

IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE CITOQUERATINAS 13 Y 19 EN CÉLULAS MENSEQUIMALES DEL FOLÍCULO DENTAL

Monzón Sánchez LM¹; Alfonso-Rodríguez CA², Jaimes-Monroy Gustavo²

¹ Residente Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño.

² Grupo de investigación en salud oral Facultad odontología Universidad Antonio Nariño

Resumen:

Introducción: El folículo dental es un tejido único compuesto por una condensación de células ectomesenquimales que rodea el germen dental en las primeras etapas de la formación del diente. Las células folículo dental pueden formar los 3 tipos de tejidos que constituyen el periodonto: ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar.

Objetivo: Analizar la expresión de marcadores Citoqueratinas 13 y 19. **Resultado:** Los resultados encontrados en este estudio demostraron la heterogeneidad y la capacidad de cultivo celular de las células de folículo dental. El ensayo por inmunofluorescencia demostró alta expresión de citoqueratina 19 y moderada de citoqueratina 13.

Conclusiones: Los hallazgos encontrados pueden explicar desde un punto de vista básico que este tipo de células podrían diferenciarse a epitelios estructuralmente similares como mucosa oral y piel. En este estudio se confirmó el potencial de las células madre del folículo dental, para diferenciarse a linaje epitelial a pesar de su naturaleza mesenquimal y la expresión de las citoqueratinas 13 y 19 siendo esta la de mayor expresión.

INTRODUCCIÓN

La ingeniería Tisular es un campo de reciente desarrollo cuyo objetivo es generar órganos y tejidos artificiales mediante la generación de sustitutos biológicos que reforman y mantienen un tejido (1). Para ello utiliza cuatro pilares fundamentales: Células madre, Andamios, Factores de crecimiento y/o moléculas de señalización; finalmente la unión de los tres componentes anteriores que en conjunto deben lograr propiedades biomecánicas adecuadas para el desarrollo del tejido artificial (2). La mayoría de los tejidos del cuerpo humano se han estudiado para contemplar la posibilidad de sustitución por estructuras diseñadas mediante ingeniería tisular. Ensayos clínicos se llevan a cabo para implementar la aplicación de tejidos artificiales (1). En este sentido, la Ingeniería Tisular ha desarrollado

estudios encaminados a generar artificialmente tejidos de la cavidad bucal dentro de los cuales vale la pena resaltar a la mucosa oral (3). La mucosa oral está integrada por dos capas de tejidos estructural y embriológicamente diferentes: tejido epitelial y tejido conectivo quienes están comunicados por una membrana basal. (4) El principal tipo celular del tejido epitelial son los queratinocitos los cuales sintetizan citoqueratinas (5). Las citoqueratinas son proteínas filamentosas estructurales que contribuyen a la formación y estratificación del epitelio (6) ;la mucosa oral se ve afectada generalmente por enfermedad periodontal, cáncer, candidiasis, leucoplasia, infecciones, trauma e incluso condiciones relacionadas con la práctica clínica (7) (8) (9) (10). Estas afecciones requieren tratamiento siendo los procedimientos quirúrgicos la opción más común para su terapéutica. En algunas ocasiones se requiere la reconstrucción del defecto e incluso el reemplazo total del tejido afectado (11), para este procedimiento el clínico utiliza auto injertos o materiales de origen animal o sintético pero muchas veces la cantidad de auto injerto o biomaterial no es suficiente para suplir esta carencia (12). Por estas razones es necesario desarrollar nuevas estrategias que suplan esta necesidad tal como la Ingeniería Tisular (1). Hasta la fecha, se han utilizado diferentes estrategias para desarrollar tejido epitelial y tejido conectivo constituyente de la mucosa oral nativa mediante ingeniería tisular (12). Sin embargo, la obtención y cultivo de queratinocitos los cuales son células nativas del epitelio oral han evidenciado dificultad para proliferar y mantenerse en un cultivo *in vitro*, por lo cual estas células presentan limitaciones para ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular (13). Además de lo anterior, uno de los problemas que se presenta a la hora de realizar cultivos de este tipo es que se requiere una gran cantidad de células para su proliferación, según lo reportado Rheinwald y col (14) (1975), Reid y col (15) (1998).

