- Stock, P., Brückner, S., Winkler, S., Dollinger, M.M., and Christ, B. (2014). Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 7004–7028.
- Strem, B.M., Zhu, M., Alfonso, Z., Daniels, E.J., Schreiber, R., Beygui, R., Begyui, R., MacLellan, W.R., MacLellan, W.R., Hedrick, M.H., et al. (2005). Expression of cardiomyocytic markers on adipose tissue-derived cells in a murine model of acute myocardial injury. *Cytotherapy* *7*, 282–291.
- Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Kobrin, M., Bissell, M.J., and Derynck, R. (1993). Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. *J. Cell Biol.* *120*, 253–260.
- Sughrue, M.E., Mehra, A., Connolly, E.S., and D'Ambrosio, A.L. (2004). Anti-adhesion molecule strategies as potential neuroprotective agents in cerebral ischemia: a critical review of the literature. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* *53*, 497–508.
- Sugita, S., Kamao, H., Iwasaki, Y., Okamoto, S., Hashiguchi, T., Iseki, K., Hayashi, N., Mandai, M., and Takahashi, M. (2015). Inhibition of T-cell activation by retinal pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *56*, 1051–1062.

- Sugiyama, M., Iohara, K., Wakita, H., Hattori, H., Ueda, M., Matsushita, K., and Nakashima, M. (2011). Dental pulp-derived CD31⁺/CD146⁻ side population stem/progenitor cells enhance recovery of focal cerebral ischemia in rats. *Tissue Eng. Part A* *17*, 1303–1311.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K.A., and Gage, F.H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2⁺ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* *1*, 515–528.
- Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., Johnnidis, J.B., Le, L., Ho, Y.-J., Klein, A., Hofmann, O., and Camargo, F.D. (2014). Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature* *514*, 322–327.
- Sun, X., Luo, L.-H., Feng, L., and Li, D.-S. (2018). Down-regulation of lncRNA MEG3 promotes endothelial differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells in repairing erectile dysfunction. *Life Sci*.
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., and Okano, H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *58*, 721–730.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* *5*, 434–438.
- Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficiz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., et al. (2014). Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* *158*, 1254–1269.
- Tamaki, T., Hirata, M., Nakajima, N., Saito, K., Hashimoto, H., Soeda, S., Uchiyama, Y., and Watanabe, M. (2016). A Long-Gap Peripheral Nerve Injury Therapy Using Human Skeletal Muscle-Derived Stem Cells (Sk-SCs): An Achievement of Significant Morphological, Numerical and Functional Recovery. *PLoS One* *11*, e0166639.
- Tang, D.-Q., Wang, Q., Burkhardt, B.R., Litherland, S.A., Atkinson, M.A., and Yang, L.-J. (2012). In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am. J. Stem Cells* *1*, 114–127.
- Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K.M., and White, L.J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *9*, 1205–1216.
- Timper, K., Seboek, D., Eberhardt, M., Linscheid, P., Christ-Crain, M., Keller, U., Müller, B., and Zulewski, H. (2006). Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *341*, 1135–1140.
- Tirino, V., Paino, F., d'Aquino, R., Desiderio, V., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2011). Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. *Stem Cell Rev.* *7*, 608–615.
- Tomic, S., Djokic, J., Vasiljic, S., Vucevic, D., Todorovic, V., Supic, G., and Colic, M. (2011). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev.* *20*, 695–708.
- Tran-Hung, L., Mathieu, S., and About, I. (2006). Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J. Dent. Res.* *85*, 819–823.
- Tran-Hung, L., Laurent, P., Camps, J., and About, I. (2008). Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch. Oral Biol.* *53*, 9–13.

- Trubiani, O., Zalzal, S.F., Paganelli, R., Marchisio, M., Giancola, R., Pizzicannella, J., Bühring, H.-J., Piattelli, M., Caputi, S., and Nanci, A. (2010). Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* *225*, 123–131.
- Tsai, P.-J., Wang, H.-S., Shyr, Y.-M., Weng, Z.-C., Tai, L.-C., Shyu, J.-F., and Chen, T.-H. (2012). Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Biomed. Sci.* *19*, 47.
- Ullah, I., Subbarao, R.B., and Rho, G.J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci. Rep.* *35*.
- Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 318–322.
- Uribe-Etxebarria, V., Luzuriaga, J., García-Gallastegui, P., Agliano, A., Unda, F., and Ibarretxe, G. (2017). Notch/Wnt cross-signalling regulates stemness of dental pulp stem cells through expression of neural crest and core pluripotency factors. *Eur. Cell. Mater.* *34*, 249–270.
- Vaquero, J., Zurita, M., Rico, M.A., Aguayo, C., Bonilla, C., Marin, E., Tapiador, N., Sevilla, M., Vazquez, D., Carballido, J., et al. (2018). Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy* *20*, 806–819.
- Varga, G., and Gerber, G. (2014). Mesenchymal stem cells of dental origin as promising tools for neuroregeneration. *Stem Cell Res. Ther.* *5*, 61.
- Vega-Lopez, G.A., Cerrizuela, S., and Aybar, M.J. (2017). Trunk neural crest cells: formation, migration and beyond. *Int. J. Dev. Biol.* *61*, 5–15.
- Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P.J., and Selvamurugan, N. (2015). Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* *78*, 202–208.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., et al. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp. Hematol.* *33*, 1402–1416.
- Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* *394*, 369–374.
- Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* *18*, 1417–1426.
- Wang, B., Li, W., Dean, D., Mishra, M.K., and Wekesa, K.S. (2018). Enhanced hepatogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells on liver ECM hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A* *106*, 829–838.
- Wang, F., Jia, Y., Liu, J., Zhai, J., Cao, N., Yue, W., He, H., and Pei, X. (2017a). Dental pulp stem cells promote regeneration of damaged neuron cells on the cellular model of Alzheimer's disease. *Cell Biol. Int.* *41*, 639–650.
- Wang, H., Ren, Y., Hu, X., Ma, M., Wang, X., Liang, H., and Liu, D. (2017b). Effect of Wnt Signaling on the Differentiation of Islet β -Cells from Adipose-Derived Stem Cells. *BioMed Res. Int.* *2017*, 2501578.
- Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., Lai, M.-C., and Chen, C.-C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells Dayt. Ohio* *22*, 1330–1337.
- Wang, H.-S., Shyu, J.-F., Shen, W.-S., Hsu, H.-C., Chi, T.-C., Chen, C.-P., Huang, S.-W., Shyr, Y.-M., Tang, K.-T., and Chen, T.-H. (2011). Transplantation of insulin-producing cells derived from umbilical cord stromal mesenchymal stem cells to treat NOD mice. *Cell Transplant.* *20*, 455–466.
- Wang, J., Yu, F., Jia, X., Iwanowycz, S., Wang, Y., Huang, S., Ai, W., and Fan, D. (2015). MicroRNA-155 deficiency enhances the recruitment and functions of myeloid-derived suppressor cells in tumor microenvironment and promotes solid tumor growth. *Int. J. Cancer* *136*, E602–613.

- Wang, Y., Wang, F., Zhao, H., Zhang, X., Chen, H., and Zhang, K. (2014). Human adipose-derived mesenchymal stem cells are resistant to HBV infection during differentiation into hepatocytes in vitro. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 6096–6110.
- Wei, Y., Hu, Y., Ly, R., and Li, D. (2006). Regulation of adipose-derived adult stem cells differentiating into chondrocytes with the use of rhBMP-2. *Cytotherapy* *8*, 570–579.
- Weiss, T.L., Selleck, S.E., Reusch, M., and Wintroub, B.U. (1990). Serial subculture and relative transport of human endothelial cells in serum-free, defined conditions. *Vitro Cell. Dev. Biol. J. Tissue Cult. Assoc.* *26*, 759–768.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *2*, 10–12.
- Wilkins, A., Kemp, K., Ginty, M., Hares, K., Mallam, E., and Scolding, N. (2009). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res.* *3*, 63–70.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810–813.
- Winkler, S., Hempel, M., Brückner, S., Mallek, F., Weise, A., Liehr, T., Tautenhahn, H.-M., Bartels, M., and Christ, B. (2015). Mouse white adipose tissue-derived mesenchymal stem cells gain pericentral and periportal hepatocyte features after differentiation in vitro, which are preserved in vivo after hepatic transplantation. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* *215*, 89–104.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.* *61*, 364–370.
- Xiao, L., and Tsutsui, T. (2013). Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. *J. Cell. Biochem.* *114*, 2624–2636.
- Xu, F., Liu, J., Deng, J., Chen, X., Wang, Y., Xu, P., Cheng, L., Fu, Y., Cheng, F., Yao, Y., et al. (2015a). Rapid and high-efficiency generation of mature functional hepatocyte-like cells from adipose-derived stem cells by a three-step protocol. *Stem Cell Res. Ther.* *6*.
- Xu, J., Liu, X., Jiang, Y., Chu, L., Hao, H., Liua, Z., Verfaillie, C., Zweier, J., Gupta, K., and Liu, Z. (2008). MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J. Cell. Mol. Med.* *12*, 2395–2406.
- Xu, J., Li, Z., Hou, Y., and Fang, W. (2015b). Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am. J. Transl. Res.* *7*, 2527–2535.
- Xu, J., Sun, M., Tan, Y., Wang, H., Wang, H., Li, P., Xu, Z., Xia, Y., Li, L., and Li, Y. (2017a). Effect of matrix stiffness on the proliferation and differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells. *Differ. Res. Biol. Divers.* *96*, 30–39.
- Xu, L.-J., Wang, S.-F., Wang, D.-Q., Ma, L.-J., Chen, Z., Chen, Q.-Q., Wang, J., and Yan, L. (2017b). Adipose-derived stromal cells resemble bone marrow stromal cells in hepatocyte differentiation potential in vitro and in vivo. *World J. Gastroenterol.* *23*, 6973–6982.
- Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H., and Chen, Y. (2004). Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp. Biol. Med.* *Maywood NJ* *229*, 623–631.
- Yagi Mendoza, H., Yokoyama, T., Tanaka, T., Ii, H., and Yaegaki, K. (2018). Regeneration of insulin-producing islets from dental pulp stem cells using a 3D culture system. *Regen. Med.*
- Yamamoto, A., Matsubara, K., Kano, F., and Sakai, K. (2014a). Analysis of the neuroregenerative activities of mesenchymal stem cells in functional recovery after rat spinal cord injury. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *1213*, 321–328.