Solamente dos estudios han diferenciado fuentes celulares alternativas para obtener queratinocitos para ser usadas en protocolos de generación de mucosa oral artificial: un estudio analizó la expresión de citoqueratinas en células Mesenquimales de la Gelatina de Wharton mediante inmunohistoquímica y microarray, este tipo celular presentaron perfiles de expresión de proteínas típicas del epitelio bucal y la piel (citoqueratinas 3, 4, 7, 8, 12, 13, 19, desmoplaquina y zona ocludens) (16) (17). Sin embargo, el acceso a estas fuentes celulares aún sigue siendo complicado en la actualidad. Otro estudio utilizó un nuevo modelo de mucosa oral de fibrina-agarosa para evaluar la expresión de citoqueratina en la mucosa oral artificial y para determinar si este patrón es similar a la de mucosa oral

humana, con el objetivo de utilizar este modelo para aplicaciones terapéuticas clínicas. (Garzón I, 2009) Por otro lado, (Doğan, Demirci, & Şahin, 2015) utilizó células madre de germen dental, logrando evidenciar la diferenciación en linajes de células endoteliales y epiteliales, presentando marcadores típicos de células mesenquimales. Además, mediante inmunohistoquímica, (RT-PCR) y western blot se logró identificar citoqueratinas 18 y 19

Por tanto, es necesario buscar fuentes alternativas de células que sean de fácil obtención, que presenten buenas características de proliferación, diferenciación, viabilidad celular y sobre todo que expresen proteínas típicas del tejido epitelial.

Como lo son las células madre del folículo dental y su posible aplicación en ingeniería de tejidos dentales. El Folículo Dental se obtiene fácilmente a partir de extracciones de terceros molares clínicamente descartados, y se puede ser almacenado, congelado durante muchos años. Como una fuente celular potencial, la banca de células madre dental. (Masaki J. Honda & Tsuchiya, 2010).

Las Citoqueratinas son filamentos intermedios que se encuentran en todos los tipos de epitelios, y son los marcadores fundamentales de la diferenciación del epitelio. En esta investigación se identificará la presencia de dos citoqueratinas de relevancia en cavidad bucal. Por esta razón, la investigación propuso desarrollar su fase experimental *ex vivo* utilizando células mesénquimas de folículo dental, las cuales son de fácil obtención y han presentado gran capacidad de proliferación, diferenciación y viabilidad celular (4). En este contexto el objetivo del presente estudio fue analizar la expresión de marcadores epiteliales (citoqueratina 13 y 19) en células mesénquimales del folículo dental mediante inmunofluorescencia.

2. MATERIALES Y METODOS.

2.1 Obtención de muestras de Folículo dental y Cultivo celular

Cuatro terceros molares inferiores indicados para exodoncia fueron extraídos de dos pacientes sistémicamente sanos de 14 de años con previo consentimiento informado firmado por sus padres el cual se explicó que serán garantizados sus derechos de guardar identidad, datos y su tejido será utilizado para experimentación. Una vez realizada las exodoncias se extrajo el tejido del folículo dental.

Cultivó celular:

Para los diferentes ensayos se hicieron dos grupos. Grupo 1 fueron las muestras destinadas para cultivo celular y ensayos de inmunofluorescencia *ex vivo*. Grupo 2 grupo Control (muestras que no llevan anticuerpo primario).

Se realizó la técnica de cultivo celular por explante estandarizado previamente por la línea de investigación en los laboratorios de una universidad colombiana. Una vez obtenidas las muestras de folículo dental se lavaron con solución salina buffer fosfato (PBS) marca (BG&M®), son cortadas en trozos de 2 mm aproximadamente con un bisturí y posteriormente los trozos fueron colocados en frascos de cultivo de 25 ml con una espátula. Se esperó a que los trozos se adhieran a la superficie del frasco aproximadamente por 2 a 4 minutos. Una vez verificada la adhesión de los trozos a la superficie se le agrego suavemente un medio de cultivo DMEM (Lonza) suplementado con 5 ml de antibiótico (Sigma) y 50 ml de suero fetal bovino (Lonza). Seguidamente, las muestras son incubadas a 37°C a 5 atm de CO₂. Se realizó controles de crecimiento en un microscopio invertido y se hizo el cambio de medio de cultivo cada 2 días. Los cultivos se observaron bajo microscopio invertido hasta obtener una confluencia del 70% para pasar al siguiente pasaje. Las células utilizadas para la técnica de inmunofluorescencia fueron las del cuarto pasaje (23) .