- Yamamoto, A., Sakai, K., Matsubara, K., Kano, F., and Ueda, M. (2014b). Multifaceted neuro-regenerative activities of human dental pulp stem cells for functional recovery after spinal cord injury. *Neurosci. Res.* *78*, 16–20.
- Yamamoto, R., Morita, Y., Ooehara, J., Hamanaka, S., Onodera, M., Rudolph, K.L., Ema, H., and Nakauchi, H. (2013). Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* *154*, 1112–1126.
- Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R.S., Shi, S., and Huang, G.T.-J. (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev.* *19*, 469–480.
- Yan, X., Zhou, Z., Guo, L., Zeng, Z., Guo, Z., Shao, Q., and Xu, W. (2018). BMP7-overexpressing bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) are more effective than wild-type BMSCs in healing fractures. *Exp. Ther. Med.* *16*, 1381–1388.
- Yang, C., Li, X., Sun, L., Guo, W., and Tian, W. (2017). Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord. *J. Neural Eng.* *14*, 026005.
- Yang, K.-L., Chen, M.-F., Liao, C.-H., Pang, C.-Y., and Lin, P.-Y. (2009). A simple and efficient method for generating Nurr1-positive neuronal stem cells from human wisdom teeth (tNSC) and the potential of tNSC for stroke therapy. *Cytotherapy* *11*, 606–617.
- Yang, X., Hou, J., Han, Z., Wang, Y., Hao, C., Wei, L., and Shi, Y. (2013). One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci.* *3*, 5.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* *1*, 685–697.
- Young, F.I., Telezhkin, V., Youde, S.J., Langley, M.S., Stack, M., Kemp, P.J., Waddington, R.J., Sloan, A.J., and Song, B. (2016). Clonal Heterogeneity in the Neuronal and Glial Differentiation of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. *Stem Cells Int.* *2016*, 10.
- Yu, J., and Thomson, J.A. (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev.* *22*, 1987–1997.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.
- Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Shi, J., and Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol.* *11*, 32.
- Zainal Ariffin, S.H., Kermani, S., Zainol Abidin, I.Z., Megat Abdul Wahab, R., Yamamoto, Z., Senafi, S., Zainal Ariffin, Z., and Abdul Razak, M. (2013). Differentiation of dental pulp stem cells into neuron-like cells in serum-free medium. *Stem Cells Int.* *2013*, 250740.
- Zangiacomi, V., Balon, N., Maddens, S., Lapierre, V., Tiberghien, P., Schlichter, R., Versaux-Botteri, C., and Deschaseaux, F. (2008). Cord blood-derived neurons are originated from CD133+/CD34 stem/progenitor cells in a cell-to-cell contact dependent manner. *Stem Cells Dev.* *17*, 1005–1016.
- Zhang, J., Lu, X., Feng, G., Gu, Z., Sun, Y., Bao, G., Xu, G., Lu, Y., Chen, J., Xu, L., et al. (2016a). Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell Tissue Res.* *366*, 129–142.
- Zhang, J., Lian, M., Cao, P., Bao, G., Xu, G., Sun, Y., Wang, L., Chen, J., Wang, Y., Feng, G., et al. (2017). Effects of Nerve Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Promote Human Dental Pulp Stem Cells to Neural Differentiation. *Neurochem. Res.* *42*, 1015–1025.
- Zhang, N., Chen, B., Wang, W., Chen, C., Kang, J., Deng, S.Q., Zhang, B., Liu, S., and Han, F. (2016b). Isolation, characterization and multi-lineage differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Mol. Med. Rep.* *14*, 95–102.

Zhang, S., Zhao, C., Liu, S., Wang, Y., Zhao, Y., Guan, W., and Zhu, Z. (2018a). Characteristics and multi-lineage differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells derived from the Tibetan mastiff. *Mol. Med. Rep.* *18*, 2097–2109.

Zhang, W., Walboomers, X.F., Shi, S., Fan, M., and Jansen, J.A. (2006). Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. *Tissue Eng.* *12*, 2813–2823.

Zhang, X., Hirai, M., Cantero, S., Ciubotariu, R., Dobrila, L., Hirsh, A., Igura, K., Satoh, H., Yokomi, I., Nishimura, T., et al. (2011). Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J. Cell. Biochem.* *112*, 1206–1218.

Zhang, X., Zhou, Y., Li, H., Wang, R., Yang, D., Li, B., and Fu, J. (2018b). Intravenous administration of DPSCs and BDNF improves neurological performance in rats with focal cerebral ischemia. *Int. J. Mol. Med.* *41*, 3185–3194.

Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* *132*, 645–660.

Zhao, F., Qu, Y., Liu, H., Du, B., and Mu, D. (2014). Umbilical cord blood mesenchymal stem cells co-modified by TERT and BDNF: a novel neuroprotective therapy for neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* *38*, 147–154.

Zhao, X., Liang, M., Li, X., Qiu, X., and Cui, L. (2018). Identification of key genes and pathways associated with osteogenic differentiation of adipose stem cells. *J. Cell. Physiol.*

Zhao, Y., Wang, H., and Mazzone, T. (2006). Identification of stem cells from human umbilical cord blood with embryonic and hematopoietic characteristics. *Exp. Cell Res.* *312*, 2454–2464.

Zhou, S. (2011). TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* *112*, 1651–1660.

Zografou, A., Papadopoulos, O., Tsigris, C., Kavantzias, N., Michalopoulos, E., Chatzistamatiou, T., Papassavas, A., Stavropoulou-Gioka, C., Dontas, I., and Perrea, D. (2013). Autologous transplantation of adipose-derived stem cells enhances skin graft survival and wound healing in diabetic rats. *Ann. Plast. Surg.* *71*, 225–232.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4279–4295.

Metodologia

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Analisi estatistikoak

Emaitza guztiak batezbesteko \pm errore estandar bezala daude aurkeztuak. Alderaketa estatistikoak Mann Whitney U-ren testa, Student-en t-testa, Dunn-en post-hoc testarekin ostatutako Kruskal Wallis testa, edota Bonferroni eta Scheffe post-hoc probekin osatutako bide bakarreko ANOVA erabiliz egin ziren. Estatistika IBM SPSS Statistics v.22 programa erabiliz egin zen. Esangura estatistikoak * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ -tzat hartu da. Esperimentu independente kopurua atal bakoitzean dago adierazia.

Animaliak eta zelula txertaketak

c57bl6 xaguen kumaldi odolokide Nestina-GFP eta Swiss^{nu/un} timo-gabeak giza eta xagu zelulen txertaketetan hostalari bezala erabiltzeko izan ziren erabiliak. Ugaritzen fase aktiboan zeuden Nestina-GFP neurosferak edo DPSCs hortz-esferak bereizi eta Neurocult serum-gabeko ingurunean jaso ziren. 500.000 zelula/ μl -ko kontzentrazioko 2 μl injektatu ziren (0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$) aldebakarreko hurrengo koordenadetan (bregmatik aterata): AP = -1.9, L = -1.2, eta DV = -2 eta -2.1. Zelula transplantea 33G-ko orraztun (Hamilton, Bonaduz, Suitza) 10 μl -ko Hamilton xiringari loturiko animali txikientzako aparatu estereotaxikoa erabiliz burutu zen. Prozedura kirurgiko guztiak ketamina (75 mg/kg, Imalgen; Merial, Lyon, France) eta medetomidina (1 mg/kg, Domitor; Pfizer, Paris, France)-dun anestesia erabiliz egin ziren. Operazio ostean, astebetetz paracetamola (1.64 mg/mL Doliprane; Sanofi, France) eman zitzaizen edariarekin batera. Animaliak ur eta janariarekin *ad libitum* egon ziren kolonia isolatzaile gune berezietan. Hemen 19–22 C°-ko tenperatura egonkorra eta %40-50-eko hezetasuna zuten 12:12 orduko argi/ilun zikloekin batera. Animalia esperimentuak azaroaren 24-ko, 1986 (86/609/EEC) Komunitateen Kontseiluaren Zuzentarauak esandakoarekin bat egin zuten eta eskudun aginteak (Bizkaiko Foru Aldundiak) onartuak izan ziren.

Alizarina Gorria

Hazkuntzan hiru aste izan eta gero, zelulaz kanpoko hezur matrize metaketa kaltzikikatuak tindatu ziren Alizarina gorria erabiliz. DPSCs-ak 30 minutuz izan ziren fixatuak %10 formalinarekin (#F7503, Sigma, St. Louis, MO, AEB). Ondoren uretatik pasatu eta 4.3-ko Ph-dun 2 g/100 ml Alizarina S gorrian murgildu genuen 45 minutuz (#400480250, Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, AEB). Azkenik, PBS-rekin 5 minutuko 3 garbiketa egin ondoren, Alizarina gorriaren absorbantzia 450 nm neurtu zen Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek, Winooski, Vermont, AEB) irakurlean.