En cada pasaje se realizó control de los cultivos celulares mediante microscopía óptica para verificar la confluencia de más del 70%. Una vez se verifico la confluencia se procedió a tripsinizar (Gibco®) el cultivo celular para realizar el siguiente pasaje. Además, en cada pasaje se realizó control de calidad de los cultivos celulares (análisis morfológico, azul trypan, y Citometría de flujo en el cuarto pasaje para corroborar el linaje mesenquimal de las células en cuestión. Se utilizaron marcadores CD90, CD105, CD34 CD45.

2.2 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE AZUL TRYPAN

Para el conteo celular se tomaron 10µl de células en suspensión obtenidas en cada pasaje y se colocaron en una cámara de Neubauer para hacer el conteo. Para verificar la viabilidad celular se utilizó la tinción de azul trypan (Lonza) la cual consiste en tomar 10µl de las células tripsinizadas agregándole 10µl de azul trypan durante 5 minutos. Pasado este tiempo se procedió al análisis bajo microscopía. Se tomaron células que conserven su

integridad de membrana y aquellas que estén teñidas de color azul. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de células viables (23).

Fórmula 1. Viabilidad celular

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número Total de células}} * 100$$

2.2 ANÁLISIS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Se realizó ensayo de inmunofluorescencia directamente a las células del cuarto pasaje cultivadas en láminas para identificar marcadores epiteliales (citoqueratina 13 y 19). En primer lugar, se permeabilizaban las muestras con 0.1% tritón x-100, posteriormente, se hará bloqueo con suero de caballo al 2.5%. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante 1 hora con anticuerpo primario (Novus biologicals Cytokeratin 13 y 19) y por media hora con anticuerpo secundario. Finalmente, se hizo lavado con PBS y se contrastó con Solución fluorescente DAPI (Novus biologicals). Las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos y se analizó en microscopio de fluorescencia (Vanguard 1400FL series). Se tomó en cuenta un control negativo (células que no se le adicione anticuerpo primario) (28) (36) (18).

2.3 ANÁLISIS DE DATOS

La expresión de las proteínas se analizó cualitativamente por dos investigadores independientes. La expresión será almacenada de la siguiente manera:

1. (+++): fuerte expresión
2. (++): media expresión
3. (+): leve expresión
4. (+/-): muy baja expresión
5. (-): expresión negativa

Fuerte expresión cuando la población celular expresa alta intensidad de señal determinado en color verde. Media expresión cuando la población celular evidencia menor intensidad de señal en color verde. Baja expresión cuando la población celular expresa débil señal en color verde.

3 RESULTADOS

3.1 Cultivo de células de Folículo Dental

Los resultados encontrados en este estudio demostraron que los cultivos de células madre del folículo presentaron adherencia a la superficie del frasco de cultivo y proliferación celular, permitiendo realizar varios pasajes. Vale la pena resaltar que este tipo de células mostraron morfología típica de células madre con adecuada viabilidad celular (**Imagen 1**). En cuanto a la proliferación celular en los primeros 6 días no se observó crecimiento celular en el cultivo primario. Se pudo evidenciar crecimiento exponencial a partir de los 7 días después de realizar el cultivo primario. A los 21 días se observó confluencia del 80%. A partir de ese momento se procedió a realizar el primer pase. El segundo pase se realizó a los 28 días, el tercer pase a los 35 días y el cuarto pasaje a los 40 días. El pasaje cuatro fue utilizado para todas las pruebas propuestas en el apartado metodológico.

Proliferación y morfología celular 10x



Pase 1



Pase 2



Pase 3

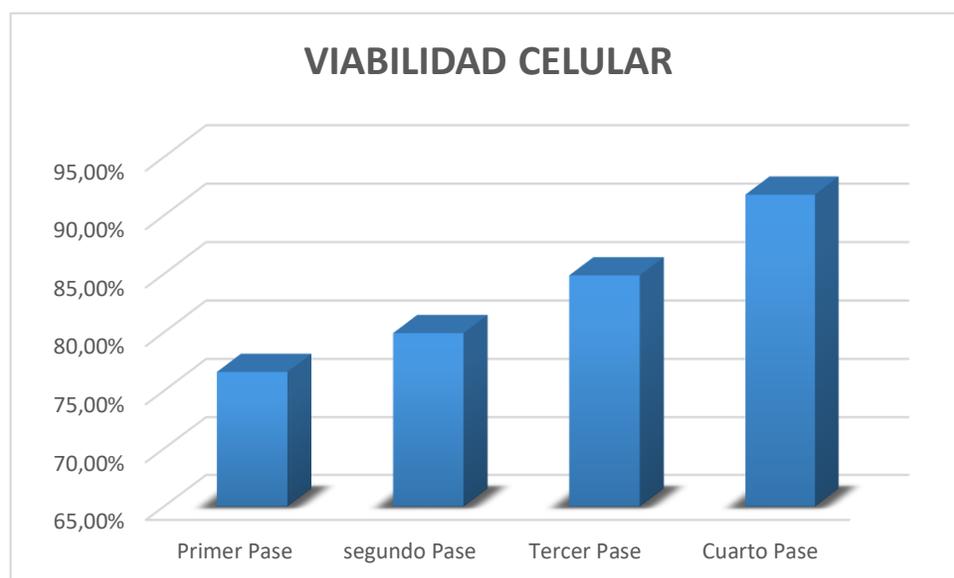


Pase 4

Imagen 1: Cultivo celular: se observa incremento de proliferación celular en los diferentes pases y típica morfología fibroblastoide.

3.2 Azul trypan

En cuanto a viabilidad celular con ensayo de azul trypan se encontró que las células del folículo dental cultivadas presentaron en el pase 1 un 76,61% de viabilidad, en el pase 2 un 79,93%, 84,87% en el pase 3 y en el último pase un 91,78% (**Gráfica 1**).



Gráfica 1: Análisis de la viabilidad celular mediante azul trypan

3.3 CARACTERIZACIÓN CELULAR

3.3.1 Citometría de Flujo

Los resultados de Citometría de flujo encontrados en esta investigación reportan que las células mesenquimales del folículo dental cultivadas presentaron marcadores CD90⁺ en una población del 87,7%, CD45⁻ 81,5%, CD105⁻ 80,1% y CD34⁻ (**Figura1**)