Fluxu zitometria

Miloi erdi DPSCs entzimatikoki bereziak CD90-FITC 1:50 (Biolegend, San Diego, California, AEB), CD105-PE 1:50 (eBioscience, Waltham, Massachusetts, AEB), CD73-APC 1:50 (eBioscience, Waltham, Massachusetts, AEB), CD45-APC 1:50 (Biolegend, San Diego, California, AEB) edo IgG2a κ Isotype control (Biolegend, San Diego, California, AEB) gehitutako %0.15 BSA-dun PBS soluzioan 40 minutuz izotzetan inkubatu ziren. Ondoren, DPSCs-ak % 0.15 BSA-dun PBS-arekin garbitu eta zelulak % 0.15 BSA-dun PBS 300 μ l-tan bersuspenditu ziren berriro. Hauek, Beckman Coulter Gallios (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, AEB) FACS.-a izan zen zelula markatuak kontatzeko eta hauen balioak erakusteko arduraduna. Flowing Software 2.5 (University of Turku, Finlandia) erabili zen analisiak egiteko.

gDPSC-en isolamendu eta hazkuntza

gDPSCs-ak giza 15 eta 40 urte bitarteko emale osasuntsuen hirugarren haginetatik izan ziren isolatuak, zeintzuk kontsentimendu informatua eman zuten. Hortzak mekanikoki apurtuak izan ziren eta hortz mamia entzimatikoki digeritua. Horretarako hortz mamiak 3 mg/ml kolagenasa eta 4 mg/ml dispasarekin (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, AEB) izan ziren tratatuak ordu batez 37C°-tan. 5 minutuz 15000 rpm-tara zentrifugatu eta gero, zelulak mekanikoki disoziatuak izan ziren 18G-ko orratz batekin (BD Microlance).

DMEM+ %10 BSF: DPSCs-ak 2 mM L-glutamina (Sigma, St. Louis, MO, AEB), penizilina 100 U/ml + estreptomizina antibiotikoak 150 μ g/ml (Gibco, Karlsruhe, Alemania) eta inaktibatutako %10-BSF-rekin osatutako DMEM (ingelesez, Dulbecco's modified Eagle's medium, Lonza, Basel, Suitza)-ean hazi ziren. Hazkuntza medio hau 2-3 egunero aldatzen da, eta 3 hilabete manten daitezke zelulak egoera optimoan, 6 pasetara helduz. Zelulen ugaritze eta mantenu aproposa bermatzeko ingurune aproposa da hau.

StemPro MSC SFM™ : Behin %10+DMEM hazkuntza konfluente dagoela, gDPSCs-ak STP deritzon, ondo definitutako hazkuntza ingurune batean hazi ziren aste betez. Hau, StemPro MSC SFM osagarria (Gibco, Karlsruhe, Alemania) 9:1 erlazioan eta penizilina 100 U/ml eta estreptomizina 150 μ g/ml (Gibco, Karlsruhe, Alemania) gehituz osatzen da. Mesenkimako zelula amentzako hazkuntza ingurune berezia da.

StemPro MSC SFM™ + DBDNF/NT3: STP ingurunean aste betez egon ostean, hau STP+NTF2 medioarekin ordezkatu zen. Honen formulazioa, goian aipatutako STP-ri 500 ng/ml BDNF

(Peprothec, London, EB) eta 20 ng/ml NT-3 (Peprothec, London, EB) gehitzean datza. Zelulak 7 egunez usten dira gehienez medio honetan hasten.

Neurocult™ hazkuntzarako *ingurunea*: DPSCs-ak hasierako digestio entzimatikoa izan eta berehala jartzen dira ingurune honetan. Hemen sortutako hortz-esferek auto-berritze ahalmena erakusten dute pase bakoitzean, ugaritzerako ingurune aproposa da hau. Giza Neurocult™ NS-A oinarritzko ingurunea (cat# 05750, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) eta Neurocult™ ugaritze osagarria 9:1 erlazioan (cat# 05753, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), Heparina 2 µg/ml soluzioarekin (cat# 07980, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), bitA gabeko B27-arekin (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, aeb), 20 ng/ml EGF-rekin eta 10 ng/ml FGFb-rekin (Peprothec, London, UK) elkartzean giza Neurocult hazkuntza ingurunea lortzen da.

gDPSCs desberdintzapen protokoloa

15000 cell/cm² zelula erein ziren estalitako eta estali gabeko kubreetan, protokoloaren arabera.

Desberdintzapen osteogenikoa: DPSCs-ak aurretik DMEM+ % 10 BSF/STP/STP+NTF2 hazi ziren, ondoren, hazkuntza ingurune bakoitza 20 µM β-glizerolfosfato (Sigma, G9422, St. Louis, MO, USA), 10 nM dexametasona (D4902, Sigma, St. Louis, MO, USA), eta 52 nM azido askorbiko (#100468, Merck, Darmstadt, Germany)–ekin hornitutako %10 BSF-dun DMEM-era aldatu zen hiru astez desberdintzapen osteogenikoak lortzeko.

Desberdintzapen neurogenikoa: Neurocult™ hazkuntzarako ingurunean 7 egunez egon ondoren, lortutako hortz-esferak bereizi eta lamininaz estalitako kubretxotan itsatsi ziren kasu honetan. Indukzio neurogenikoa, Neurocult™ desberdintzapenerako ingurunea erabiliz lortu zen. Hau, desberdintzapen osagarria 9:1 erlazioan (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), 2 µg/ml Heparina (Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), EGF 20 ng/ml, FGFb 10 ng/ml (Peprothec, London, EB) eta % 2 B27 (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, AEB)-kin zegoen osatua. Zelulak gutxienez 7 egunez hazi ziren medio honetan desberdintzapena ikusten hasteko.

Desberdintzapen endoteliala: Aurretik beste inongo hazkuntza ingurunetan egon gabe, DPSCs-ak zuzenean hurrengo ingurunean hasi ziren. Giza Neurocult™ NS-A oinarritzko ingurunea (cat# 05750, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada) eta Neurocult™ ugaritze osagarria 9:1 erlazioan (cat# 05753, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), Heparina 2 µg/ml soluzioarekin (cat# 07980, Stem Cell Technologies, Vancouver, Kanada), bitA gabeko B27-

arekin (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, aeb), 20 ng/ml EGF-rekin eta 10 ng/ml FGFb-rekin (Peprotech, London, UK) elkartzean giza Neurocult hazkuntza ingurunea lortzen da. Gure emaitzek medio honek DPSCs-ak zelula endotelial bilaka ditzaketela erakutsi dute. Desberdintzapen protokolo honek lamininaz estalitako kubreetan eraginkortasuna erakutsi du eta baita estali gabeko hartz-esfera moduko egitura hazkuntzetan.

NSCs hazkuntzak

Nestina-GFP xaguetatik, PBS-sakarosa hotzarekin hipokanpoak atera eta 6 hobiko plaketan edo T25 atxikimendu baxuko matrizean erein ziren, heparina (2 mg/ml), EGF (20 ng/ml; Invitrogen) eta FGF2 (10 ng/ml; Invitrogen)-rekin hornitutako Neurocult™ hazkuntzarako ingurunean. Hauek %5 CO₂-a zuten eta 37C°-ko tenperatura baldintza egonkorretan mantendu ziren. Lortutako neurosferak 7 egunero akutasarekin (Sigma, St. Louis, MO) entzimatikoki bereiztu ziren.

PCR konbentzionala eta denbora-errealeko PCR kuantitatiboa (qPCR)

iScript cDNA Kit (BioRad, 1708890) erabiliz extraitutako RNA totalaren alderantzizko transkripzioa egin zen cDNA (20 ng/μl). Hurrengo errektiboak erabili ziren 20 μl-ko bolumen finala lortzeko: iScript reverse Transcriptase (1μl), 5x iScript Reaction Mix (4μl) eta Nuclease Free water (aldagaia). Gene adierazpen konparaketa egiteko, 0.5 μl primer eta laginen 3 ng/μl kontzentrazioa nahastu ziren Power SYBR® Green PCR Master Mix 2x (4367659, Applied Biosystems™)-ekin, ondoren, CFX96 touch real-time Detection System (BioRad) erabili genuen geneen adierazpenaren balioak jasotzeko. 10 μl final lortu ziren, cDNA-ren a 4 ng/μl, 0.8 μl primer eta My Taq™ Red Mix (Bioline, BIO-25043)-ekin nahastuz. Lortutako produktuen luzeera %2 agarosa gelean elektroforesia eginez detektatu genuen. Erreakzio guztiak era hirukoitzean egin ziren eta gene bakotitzaren adierazpen erlatiboa 2^{-ΔΔCt} erabiliz ezagutu zen. Erabilitako primerrak, berriz, Primer-Blast method (Primer Bank)-tik edo beste lan batzuetik hartu ziren.

RNA ekstrakzio eta alderantzizko transkripzioa

Hazkuntza desberdinetako zelula pelletak PBS-rekin garbituak, tripsinizatuak (T1426, Sigma) eta 5 minutuz 1500 rpm-tara zentrifugatu ostean, hauek -80C°tan izoztu ziren erabili behar ziren arte. RNA ekstrakzioa RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania)-aren argibideak jarraituz

egin zen. RNA kontzentrazioa Nanodrop Synergy HT (Biotek, Winooski, Vermont, AEB) makinarekin lortu zen eta purutasuna 260/280nm absorbantzia ratioa kalkulaturaz jakin genuen. RNA-ren alderantzizko transkripzioa fabrikatzaileen argibideak jarraituz extrahitutako RNA-ren 1000 ng iScript cDNA Kit (1708890, Biorad, Hercules, California)-ean erabili ziren.

Western blot-a

Lagin guztietan kontzentrazio parekoa lortzeko, 20.000zelula/ μ l-ko kontzentrazioan birsuspenditu ziren zelulak proteasa (11873580001; Roche) eta fosfatasa (78420; Thermo Scientific) inhibitzaileekin osaturiko RIPA lisi bufferean (R0278, Sigma, St. Louis, MO). Hemendik, LDS laginentzako bufferarekin (NP0007; Invitrogen by Life technologies) hornitutako RIPA 30 proteina μ g diluitu ziren. Ondoren, laginak 5 minutuz 95C° tan berotu eta %4–12 Bis-Tris NuPAGE geletan (NP0322BOX; Novex by Life Technologies) kargatu ziren. Elektroforesirako NuPAGE migrazio bufferra (NP001; Novex by Life Technologies) erabili zen. Proteinak transferitzeko nitrozelulosazko mintzak (LC2000; Invitrogen by Life Technologies) eta NuPAGE tranferentzia bufferrak (NP0006-1; Invitrogen by Life Technologies) erabili ziren XCell Sure Lock Electrophoresis makinarekin (NP0007, Novex, Life Technologies) batera. Ponceau (P7170-1L, Sigma St. Louis, MO) tindaketa kargatze kontroltzat erabili zen, kargaturiko bandetan proteina antzemateko. ERK-fosforilatua eta ERK total antigorputzak (biak 1:1000, #4370 eta #4695 hurrenez-hurren, Cell Signaling Technologies) eta Stat3-fosforilatua eta Stat3 (biak 1:1000, #9145 eta #9132, hurrenez-hurren, Cell Signaling Technologies).