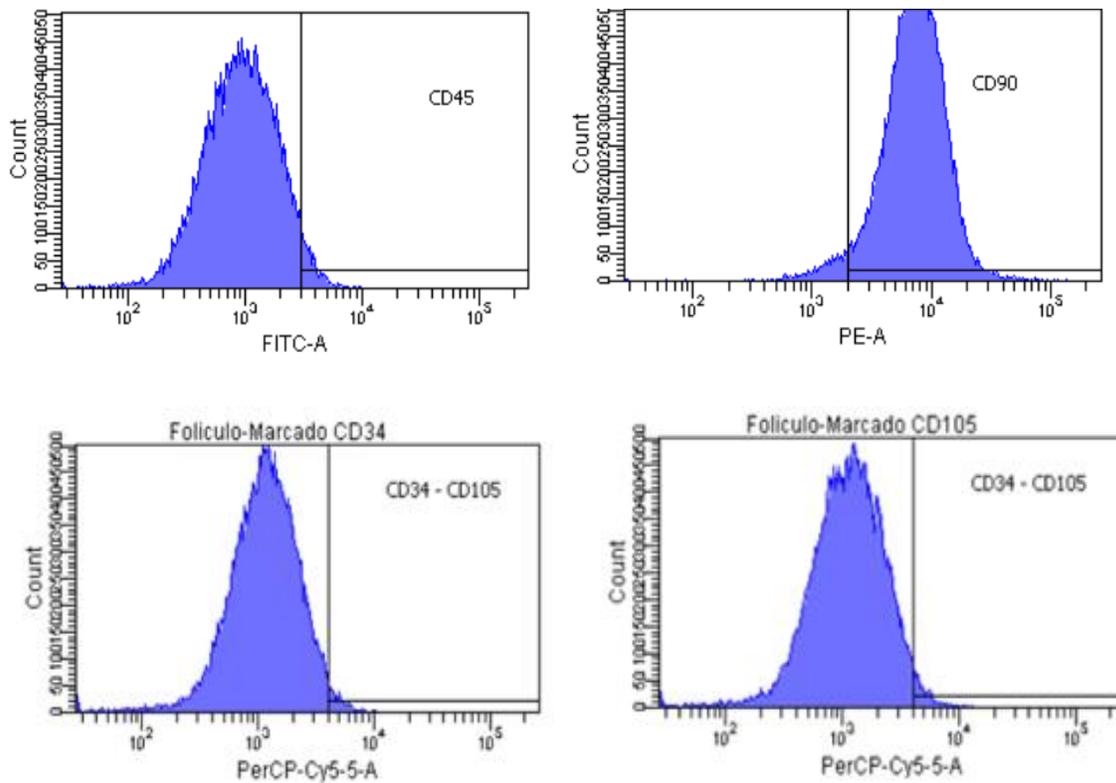


Figura 1. Representación gráfica de la citometría de flujo donde se observan marcadores: CD90 positivo, CD45, CD34, CD105.

3.4 ANÁLISIS POR INMUNOFLOURESCENCIA

El análisis por inmunofluorescencia de citoqueratinas epiteliales CK13 y CK19 en cultivo celular demostró estar positivamente expresadas. Se observó presencia de CK19 fuertemente (+++) expresada, mientras que CK13 presentó expresión moderada (++)

Tabla 1

	CK13	CK19
CULTIVO CELULAR DE FOLICULO DENTAL	++	+++

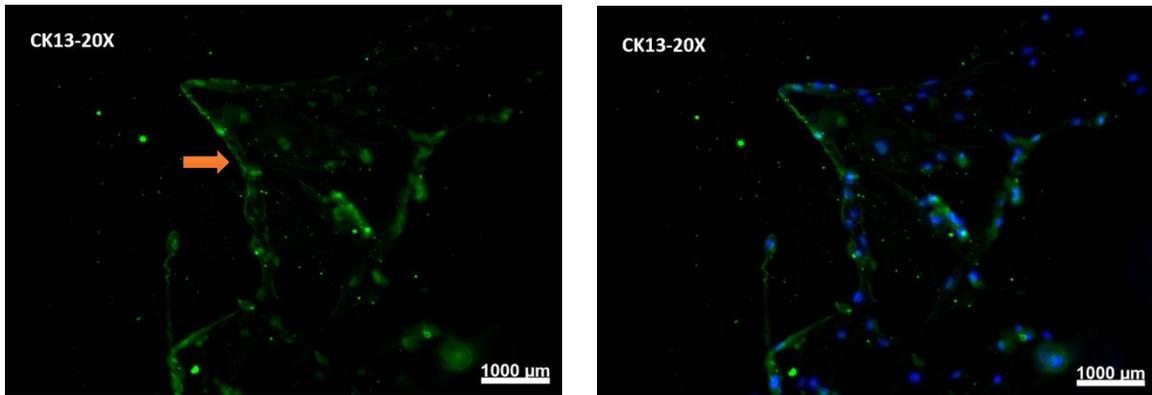


Imagen 2. Expresión de citoqueratina 13 técnica de inmunofluorescencia, la flecha nos indica la expresión de la citoqueratina 13

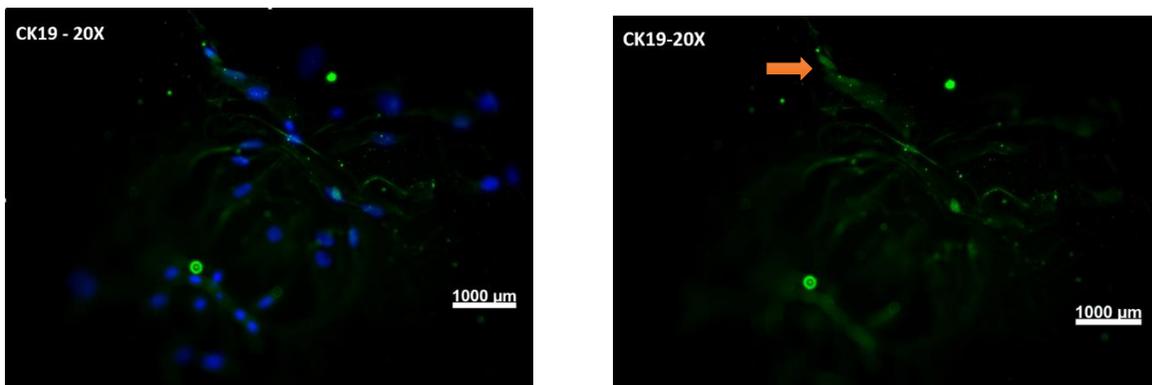


Imagen 3. Expresión de citoqueratina 19 mediante técnica de inmunofluorescencia, la flecha indica la expresión de la citoqueratina 19.

4. DISCUSION

El folículo dental es un tejido único, compuesto por una condensación de células ectomesenquimales que rodea el germen dental en las primeras etapas de la formación del diente. Las células folículo dental pueden formar los 3 tipos de tejidos que constituyen el periodonto: ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. (Xu QL, 2017).

Las células del folículo dental presentan una gran capacidad proliferativa en condiciones adecuadas, adhesión a un sustrato plástico, son capaces de diferenciarse a lo largo de múltiples linajes mesenquimales, mantener su capacidad de autor renovación y mantienen este fenotipo hasta que son expuestas a señales apropiadas. (Brizuela C., 2013). La capacidad de adhesión al plástico de las células del folículo dental del presente estudio

resalta su crecimiento y confluencia del 80% a los 21 días a partir de ese momento se procedió a realizar el primer pase ya que cumplían con las condiciones para llevarlo a cabo. El potencial de diferenciación de estas células que se originan en una muestra de tejido gingival fácil de obtener se proyecta como una fuente alternativa de células madre.

Debido a la dificultad de cultivar y obtener grandes cantidades de queratinocitos en la actualidad se busca fuentes celulares opcionales que permitan sustituir los desafíos en la generación de mucosa oral artificial para lograr una caracterización y estratificación adecuada del epitelio de la cavidad bucal.

Las células del folículo dental se han ubicado como una excelente fuente y alternativa para la obtención de células madre, con un gran potencial de diferenciación múltiple ampliamente estudiado, para uso terapéutico y ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular. (Masaki J. Honda & Tsuchiya, 2010). Sin embargo, estas células son heterogéneas y varios trabajos, incluyendo el presente estudio, han encontrado la expresión de citoqueratinas en otras fuentes celulares tales como, células mesenquimales de la gelatina de Wharton y células del germen dental. (Garzon, 2014).

Los resultados encontrados en este estudio demostraron una proliferación progresiva siendo desde que el primer pase con una viabilidad de 76,61% hasta el cuarto pase 91,78% se observó un aumento exponencial en la proliferación, estos resultados están en concordancia con lo reportado en el de (Piedra M, 2014) quien realizó un estudio en células de pulpa dental, lo cual encuentra que las células del folículo dental presentaron un similar comportamiento.

Por otro lado (Brizuela C., 2013) observo que las células del folículo dental están en concordancias con nuestros resultados proliferación celular ya que colonias celulares derivadas del folículo dental presentaron una mayor confluencia de aparición en comparación a las pulpaes. Sin embargo, esto se puede deber a la composición diferente que presentan los tejidos. Mientras que el folículo corresponde a un tejido conectivo de características laxas, la pulpa presenta un tejido conectivo de características más fibrosas.

Los resultados encontrados en este estudio demostraron que las células de folículo dental presentaron marcadores típicos como el CD90 que dio positivo, CD45 negativo, CD34 negativo y CD105 negativo, son marcadores específicos del folículo dental en concordancia con el autor (Dominici M, 2006) un gran potencial para células mesenquimales, proliferando más rápido con mayores duplicaciones de población en comparación con otras poblaciones celulares como por ejemplo las de pulpa dental, además presentaron buena morfología y adherencia a la superficie plástica, expresión de CD90, CD45, CD34 y CD105. (Mitrano T, 2010). Algunos autores sugieren, que las células ideales para protocolos de ingeniería tisular deben poseer un alto potencial de diferenciación a otro tipo celular (Anzalone R, 2011). En este contexto, el resultado más relevante de este trabajo fue la fuerte expresión de citoqueratina 19, la cual demostró estar presente en gran cantidad en células de folículo dental cultivadas (*ex vivo*). Por otro lado, la citoqueratina 13 presentó moderada expresión. Estos resultados concuerdan con lo reportado (Hayward CJ, 2013) al que por que previamente demostró la expresión de patrones de citoqueratinas del epitelio estratificado, aunque ese reporte no fue llevado a cabo en cultivos celulares sino en tejidos nativos de cordón umbilical (Hayward CJ, 2013).