Zelula biziko kaltzio irudiak

gDPSCs-ak kubre kristaltxotan izan ziren ereinak eta hazten eta beharrezko kontaktuak egiten utzi zitaien zelulei 7 egunez. 5 μ M fura-2/AM edo 2 μ M fluo-4/AM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, AEB) 37 C°-tan inkubatu ziren zelulekin 60 minutuz. Berehala, kubretxoak fluxu ganbaran (Warner Instruments) ezarri ziren giro tenperaturan 10 mM Hepes-arekin hornitutako HBSS (ingelesez, Hank`s balanced salt solution, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, AEB) emari egonkorrekin. Zelulak 340 eta 380nm-ko luzerako argiekin kitzikatuak izan ziren aldizka, eta 510nm-tik gorako argi emisioa jaso zen. F340/380 ratioa erabili zen [Ca²⁺] zitoplasmatikoa neurtzeko. Fluo-4-rako 488 nm kitsikapen bakarra egin zen eta emisioa 520 nm jaso eta $\Delta F/F$ eran izan ziren balioak analisatuta, non $\Delta F = F - F_0$. F agonista duen soluzioaren fluoreszentsia intentsitatea da, F₀ soluzio kontrolaren intesntsitatea den

bitartean. Grabazioa Olympus IX71 mikroskopioari instalatutako C10600-10B Hamamatsu kamerari esker izan zen posible. Datuen analisisa eskuz aukeratutako intereseko guneak erabiliz egin zen atzeko guneen kenketa eginez Fiji software bitartez. Emaitzak hazkuntza ingurune desberdinetan hazitako 3-4 paziente zelulen grabazioan daude oinarrituta.

Zelulen hazkuntzen eta garun xerren immuno-tindaketa

Animaliak sakonki anestesiatuak izan ziren %2.5 Avertinarekin, ondoren, bihotz bidezko pH 7.2-ko 0.1 M sodio fosfato soluzioan %4 paraformaldeidoa daraman perfusioa egin eta laginak prozesatu ziren. 48 C°-tan gau-osoko post-fixapena egin ondoren, burmuinak agarosa murgildu ziren eta VT 1200S vibratomoa erabiliz (Leica, France) 20µm laginak lortu genituen. Xagu burmuinean modifikatu gabeko giza DPSCs-ak detektatzeko antigorputz espezifikoa erabili genituen human Nestin (MAB1259, 1:200 R&D systems) eta giza CD31 (BBA7, 1:200 R&D systems). Burmuineko baskulatura CD31 (550247, 1:300 BD Pharmingen), laminin (L9393, 1:200 Sigma, St. Louis, MO), eta VEGF (ABS82-AF647, 1:200 Sigma, St. Louis, MO) antigorputzekin tindatu ziren. Hazkuntza zelularrak nahi izandako denboraz hazi ostean, hauek gela tenperaturan 10 minutuko % 4-ko PFA-n inkubatuz fixatu ziren. Ondoren % 0.1 Triton X-100-ekin permeabilizatu eta gau osoa 4C°-tan hurrengo antigorputzik primarioekin utzi ziren: Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) (MAB3402, 1:400; Millipore, Lake Placid, NY), Nestin (NES, 1:200 Aves Labs), S100β (Z0311, 1:1000, Dako, Glostrup, Danimarka), NeuN (EPR12763, 1:200; Abcam, Cambridge, EB), Doblekortina (DCX) (sc-8066, 1:200; Santa Cruz, Dallas, TX, AEB), CD31 (550247, 1:300 BD Pharmingen, San Jose, CA , AEB), Anti-STAT3 (phospho Y705) antigorputza (1:500, ab76315, Abcam), anti-human-CD31 (1:200, F8402, Sigma St. Louis, MO), VEGF (ABS82-AF647, 1:200 Sigma, St. Louis, MO) eta laminina (L9393, 1:200 Sigma, St. Louis, MO). Hazkuntza zelularrak zein ehun sekzioak, Alexa 488, 568 and 647-ri lotutako xagu, untxi eta ahuntz aurkako asto antigorputz sekundarioekin inkubatuak izan ziren 2 orduz eta 30 minutuz giro tenperaturan, hurrenez-hurren. Prestakinak DAPI-rekin tindatu ziren nukleoak ikusi ahal izateko eta Leica SP8 mikroskopio konfokalean atera ziren argazkiak x40 handipenetan.

Hipotesia

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Zelula ama mesenkimalen (ingelesez, mesenchymal stem cells, MSCs) ezaugarri angiogeniko, neuro-babesle, hantura kontra eta erakutsitako pluripotenzialitateak, nerbio ehunetako birsortze entsaiotan zelula hauek erabiltzea idea ona izango litzateke. Halabaina, hazkuntza eta desberdintze medio gehienek BFS daramatzate konposatu bezala, honela, terapia zelularretan bete beharreko FPO eskatzen duten eskakizunetako batean huts eginez. Gainera, MSCs-ek bi arazo eragozpen azaltzen dituzte neuro birsorkuntza terapiatan erabiltzeko. 1) ez dute inongo erlaziorik ektodermoarekin, nondik garapenean zehar zelula neuralak garatuko diren eta 2) sarritan esku-hartze gogorrek beharrezko izaten dira zelula hauek eskuratzeko.

Beraz, gure hipotesiak gDPSCs-en GN-ko jatorria eta ezaugarri ektomesenkimalak kontuan izanda, serum gabeko hazkuntza inguruneak erabiliz desberdintzapen protokolo eraginkor eta seguruagoak lortzea errazagoa izango litzatekela dio. Protokolo hauen eraginkortasunak eta gDPSCs-en eskuragarritasunak nerbio ehuneko birsortze terapia zelularretan erabiltzeko benetan apropos bihurtzen dituzte

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Helburuak

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Lan honen helburu nagusia serum gabeko, seguru, eraginkor eta transplanteetan erabilgarriak diren neurodesberdintzapen protokoloak testatzea eta hobetzea da, horrela inolako eraldaketa transgeniko ez epipenetikorik jasan ez duten gDPSCs-ek duten ahalmen neurogenikoa probatzeko.

3.1. Helburu Zehatzak

1. Serum gabeko STP ingurunean, zelula ama mesenkimalentzako medio berezia, hazitako gDPSCs-en karakterizazio ektomesenkimalak
2. DMEM + FBS 10% eta serum gabeko STP- hazitako gDPSCs-en arteko hazkuntza ezaugarri eta ezaugarri morfologikoen arteko konparaketa.
3. DMEM + FBS 10% eta serum gabeko STP- hazitako gDPSCs-en neurotrasnmisore hartzaileen eta boltai menpeko kaltzio kanalen funtzionaltasuna frogatzea.
4. Neurodesberdintzapen protokolo berri bat diseinatzea serum gabeko STP-ak sustatutako aldaketetatik onura ateraz.
5. Hazkuntza ingurune desberdinetan hazitako gDPSCs-ek duten ahalmen neuro/glio-genikoa ezagutzea.
6. Neurocult™ hedapenerako medioan, NSCs-entzako medio berezia, hazitako gDPSCs-en ahalmen ektomesenkimal, endotelial and neuro/glio-genikoaren azterketa.
7. Neurocult™ desberdintzapenerako medioan, NSCs-entzako medio, berezia hazitako gDPSCs-en ahalmen ektomesenkimal, endotelial and neuro/glio-genikoaren azterketa.
8. *In vivo* xaguen burmuinean txertatutako gDPSCs-ek erakusten duten ehun integrazio, gaitasun neuro/glio-genikoa eta baskulogenesi ahalmenaren azterketa.

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Emaitzak eta Eztabaida

I.atala: *Hortzetako zelula amak bio-ingeniaritzan erabiltzeko tresna balioanitzak eta kranio-aurpegi-masailletako ehunen birsortzea. (Berrikuspena)*

II.atala: *Ingurune neurogenikoan hazitako giza hortz muineko zelula amen desberdintzapen endoteliala eta xagu burmuinean neo-baskulogenesiaren sustatzea. (Ikerketa artikulua).*

III.atala: *BDNF eta NT3-a serum gabeko ingurunean hazitako hortz muineko zelula amak gandar neuraleko progenitore neurogeniko eta gliogenikotara berprogramatzeko gai dira. (Ikerketa artikulua).*

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Eztabaida Nagusia

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Nerbio ehuna mindu dezaketen kondizioak AG eta PG neuro-endeKapen gaixotasunetatik mintze traumatikoraino doazen gaixotasunak barneratzen ditu. Adibidez urtero, 250 000 eta 500 000 pertsonen bitartean jasaten dute BEML Munduko Osasun Elkartearen (MOE) arabera. Horrelako lesioek beraiekin intzidentzia altua, tratamendu eraginkorren hutsunea, ezgaitze izaera eta hemendik eratorritako zama ekonomiko zein sozialek, (Lopez, 2011) lehenetasun bilakatzen dute terapia neuro-birsortzaileen diseinu eta garapen beharra.

Azkenengo urteotan ikerketa lan askok deskribatu dute zelula ametan fokotutako estrategia berritzaileak endekatutako zein apurtutako nerbio ehunetan. Zuntz nerbiosoen berreraikuntza lortzeko erabilitako zelula neural berriak sortzeko biderik onena NSCs-ak izan beharko balira ere (Steward et al., 2013) , giza gorputz helduan aurki daitezkeen NSCs-en kantitate urriari hauek lortzeko zailtasun latza gehitzean, terapia zelular autologoetan erabilgarritasuna asko murrizten da.

Giza gorputz helduan aurkitu daitezkeen zelula ama ezagun eta eskuragarrienak bezala dira deskribatuak MSCs-ak. Hauek hezur muinetik, zilbor hestetik, ehun adiposotik eta hortz egituretatik izan daitezke isolatuak, beste hainbat lekuren arten (El Omar et al., 2014). Ohiko MSCs-ak erabiliz BEML osatzeko terapia eraginkorrak badaude ere (Vaquero et al., 2018), DPSCs-en erabileraren garrantzia asko handitu da neuro-birsortzean azkenengo urteetan. GN-tik eratorritako NSP-rekin partekatutako jatorriak, azaldutako izaera ektomesenkimalak zein hauen eskuragarritasun handiak, birsorkuntza saiakera berritzaileetan erabiltzeko baliokideak direla iradokitzen du (Aurrekoetxea et al., 2015).

gDPSCs-en hazkuntza eskurik esku joan da BSF-ren osagarritasunarekin, hau animalia jatorria duten elikagai, faktore eta elementu ez ezagunez dago osaturik. Serum-aren erabilerak hazkuntza ratio eta hazkuntza denbora luzeagoak lortzea eragiten du. Hala ere, %10-20 BSF-rekin osatutako inguruneen erabilera zelula amen izaera mesenkimalaren sustatzearekin dago erlazionatuta. Izan ere, lehenago argitaratutako zenbait lanek BSF-ren kontzentrazio altuekin denbora luzez tratatu ostean bapateko osteo/odonto- desberdintzapena jasateko joera zutela erakutsi zuten (Pisciotta et al., 2012; Yu et al., 2010). Honetaz aparte, erreakzio immunea eta alergia, serum xenogenikoaren erabilerarekin zuzenki erlazionatzen zituzten lanak ere izan ziren argitaratuak (Gregory et al., 2006; Horwitz et al., 2002). Serum erabileraren eragozpen guztiak kontuan izan da, honen erabilera ez egokitzat hartu daiteke birsortze terapietan.

Ikerketa lan hau giza zelula terapietan erabilgarriak diren zelulak lortzeko serum gabeko hazkuntza ingurune komertzialen garapen, diseinu eta frogapenean zentratzen da.

NeurocultTM eta StemPro MSCTM (STP) serum gabeko hazkuntza inguruneak erabili ditugu, gDPSCs-ak hazteko, normalean erabiltzen den DMEM+ %10-20 BSF-aren ordez. Bai

NeurocultTM zein STP-a mota zelular espezifikoak hazteko erabili ohi dira. Horrela, NeurocultTM -a NSCs-en *in vitro* hedapenean erabiltzen dat, STP berezeki giza zelula ama mesenkimalen hazkuntzarako erabiltzen den bitartean.

Serum gabeko inguruneen erabilera ez da oraindik oso hedatua gDPSCs-en hazkuntza, isolamendu eta desberdintzapenean. Hala ere, argitaratuta dauden lan urriek aski argitu dute hazkuntza eta desberdintze protokolo berrikoiek dakartzaten onurak. Horrela, era askean NeurocultTM eta STP hazkuntza inguruneak erabiliz lortu ditugun emaitzek (II. Eta III.atalak, emaitzak eta eztabaida) Hirata et al.-ek lehenengo aldiz azaldu zuten ondorioarekin, serum gabeko inguruneetan zelulen biziraupenarekin, alegia, bat egiten zuten (Hirata et al., 2010). Gainera, bi hazkuntza ingurune hauetan, ziur aski BSF-aren absentziaren ondorioz, hazkuntza ratioa jeisten zela ere erakutsi genuen. Hortik haratago, gure taldeak gDPSCs-ek 3D moduko egitura esferoideetara jasandako aldaketa karakterizatu zuen. Hartz-esfera deituriko egitura esferoide ez itsaskor hauek, GN-ko zelula amek eta NSCs-ek *in vitro*, eraturako egitura esferoideen oso antzerakoak dira (Fournier et al., 2016; Lee et al., 2007a; Reynolds and Weiss, 1992). Honek, Bonnamain et al.-ek deskribatutako emaitzekin bat egiten badu ere, gure bi lanetan lortutako emaitzek hartz-esferen eraketa efizienteagoa iradokitzen du, guk lortutako hartz-esferen ia %100 -koaren eraketa Bonnamain et al.-ek lortutako %30-ekoarekin konparatuz (Bonnamain et al., 2013).

Hemen jasotako lan bakoitzean hazkuntza zelularra zein markatzaile batzuen adierazpena, erabilitako hazkuntza egoeraren arabera aldatu daitekeela erakutsi badugu ere, aztertu genituen gDPSCs-ek markatzaile mesenkimal eta GN-eko markatzaileen adierazpen patroia berdintsua zutela erakutsi genuen. Aztertutako hedapenerako hiru hazkuntza inguruneek; hedapenerako NeurocultTM, STP eta DMEM + %10 BSF espero gabeko azalerako mesenkimal ama CD73, CD90 eta CD105 markatzaileak adierazi zituzten (ez dira daturik aurkeztu hedapenerako NeurocultTM-tzat). Gainera, Nestina eta GFAP balore berdintsuak ikusi genituen landutako hiru hazkuntza ingurune eta baita NSCs kontrol positiboan ere. Markatzaile eta ezaugarri guzti hauek GN-tik eratorritako zelula ama mesenkimalek erakutsitako patroiarekin egiten dute bat. Izan ere, jada deskribatua dago GN-eko progenitoreen presentzia gune peribaskularretan kokaturik hartz muin barruan (Janebodin et al., 2011; Kaukua et al., 2014). GN zelula amak leinu neuraletara bideratu daitezke, NSP-ko zelula glial eta neuronalak sortuz, edota leinu ektomesenkimaleko bidea har dezakete, enbrioiaren garapenean zehar masail-aurpegiko egitura gehienak eratuko dituen ehun konektibo berezia sortuz (Aurrekoetxea et al., 2015).

Behin, NeurocultTM erabilita GN-tik eratorriko EMSCs-ak lortu ostean, zelula hauek neurobirsorkuntza terapietan izan dezaketen potentzialaz ohartu ginen. Hau kontuan izan da,

STP-ren, giza zelula ama mesenkimaletzako hazkuntza ingurune espezializatua, erabilerak logikoa zirudien EMSCs-ak lortzeko. Ingurune hau erabiliz ez genuen bakarrik GN-eko zelula amen (ingelesez, neural crest stem cells, NCSCs) lorpena haunditu, Neurocult™ erabiliaz lortutako progenitore neural edo endotelial izateko jada konprometituta dauden zelulak lortu beharrean NCSCs huts edo aratzagoak lortzeko ere gai izan ginen.

Neurocult™ eta STP-n hazitako gDPSCs-ek hortz-esfera berdintsuak eratzeko gai baziren ere, bi protokolo hauek ezaugarri desberdinak eransteke kapazak dira. Alde batetik, STP-n hazitako gDPSCs-ek ustekabeko *NTRK2* eta *NTRK3* gain adierazpena zutela aurkitu genuen. Bi hartzaile hauek *aktibitate tirosina kinasa* duten hartzaileen familiaren barne daude eta ama zelula neuraleen fisiologia eta aktibitate zelularrean garrantzitsuak ei dira, desberdintzapen eta biziraute neuronalean besteak beste (Bibel and Barde, 2000; Oliveira et al., 2013). Dakigun arte, gu izan gara gDPSCs-tan hartzaile hauen adierazpena frogatu duen lehen taldea. Lehenago STP-n haziak izandako gDPSCs-ak 7 egunetz BDNF eta NT3-ren, NTRK2/TrkB eta NTRK3/TrkC hartzaileen lotailuak hurrenez hurren, presentzian jarri ondoren, NTRK2 eta NTRK3-k homeostasi eta desberdintzapenean izan zezaketen garrantzia proposatu zen. Gainera, aldaketa molekular eta fisiologikoen, proliferazioaren hazkuntzak, “amatasun” *NANOG*, *SOX2* eta *OCT4a* markatzaile pluripotenzialen gain adierazpenak eta GN-eko zelula amen *HNK1* and *p75^{NTR}* markatzaileen gain adierazpenak, neurotrofina exogenoak gehituz gDPSCs-en leinuan NCSCs primitiboetarantz atzera pausu bat eman zela iradokitzen arrazoiak izan ziren.

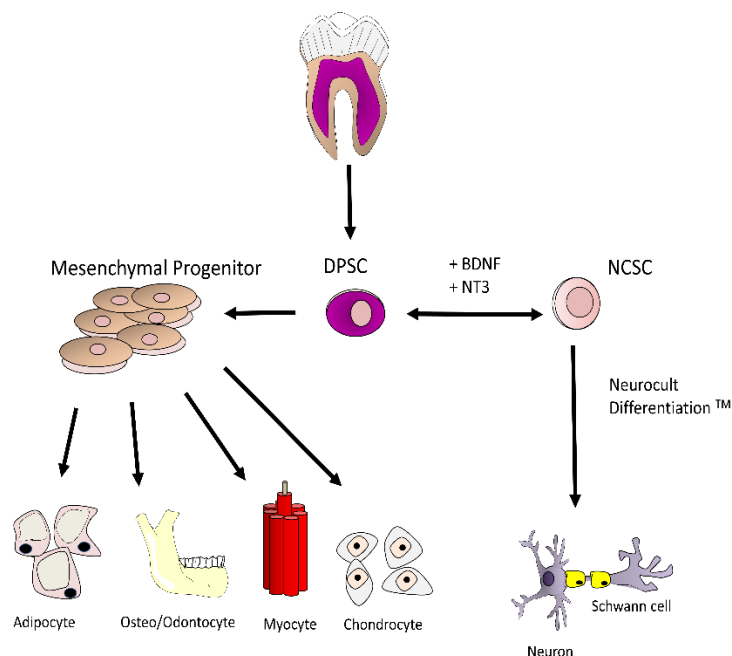
Bestalde, oinarritzko markatzailetatik aparte Neurocult™ ereindako gDPSCs-ek ez zuten goian aipatutako NCSCs-en antzeko aldaketarik jasan. Baina, VEGF eta CD31 markatzaile endotelialak adierazteko gai izan ziren bai laminan itsatsirik zein suspentsioan, nolabaiteko desberdintzapen edo aukerapena iradokiz.