La presencia de citoqueratinas encontradas en folículo dental abre un nuevo abanico de posibilidades para la obtención de células epiteliales. Estos resultados podrían soportar el uso de células madre de folículo dental como una fuente alternativa, para ser utilizados en protocolos de generación de mucosa oral y de piel debido a la similitud estructural con la mucosa bucal. Una de las limitaciones del presente estudio es que el análisis de la inmunofluorescencia no fue realizado de una forma cuantitativa. Futuros trabajos de la línea de investigación deben analizar cuantitativamente los resultados incorporando las técnicas de microarray y citometría de flujo. Adicional a esto, se debe ampliar el análisis de otros tipos de citoqueratinas.

4. CONCLUSIÓN

El folículo dental es de fácil obtención y su posible aplicación en la ingeniería de tejidos como fuente potencial de células. Los resultados reportados pueden explicar desde un punto de vista básico que este tipo de células podrían diferenciarse a epitelios estructuralmente similares como mucosa oral y piel. En este estudio confirmó el potencial de las células madre del folículo dental, para diferenciarse a linaje epitelial aun cuando su

naturaleza mesenquimal, gracias a la expresión de las citoqueratinas 13 y 19 siendo esta la de mayor expresión.

5. Bibliografía

1. Langer R. Advances in Tissue Engineering. EE.UU.; 2016. Report No.: PMS.
2. J. F. development of bilayer and trilayer nanofibrous/microfibrous scaffolds for regenerative medicine. Biomaterials Science. 2013 september;; p. 942–951.
3. Bluteau G. stem cells for tooth engineering. 2008..
4. Alvisi G. Generation of a transgene-free human induced pluripotent stem cell line(UNIPDi001-A) from oral mucosa epithelial stem cell. elsevier. 2018 Feb 18;; p.4
5. Rao RS. Oral Cytokeratins in Health and Disease. J Contemp Dent Pract review article. 2014;; p. 127-136.
6. Rao RS. Oral Cytokeratins in Health and Disease. J Contemp Dent Pract review article. 2014;; p. 127-136.
7. Ana Iris Verdecia Jiménez 1. Mortalidad por cáncer bucal en pacientes de la provincia Holguín. 2014;; p. 11.
8. Anthony L. Neely. The natural history of periodontal disease in humans:risk factors for tooth loss in caries-free subjects receiving no oral health care. journal of clinical periodontology. 2005;; p. 10.
9. Sonoko Tasaki. Th17 cells differentiated with mycelial membranes of Candida albicans prevent oral candidiasis. journals investing in science. 2018 Feb 12;; p. 10.
10. Swati Singla. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, c-erbB2 in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2016;; p. 6.
11. Sila Çagri ISLER. The effects of different restorative materials on periodontopathogens in combined restorative-periodontal treatment. journal of applied oral science. 2017 Aug 21;; p. 9
12. Maurizio S. Tonetti. Xenogenic collagen matrix or autologous connective tissue graft as adjunct to coronally advanced flaps for coverage of multiple adjacent gingival recession: Randomized trial assessing non-inferiority in root coverage and superiority in oral health-related quality of life. journal of clinical periodontology. 2017 october 23;; p. 11.