Ziur aski DMEM+ %10 BSF-ean hazitako gDPSCs-ak ere badute NCSCs-rekin antzekotasuna. Xiao eta Tsutsui-k diotenez, zelula heldu eta progenitorez daude osaturik hasieran hortz-esferak, baina denbora joan ahala hortz-esferen egitura itxiak eragindako hipoxiak serum gabeko inguruneak eragiten duen gosetearekin batera, zelula konprometitu helduen heriotza eragiten dute. Zelula amek eta zelula ama neuralek baldintza hipoxikotan biziraun dezakete, eta are gehiago, gDPSCs-ak kitzikatuak dira baldintza hipoxikotan (Xiao and Tsutsui, 2013).

Neurobirsorkuntzan bilatzen den xedeetako bat patologia edo lesioen ondorioz gertatutako zelula neuronalen berrezartzea da. Giza nerbio sistema helduan dauden neurona kantitate izugarriak sortutako konekzioak erronka gogorra bihurtzen dute neurobirsortzea ikertzaileentzat. Orokorrean, gDPSCs-ek zelula neuronal eta glialetara desberdintzeko duten

ahalmena frogatu dugu lan hauekin. Erabilitako ingurunean arabera desberdintzapena zuzena ala zeharkakoa izan daiteke.

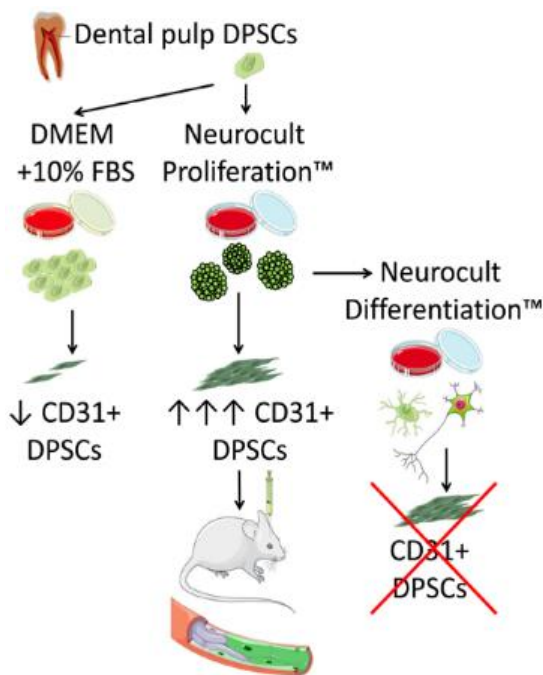
Gorago komentatu den bezala, gDPSCs-ak 7 egenez BDNF eta NT-3-z konposaturiko STP ingurunean haztean, NCSCs-en zelulak lortu ziren nolabaiteko dedesberdintzapen prozesu bat eman zelarik. GDPSCs ektomesenkimaletatik GN zelula ama lortzeko birprogramazio funtzioanala eman ote zen berresteko zelula hauek zelula neuraletan bihur zitezkeen testatu genuen. Jada badago deskribatuta desberdintzapen patua serum presentzia edo absentiaren arabera alda daitekeela. Izan ere, guk DMEM + BSF %10-en hazitako gDPSCs-etatik ondorioztatu bezala, serum presentziak NCSCs-en izaera ektomesenkimala sustatzen du (Lee et al., 2007a). Lehenago BSF-ren presentzian egondako gDPSCs-ak DMEM + %10BSF eta STP inguruneetan haztean izaera mesenkimala aurkezten jarraitzen zuten BDNF eta NT-3 gehitu arte. Hauek gehitu eta gero NC markatzaileak eta markatzaile pluripotenzialen igoera bat ikusi genuen. Igoera hau era berean “amatasunaren” handitzearekin dago lotua (Uribe-Etxebarria et al., 2017). GN-eko progenitoreek eta zelula ektomesenkimalek dituzten ezaugarriek hauek zelula desberdinetan desberdintzea eragiten dute. Horrela, gDPSCs-ak BDNF/NT-3-rekin tratatu eta gero ez zirela gai osteoblasto edota hezur matrize mineralizatua sortzeko ikusi genuen ingurune hezur bideratzailean, DMEM + %10 BSF-ean hazitako zelulek berriz bideratze osteogeniko argia zutela antzeman genuen. Neurotrofinekin tratatzean gDPSCs-ek konpromesu mesenkimala galtzeaz gain ahalmen neurogeniko handia areagotzen zuten desberdintzapenerako Neurocult™ ingurune neurobideratzailean haztean. DMEM + %10 BSF-ean ereindako emaile bereko gDPSC-ek bost aldiz gehigo adierazi zituzten markatzaile neuronal (NeuN, DCX) eta glialak (p75^{NTR}, S100β). Lortutako emaitzek bultzaturik, NCSCs populazio funtzionala areagotu dezakeen hazkuntza protokoloa diseinatzeko lehenak izan ginela esan dezakegu. Hau, desberdintzapen ez zuzen bezala deskribatu daiteke, leinu neuraleko zelulak lortzeko behar diren pausu kopurua dela eta (1.irudia).



1. Irudia. “BDNF eta NT3-a serum gabeko ingurunean hazitako hortz muineko zelula amak gandor neuraleko progenitore neurogeniko eta gliogenikotara berprogramatzeko gai dira”-en irudi laburpena (III. atala).

Neurocult™ desberdintzapen ingurunean, NSCs-ak zelula heldutara desberdintzeko erabiltzen den hazkuntzarako Neurocult™.-aren aldaera, hazitako gDPSCs-en kasuan, NSCs-ek azaldutako ahalmen neurogeniko antzerakoa erakutsi zuten. Bitamina A-dun B27-a gehiturik zuen desberdintzapenerako serum gabeko Neurocult™-an aste bete hazi ondoren, gDPSCs-ak NeuN eta DCX adierazten hasi ziren. Era berean izan ziren adieraziak GFAP eta S100b. Ez zen desberdintasun estatistiko esanguratsurik aurkitu NSCs-ek erakutsi zuten markatzaileen adierazpen baloreekin. Lortutako emaitzek desberdintzapenerako Neurocult™ –ean hazitako gDPSCs-ek ahalmen neurogeniko zuzena dutela iradokitzen dute (2.irudia).

Aski onartua dago zelula neuronalen ordezkapenaren garrantzia neurobirsortze terapietan, hala ere, arazo neurologiko batzuk ez daude zuzenki galera neuronalarekin erlazionaturik baizik eta irrigazioarekin. Horrela, Takahashi et al. lehenengo aldiz EPCs eta zelula amak erabili zituztenetik gaixotasun iskemikoan baskulogenesia sustatzeko (Takahashi et al., 1999), angiogenesiaren eta baskulogenesiaren paperaren garrantzia handitzen joan da zenbait gaixotasun neuraletan, MI-an eta iskemian, besteak beste (Tatullo et al., 2015). Jada berretsitako potentzial neurogenikotik at, gDPSCs-ek zuten leinu endotelialera desberdintzeko ahalmena ezagutu nahi genuen. Zelula endotelial baskularrak lortzen zituzten zenbait lan bazeuden ere, hauek %10 serum-aren presentzian zeuden haziak edota, serum gabeko protokoloa ez zegoen giza zelulentzako prestatuta (d’Aquino et al., 2007; Weiss et al., 1990). Gu izan gara serum gabeko baldintzetan gDPSCs-tatik zelula endotelial baskularrak lortu dituen lehen taldea. Desberdintzapenerako Neurocult™ –a erabiliz zelula neurogenikoak lortzeko gai izan bagara ere, vitamina A gabeko B27, EGF eta bFGF-ez ornituriko hazkuntzarako Neurocult™-a erabiltzean VEGF eta CD31 markatzaile endotelialak adierazteko gai ziren zelulak lortu genitzakelaz konturatu ginen. Hazkuntzarako Neurocult™-an lortutako STAT3 eta ERK-en aktibazioaren berri emateaz gain hauen garrantzia ere azpimarratu genuen gDPSCs-en desberdintze endotelialean. Gure emaitzak guztiz bat datoz beste talde batzuen ondorioekin, non ERK-ek angiogenesisian duen garrantzia (Xu et al., 2008) eta fosfo-STAT3-k VEGF-aren gainadierazpenarekin (Niu et al., 2002) eta zelula endotelialen aktibazioarekin (Chen et al., 2008) duen erlazioa azaltzen diren. Haratago joanda, Bento et al.-ek ERK-en aktibazioaren ondorioz SHED-ek jasandako desberdintze endoteliala, VEGF bitarteko VEGFR2-ren kitzikadurarekin lotu zuten (Bento et al., 2013). Emaitza hauek kontuan izanda gDPSCs-tatik zelula endotelialak sortzea lortu genuela ondorioztatu daiteke (2. irudia).



2. Irudia. “Ingurune neurogenikoan hazitako giza hortz muineko zelula amen desberdintzapen endoteliala eta xagu burmuinean neobaskulogenesiaren sustatzea” –en irudi laburpena (II. atala).

Lan honetan zehar hainbat aldiz aipatu den bezala, hamaika lan daude literaturan garrantzia handiago ematen diotenak aktibitate neurobabesleari zelula-zelula zaharberritzeari baino (Ratajczak et al., 2016; Song et al., 2017). Mead et al.-ek esandakoarekin bat eginez guk ere frogatu genuen *NGF*, *BDNF* eta *NT-3*-ren adierazpena gDPSCs-tan (Mead et al., 2014b).

In vitro jasotako emaitza guzti hauek oso itxaropentsuak dira protokolo hauek gizakien terapia zelularretan erabiltzeko. Hala ere, zelula hauek *in vivo* eredutan izan dezaketen jarrerak guztiz aldatu lezake aurreko planteamendua. Izan ere, desberdintzapenerako Neurocult™-an hazitako gDPSCs-ak markatzaile glial eta neuronalak adierazteko gai baziren ere *in vitro*, ezin izan genuen inolako markatzaile neuralik aurkitu gDPSCs-en *in vivo* gazezur barneko txertaketaren ondoren. Seguraski sistema immune espezifikoa kendu zituen gDPSCs neurodesberdindu guztiak (ez da daturik erakusten). Bestalde, hilabete baten buruan CD31⁺ Nestin⁺ VEGF⁺ ziren gDPSCs-ak aurkitu genituen xagu biluzietan egindako txertaketa intrakranialetan. Nestina (Suzuki et al., 2010), VEGF (Ferrara et al., 2003 eta lamininaren (Malinda et al., 2008) areagotzeak angiogenesiaren bereizgarritzat hartzen dira. Laminina %50-ean jaisten da zahartzearekin erlazonaturiko arazoetan (Gavazzi et al., 1995) eta TGF- β azpierregrulatu dezake zelula epitelialetan (Streuli et al., 1993), zein zahartzean gune neurogenikoaren kieszentzian inplikatur dagoen (Pineda et al., 2013). $\alpha\beta$ amiloide zuntzekak depolimerizatzeko ahalmenak, lamininaren degradazioak burmuineko iskemian eta lamininaren aldakuntzak NSZ-ko lesioetan, lamininak duen garrantziaz konturatzea egin zigun. Ondorioz, hortz esferetatik eratorritako eta ondoren xagu immunokonprometituen burmuinean txertatutako

gDPSCs-ek eragindako laminina igoerak onuragarriak izan daitezke gaztetze eta neuroendekapen gaixotasun terapietan (Bronfman et al., 1996; Fukuda et al., 2004; Ji and Tsirka, 2012).

STP-n ereindako gDPSCs-en kasuan, zelula hauek ingurune berrietara egokitzeko duten ahalmena, hots, ehunetan integratzeko duten gaitasuna ebaluatzea ezinbestekoa da. Ehun ostalarian kanpoko zelulen txertaketa aproposa izan dadin, garrantzi handikoak dira elkarrekintza funtzional berrien eraketak eta ehun hostalariarekin informazioa trukatzeko ahalmena (Guerzon et al., 2011; Muschler et al., 2004). Lanean zehar aipatutako gDPSCs-en NCSCs izaera BDNF eta NT-3-aren erabilerari esker lortu dira, bi hauek nerbio sisteman askatzen diren elementu ohikoenak izanik. NCSCs-erantz atze pausua emanaz birprogramaturiko gDPSCs-ak erabiltzea baino, hobea izango litzateke STP hutsean hazitako zelulekin lan egitea. Horrela, kanpoko neurotrofinak erabiltzea sahiestuko genuke, gainadierazitako *NTRK2* eta *NTRK3* hostalariaren barne neurotrofinekin aktibatuz. Neurotransmisoreak dira zelula arteko komunikazioen elementu nagusiak nerbio ehunean. Esate baterako garapenean zehar GABA eta glutamatoa ezinbestekoak dira konekzio sinaptikoen eraketarako (Ben-Ari, 2001; Egorov and Draguhn, 2013). Neurotransmisore desberdinen aurrean zuten erantzunaren ezagupena beharrezkoa zen gDPSCs-ek ehun ostalariarekin izan zitzakeen elkarrekintza motak aztertzeke, alegia, ehunaren funtzionamendu aproposa sustatuko duten komunikazio koordinatuak sortzeko. Ustekabea, STP-n hazitako zeluletan, gainadierazita dagoen eta ATPyS agonistarekin testatu genuen hartzaille purinergikoa, *P2XR7*, albo batera utzita, hartzaille ionotropikoen azpiunitateen adierazpen berdintsua ikusi genuen ikusi DMEM+ % 10 BSF eta STP inguruneetan. gDPSCs-en agonista batzuekiko kitzikagarritasuna argi eta garbi frogatu genuen kaltzio mikrofluoreszentzia entsaioen bitartez. Neurotransmisoreen hartzailleak adierazteaz gain, bi hazkuntza inguruneetan hazitako gDPSC-ak Ca^{+2} uhinen hedapenaren erantzuleak diren, garapenean zehar ematen den nerbio ehunaren ezaugarri bereizgarri bat, Konexina (Cx26, Cx43) eta Panexinen (Pnx1) azpiunitateak adierazteko ere gai dira (Bruzzone et al., 2003; Harrison et al., 2007; Nadarajah et al., 1997; Ray et al., 2005). gDPSCs-tan lehenengo aldiz Ellis et al.-ek deskribatutako boltai menpeko L motako Bay-K-ri sentikorrek diren kaltzio kanalen presentzia funtzionala ere berretsi genuen (Ellis et al., 2014). Aztertutako elementu guztiek proposak bihurtzen dituzte gDPSC-ak birsorkuntza terapietan erabiltzeko, hauek beharrezkoak baitira nerbio ehunean behar bezala integratzeko.

Laburtzeko, hemen batutako emaitza guztiek serum gabeko inguruneetan gDPSCs-en biziraugarritasuna bermatu daitekela iradokitzeaz gain, ingurune hauek neurobirsortze terapietan erabilgarriak izan daitezkeen aldaketa molekular, funtzional eta fisiologikoak sustatu ditzaketela

ondorioztatu dugu. Oraindik haratago, gDPSCs-ek erakutsitako leino neurogeniko eta endoletialetara desberdintzeko ahalmen argiak, seinale neurobabesleen adierazpenak eta xagu burmuinean integratzeko eta neobaskularizatzeko gaitasunak, ez bakarrik nerbio ehunen, baizik eta, ehun ez nerbiosoen birsortze terapia zelular berriei aterak irekitzeko beharrezkoak diren ezaugarriak dira (Luo et al., 2018).

Erreferentziak:

- d'Aquino, R., Graziano, A., Sampaolesi, M., Laino, G., Pirozzi, G., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* *14*, 1162–1171.
- Aurrekoetxea, M., Garcia-Gallastegui, P., Irastorza, I., Luzuriaga, J., Uribe-Etxebarria, V., Unda, F., and Ibarretxe, G. (2015). Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Front Physiol* *6*.
- Ben-Ari, Y. (2001). Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* *24*, 353–360.
- Bento, L.W., Zhang, Z., Imai, A., Nör, F., Dong, Z., Shi, S., Araujo, F.B., and Nör, J.E. (2013). Endothelial differentiation of SHED requires MEK1/ERK signaling. *J. Dent. Res.* *92*, 51–57.
- Bibel, M., and Barde, Y.A. (2000). Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev.* *14*, 2919–2937.
- Bonnamain, V., Thinard, R., Sergent-Tanguy, S., Huet, P., Bienvenu, G., Naveilhan, P., Farges, J.-C., and Alliot-Licht, B. (2013). Human dental pulp stem cells cultured in serum-free supplemented medium. *Front Physiol* *4*.
- Bronfman, F.C., Garrido, J., Alvarez, A., Morgan, C., and Inestrosa, N.C. (1996). Laminin inhibits amyloid-beta-peptide fibrillation. *Neurosci. Lett.* *218*, 201–203.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A., and Monyer, H. (2003). Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 13644–13649.
- Chen, S.-H., Murphy, D.A., Lassoued, W., Thurston, G., Feldman, M.D., and Lee, W.M.F. (2008). Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol. Ther.* *7*, 1994–2003.
- Egorov, A.V., and Draguhn, A. (2013). Development of coherent neuronal activity patterns in mammalian cortical networks: common principles and local heterogeneity. *Mech. Dev.* *130*, 412–423.
- El Omar, R., Beroud, J., Stoltz, J.-F., Menu, P., Velot, E., and Decot, V. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* *20*, 523–544.
- Ellis, K.M., O'Carroll, D.C., Lewis, M.D., Rychkov, G.Y., and Koblar, S.A. (2014). Neurogenic potential of dental pulp stem cells isolated from murine incisors. *Stem Cell Res Ther* *5*, 30.
- Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* *9*, 669–676.
- Fournier, B.P., Loison-Robert, L.S., Ferré, F.C., Owen, G.R., Larjava, H., and Häkkinen, L. (2016). Characterisation of human gingival neural crest-derived stem cells in monolayer and neurosphere cultures. *Eur Cell Mater* *31*, 40–58.
- Fukuda, S., Fini, C.A., Mabuchi, T., Koziol, J.A., Eggleston, L.L., and del Zoppo, G.J. (2004). Focal Cerebral Ischemia Induces Active Proteases That Degrade Microvascular Matrix. *Stroke* *35*, 998–1004.