13. Bluteau G. stem cells for tooth engineering. 2009..
14. JG R. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *cell*. 1975
15. Reid K. Scaffolding: A Broader View. *journal of learning disabilities*. 1998; volume 31, number 4, july/august pages 386-396.
16. I. Garzon. Expression of epithelial markers by human umbilical cord stem cells. A topographical analysis. *elsevier*. 2014 september;: p. 1-7.
17. Ingrid Garzón. Wharton's Jelly Stem Cells: A Novel Cell Source for Oral Mucosa and Skin Epithelia Regeneration. *AlphaMed Press*. 2013 APRIL 3; 2: p. 625– 632.
18. Jakub Suchánek J. Protocols for Dental-Related Stem Cells. *Dental Stem Cells: Regenerative Potential*. 2016 julio;(pp.27-56).
19. Marks. S. C, Jr. (1976) Tooth eruption and bone resorption: experimental investigation of the ia (osteopetrotic) rat as a model for studying their relationships. *Journal of Oral Pathology* 5. 149-163
20. Cahill D., Marks, Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle *Journal of Oral Pathology* 1980:9: 189-200
21. Wise GE, Lin F., Fan W. (1992). Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res* 267 :483-492
22. Kadkhoda Z., et al., Assessment of human periodontal ligament stem cell surface molecules and wisdom tooth follicle stem cell surface molecules *Journal of Craniomaxillofacial Research* 2017. 4(2):352-359.
23. Langer R., Vacanti JP *Ingeniería de tejidos*. *Ciencia* 1993; 260 (5110): 920 - 926. doi: 10.1126 / science.8493529
24. Shinsuke Ohba, Fumiko Yano, Ung-il Chung, *Tissue engineering of bone and cartilage* *IBMS BoneKEy* (2009), 405–419
25. Ratajczak J 1 *Las propiedades neurovasculares de las células madre dentales y su importancia en la ingeniería de tejidos dentales*, *Stem Cells Int*. 2016; 2016: 9762871. doi: 10.1155 / 2016/9762871.
26. W.Mahfouz S.Elsalmy J.Corcós A.S.Fayed, *Fundamentals of bladder tissue engineering*, *African Journal of Urology* Volume 19, Issue 2, June 2013, Pages 51-57.

27. Péter Windisch, Complex analysis of periodontal regenerative procedures, DMD. PhD THESIS Semmelweis University Budapest 2003. Disponible en: http://phd.semmelweis.hu/mwp/phd_live/vedes/export/windisch.d.pdf
28. Corcoran JP, Ferretti P. Keratin 8 and 18 expression in mesenchymal progenitor cells of regenerating limbs is associated with cell proliferation and differentiation. *Dev Dyn.* 1997 Dec;210(4):355-70.
29. Kasper M, Karsten U, Stosiek P, Moll R. Distribution of intermediate-filament proteins in the human enamel organ: unusually complex pattern of coexpression of cytokeratin polypeptides and vimentin. *Differentiation.* 1989 Jun;40(3):207-14.
30. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H. Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int.* 2005 Feb;29(2):111-7.
31. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H. Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int.* 2005 Feb;29(2):111-7.
32. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016 Jul 1;143(13):2273-80.
33. Mizuno N, Shiba H, Mouri Y, Xu W, Kudoh S, Kawaguchi H, Kurihara H. Characterization of epithelial cells derived from periodontal ligament by gene expression patterns of bone-related and enamel proteins. *Cell Biol Int.* 2005 Feb;29(2):111-7.
34. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C . Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci.* 2010 Dec;52(4):541-52
35. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *Journal of dental research.* 2008;87(8):767-771.
36. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhhah MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med.* 2013 Mar;11(3):235-42.

37. Brizuela C. C.; Galleguillos, G. S.; Carrión, A. F.; Cabrera, P. C.; Luz, C. P. & Inostroza, S. C. Aislación y caracterización de células madre mesenquimales provenientes de pulpa y folículo dentario humano. *Int. J. Morphol.*, 31(2):739-746, 2013.
38. Amila Brkic, Dental Follicle: Role In Development Of Odontogenic Cysts And Tumours, *Journal Of Istanbul University Faculty Of Dentistry*, Vol 48, No 1 (2014)
39. Meleti M, van der Waal I, Clinicopathological evaluation of 164 dental follicles and dentigerous cysts with emphasis on the presence of odontogenic epithelium in the connective tissue. The hypothesis of "focal ameloblastoma" *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013 18(1):e60-64
40. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, et al. Células madre del folículo dental e ingeniería de tejidos. *J Oral Sci.* 2010; 52: 541-52.