- Gavazzi, I., Boyle, K.S., Edgar, D., and Cowen, T. (1995). Reduced laminin immunoreactivity in the blood vessel wall of ageing rats correlates with reduced innervation in vivo and following transplantation. *Cell Tissue Res.* *281*, 23–32.
- Gregory, C.A., Reyes, E., Whitney, M.J., and Spees, J.L. (2006). Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells* *24*, 2232–2243.
- Guerzon, E.R., Pereira, B.P., Bhavanam, K., Khin, Z.A., and Nathan, S.S. (2011). Collagen membranes for host-graft integration: an animal study. *J Orthop Surg (Hong Kong)* *19*, 151–156.
- Harrison, J.F., Rinne, M.L., Kelley, M.R., Druzhyna, N.M., Wilson, G.L., and Ledoux, S.P. (2007). Altering DNA Base Excision Repair: Use of Nuclear and Mitochondrial-Targeted N-Methylpurine DNA Glycosylase to Sensitize Astroglia to Chemotherapeutic Agents. *Glia* *55*, 1416–1425.
- Hirata, T.M., Ishkitiev, N., Yaegaki, K., Calenic, B., Ishikawa, H., Nakahara, T., Mitev, V., Tanaka, T., and Haapasalo, M. (2010). Expression of multiple stem cell markers in dental pulp cells cultured in serum-free media. *J Endod* *36*, 1139–1144.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 8932–8937.
- Janebodin, K., Horst, O.V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., and Reyes, M. (2011). Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS ONE* *6*, e27526.
- Ji, K., and Tsirka, S.E. (2012). Inflammation modulates expression of laminin in the central nervous system following ischemic injury. *J Neuroinflammation* *9*, 159.
- Kaukua, N., Shahidi, M.K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Ahrlund-Richter, L., et al. (2014). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* *513*, 551–554.
- Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 1468–1475.
- Lopez, O.L. (2011). The growing burden of Alzheimer’s disease. *Am J Manag Care* *17 Suppl 13*, S339–345.
- Luo, L., He, Y., Wang, X., Key, B., Lee, B.H., Li, H., and Ye, Q. (2018). Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem Cells Int* *2018*, 1731289.
- Malinda, K.M., Wysocki, A.B., Koblinski, J.E., Kleinman, H.K., and Ponce, M.L. (2008). Angiogenic laminin-derived peptides stimulate wound healing. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *40*, 2771–2780.
- Mead, B., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., and Scheven, B.A. (2014). Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS ONE* *9*, e109305.
- Muschler, G.F., Nakamoto, C., and Griffith, L.G. (2004). Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* *86-A*, 1541–1558.
- Nadarajah, B., Jones, A.M., Evans, W.H., and Parnavelas, J.G. (1997). Differential Expression of Connexins during Neocortical Development and Neuronal Circuit Formation. *J. Neurosci.* *17*, 3096–3111.
- Niu, G., Wright, K.L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., et al. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* *21*, 2000–2008.

- Oliveira, S.L.B., Pillat, M.M., Cheffer, A., Lameu, C., Schwindt, T.T., and Ulrich, H. (2013). Functions of neurotrophins and growth factors in neurogenesis and brain repair. *Cytometry A* 83, 76–89.
- Pineda, J.R., Daynac, M., Chicheportiche, A., Cebrian-Silla, A., Sii Felice, K., Garcia-Verdugo, J.M., Boussin, F.D., and Mouthon, M.-A. (2013). Vascular-derived TGF- β increases in the stem cell niche and perturbs neurogenesis during aging and following irradiation in the adult mouse brain. *EMBO Mol Med* 5, 548–562.
- Pisciotta, A., Riccio, M., Carnevale, G., Beretti, F., Gibellini, L., Maraldi, T., Cavallini, G.M., Ferrari, A., Bruzzesi, G., and De Pol, A. (2012). Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 7, e50542.
- Ratajczak, J., Bronckaers, A., Dillen, Y., Gervois, P., Vanganswinkel, T., Driesen, R.B., Wolfs, E., Lambrechts, I., and Hilkens, P. (2016). The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering.
- Ray, A., Zoidl, G., Weickert, S., Wahle, P., and Dermietzel, R. (2005). Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur. J. Neurosci.* 21, 3277–3290.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.
- Song, M., Lee, J.-H., Bae, J., Bu, Y., and Kim, E.-C. (2017). Human Dental Pulp Stem Cells Are More Effective Than Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cerebral Ischemic Injury. *Cell Transplant* 26, 1001–1016.
- Steward, M.M., Sridhar, A., and Meyer, J.S. (2013). Neural Regeneration. In *New Perspectives in Regeneration*, E. Heber-Katz, and D.L. Stocum, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 163–191.
- Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Kobrin, M., Bissell, M.J., and Derynck, R. (1993). Extracellular matrix regulates expression of the TGF-beta 1 gene. *J. Cell Biol.* 120, 253–260.
- Suzuki, S., Namiki, J., Shibata, S., Mastuzaki, Y., and Okano, H. (2010). The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 721–730.
- Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat. Med.* 5, 434–438.
- Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K.M., and White, L.J. (2015). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 9, 1205–1216.
- Uribe-Etxebarria, V., Luzuriaga, J., García-Gallastegui, P., Agliano, A., Unda, F., and Ibarretxe, G. (2017). Notch/Wnt cross-signalling regulates stemness of dental pulp stem cells through expression of neural crest and core pluripotency factors. *Eur Cell Mater* 34, 249–270.
- Vaquero, J., Zurita, M., Rico, M.A., Aguayo, C., Bonilla, C., Marin, E., Tapiador, N., Sevilla, M., Vazquez, D., Carballido, J., et al. (2018). Intrathecal administration of autologous mesenchymal stromal cells for spinal cord injury: Safety and efficacy of the 100/3 guideline. *Cytotherapy* 20, 806–819.
- Weiss, T.L., Selleck, S.E., Reusch, M., and Wintroub, B.U. (1990). Serial subculture and relative transport of human endothelial cells in serum-free, defined conditions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 26, 759–768.
- Xiao, L., and Tsutsui, T. (2013). Characterization of human dental pulp cells-derived spheroids in serum-free medium: stem cells in the core. *J. Cell. Biochem.* 114, 2624–2636.
- Xu, J., Liu, X., Jiang, Y., Chu, L., Hao, H., Liua, Z., Verfaillie, C., Zweier, J., Gupta, K., and Liu, Z. (2008). MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 2395–2406.

Yu, J., He, H., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, R., Shi, J., and Jin, Y. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol.* *11*, 32.

eman ia zabal zazu



UPV EHU

Ondorioak

eman ta zabal zazu



UPV EHU

Leinu neuraletara desberdintzeko ahalmen handiagoa iradokitzen duten ezaugarri fisiologiko, molekular eta jokabide berrien ezagupena lortu da gDPSCs-tan serum gabeko hazkuntza ingurune berritzaileak erabiltzearekin batera. Azpimarratzekoak dira gainera gDPSC-ak nerbio ehunen birsorkuntzan izan dezaketen garrantzia lanean zehar aurkitu ditugun gaitasun neurobabeslea eta ezaugarri baskulogenikoen kontuan hartuta.

Hurrengo ondorioztatu da lan honetatik aterako emaitzak begiratu:

1. Serum gabeko STP hazkuntza medioak ez du inolako eraginik gDPSCs-en ezaugarri ektomesenkimalen adierazpenean. Hauek markatzaile ama neural, mesenkimal eta pluripotenteak adierazten jarraitzen dute.
2. DMEM + FBS 10% -an ereindako gDPSCs-ak **geruza-bakar** eran hazten diren bitartean, **STP serum gabe**an hazitako gDPSCs-ak **hortz-esfera** bezala izendatutako 3D egiturak eratzeko ahalmena dute. Gainera, DMEM + FBS 10%-an ereindako zelulen **hazkuntza ratioa** STP-n hazitakoek erakutsitakoa baino askoz handiagoa da. Honek serum **absentziak** ondorioz eragindako **kiesentzia** egoera bat iradokitzen du .
3. Aztertutako **neurotransmisore** eta boltai menpeko kaltzio **kanal** guztiak **funtzionalak** dira ia portzentaia berdinean DMEM + FBS 10% eta STP.
4. **NTRK2** eta **NTRK3**, neurotrofina hartzaileak gainadierazita daude serum gabeko STP-n hazitako zeluletan.
5. **BDNF** eta **NT3** gehitzean, hurrenez hurren, **NTRK2** eta **NTRK3**-en ohiko estekatzaileak, serum gabeko STP hazkuntza ingurunean, STP + NTF2 deritzoguna, **hazkuntza ratioa** serum-dun kultibotan dagoenaren mailara **igotzearekin** batera, **GN**-ko markatzaileak eta markatzaile **pluripotentialak** gainadieraziak dira. **gDPSCs**-en leinu segidan **NCSCs**-taranzko atzera pausu bat lortu dugularik, STP-n zeuden zelulak zuten **kiesentzia** egoera gaindituz.
6. **STP+NTF2** hazkuntza ingurunean ereindako zelulek, bakarrik STP-n edota DMEM-FBS 10%-n hazitako zelulek erakutsitako ahalmen neurogenikoa baino ahalmen **esanguratsuki handiagoa** erakutsi zuten.
7. Neurocult™ hedapenerako medioan hazitako gDPSCs-ak **hortz-esferak** sortzeko ahalmena dute eta baita **ama mesenkimal** markatzaileak zein markatzaile **endotelialak** adierazteko gaitasuna.
8. Neurocult™ desberdintzapenerako medioan hazitako gDPSCs-ak markatzaile **glial** eta **neuronalak** adierazteko gai dira, markatzaile **endotelialik** adierazten ez duten bitartean.



9. Xaguen burmuinean **baskulogenesisia** eragiteko eta **integratzeko** gaitasuna erakutsi zuten neurocult™ hedapenerako medioan aurre-hazitako gDPSCs-ek.

I.eranskina

eman ia zabal zazu



UPV EHU

I Patentea: *Hortzetako jatorria duten zelulen txertaketen bidezko organo eta ehun birbaskularizazioa (2018).*



Solicitud para el registro de Invenciones

SOLICITUD PARA EL REGISTRO DE INVENCIONES EN LA UPV/EHU

I. TÍTULO DE LA INVENCIÓN

REVASCULARIZACIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS POR TRASPLANTE DE CÉLULAS DE ORIGEN DENTAL

II. PALABRAS CLAVE PARA BÚSQUEDAS EN BASES DE DATOS:

Dental Stem Cells, Dental Pulp, Endotheliocytes, Serum-Free culture medium, Cell therapy, Cell transplant, Neovascularization, Blood-supply, Blood vessel, Regeneration, Angiogenic therapy, Angiogenesis, Vasculogenesis, Tissue Engineering, intracranial graft.