

IDENTIFICACIÓN POR INMUNOFLUORESCENCIA DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL EPITELIO EN CÉLULAS MADRE DEL FOLÍCULO DENTAL. PRUEBA PILOTO

Identification by immunofluorescence of the expression of structural proteins of epithelium in stem cells of the dental follicle. Pilot test

Mayorga A.¹, Rojas D.², Jaimes G³. Alfonso C.⁴

¹Residente Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño, amayorga57@uan.edu.co

²Residente Posgrado Periodoncia Universidad Antonio Nariño, yulyrojas@uan.edu.co

³MsC, Profesor área de Investigación Universidad Antonio Nariño, tavojaimes@uan.edu.co

⁴PhD Ingeniería Tisular, Director de Posgrado Especialización de Periodoncia Universidad Antonio Nariño, kamiloalfonso@uan.edu.co

Resumen

ANTECEDENTES

La regeneración de la mucosa oral perdida a causa de las patologías orales es un desafío, ya que los tejidos orales afectados necesitan ser restaurados a su arquitectura original. Las células madre del folículo dental, se presentan como una opción atractiva para la regeneración de los tejidos de la cavidad bucal. Anteriormente, los autores han utilizado células madre obtenidas de tejidos orales, investigando su potencial regenerativo. El propósito del presente estudio es identificar la expresión de las proteínas típicas del epitelio Citoqueratina 8, Desmogleína, y Desmoplaquina en células madre obtenidas a partir de folículo dental y en estudios futuros su potencial aplicación en la regeneración de mucosa oral.

MÉTODOS

Previo consentimiento, asentimiento informado y aval ético institucional, se obtuvieron gérmenes dentales del tercer molar en la etapa de formación de la corona (n = 5), en pacientes de 14 años de edad) las muestras fueron almacenadas y procesadas, para aplicación de técnicas de cultivo celular, análisis microscópico evaluando la viabilidad celular, citometría de flujo para realizar la caracterización celular y posteriormente la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica, para posterior identificación de los perfiles de expresión de las proteínas típicas del epitelio en tejido folículo dental.

RESULTADOS

Los cultivos de células madre de folículo dental presentaron adherencia a la superficie del frasco de cultivo, proliferación celular, permitiendo realizar varios pasajes; esto permitió evaluar el cultivo primario obtenido, que se caracterizó por la presentación de varios parámetros: tasa de proliferación y expresión de los marcadores típicos de células del estroma mesenquimatoso (MSC con adecuada viabilidad celular, observándose en los resultados la expresión de los marcadores de diferenciación de las células y la expresión notable de la proteínas típicas del epitelio en mayor proporción Desmogleína.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares obtenidos en esta prueba piloto proporcionaron evidencia inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas típicas del epitelio Citoqueratina 8, Desmogleína y Desmoplaquina, obtenidas de tejido folículo dental, resultado que puede ser relevante para las investigaciones de ingeniería tisular, constituyendo un complemento útil para su utilización como alternativa estructural para la generación de tejidos orales o mucosa oral.

INTRODUCCIÓN

Las células madre se caracterizan especialmente, por su potencial de renovación continua y permanente, estas tienen la capacidad de diferenciarse en diversos tipos de células especializadas (1). Por esta razón, estas células son un tema de interés para los investigadores y el público en general, como una forma de regenerar los tejidos dañados y mejorar la resolución de algunas enfermedades. Friedenstein et al. (1966), identificaron por primera vez células madre mesenquimales, aspiradas de médula ósea adulta y las caracterizaron como células adherentes, auto renovables, similares a fibroblastos (fibroblastos unitarios formadores de colonias) obtenidos de la médula ósea (2). Desde entonces, la médula ósea ha sido la fuente más utilizada de células madre, sin embargo, su obtención quirúrgica ha sido una limitante dado el trauma que representa, por ello se hace necesario aislarlas de tejidos a los que se puede acceder con un mínimo trauma quirúrgico. Se han realizado estudios (3) (4) para identificar otras fuentes celulares e indagar cómo estas células pueden diferenciarse a distintos linajes celulares, con el fin de utilizarlas en procedimientos regenerativos.

Según Gronthos, et al 2000, mediante la ingeniería de tejidos, estas células madre se pueden utilizar para producir material celular que pueda ser empleado en la reparación de tejidos, en ese sentido, en Ingeniería Tisular y Regenerativa de la cavidad oral se han utilizado diferentes fuentes celulares para generar tejidos como mucosa oral, por ejemplo queratinocitos y fibroblastos orales (5) (6), células madre de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (HWJSCs) (7), queratinocitos del cordón umbilical (8), células endoteliales (9), que han evidenciado resultados; sin embargo persiste la búsqueda y desarrollo de tratamientos actuales para las enfermedades periodontales.

En este contexto, los tejidos dentales se han investigado como fuentes de células madre y se han identificado y caracterizado múltiples modelos celulares derivados de dientes, incluidos los de pulpa dental (DPSC) (10) (11), de ligamento periodontal (PDLSC) (12), células progenitoras de folículo dental (DFPC) (13) (14), SC de papila apical (SCAP) (14) (15) y ligamento periodontal de SC de dientes deciduos (DePDL) (16) (17). Los tejidos dentales son una fuente confiable y de fácil acceso de células madre que se pueden obtener con una morbilidad limitada y sin riesgos adicionales para el donante, ya que los dientes extraídos/exfoliados representan un producto de desecho de los procedimientos dentales.

Kemoun y col. 2007 (18) demostraron a través de estudios de inmunolocalización de marcadores de células progenitoras mesenquimales multipotenciales y receptores proteínas morfogenéticas en folículo dental *in vivo*, que las células del folículo dental poseen propiedades de células mesenquimales multipotenciales, luego de su diferenciación hacia múltiples tipos de células mesenquimales derivadas, tales como cementoblastos, condrocitos, adipocitos. Bluteau y col en el 2008, desarrollaron estudios encaminados en generar artificialmente tejidos de la mucosa oral. (19) Völlner y col. 2009 han demostrado que las células del folículo dental pueden diferenciarse en células de tipo neural cuando se cultivan en un medio inductor neural.

Rezai-Rad et al. (2015) descubrieron la fuerte capacidad osteogénica de estas células, esto las convierte en un tipo atractivo de células madre adultas para reparar defectos óseos o pérdida ósea asociada con la enfermedad periodontal (20). El folículo dental representa una fuente

atractiva de células madre/progenitoras debido a que es un tejido prescindible que se puede eliminar con una morbilidad mínima (Ikeda et al., 2006). Sin embargo, las propiedades de estas células del folículo dental y su viabilidad para la regeneración de tejidos aún deben investigarse con mayor detalle en su composición estructural.

Por lo tanto, un modo de avanzar en este campo de investigación es a través del estudio e identificación del perfil de expresión de ciertas queratinas, como la citoqueratina 8, Desmoplaquina, Desmogleína que debido a su conformación estructural son importantes para la estabilidad mecánica y la integridad de las células y tejidos epiteliales. Además, algunas queratinas también tienen funciones reguladoras y están involucradas en las vías de señalización intracelular, por ejemplo, protección contra el estrés, cicatrización de heridas y apoptosis. Típicamente, los filamentos de queratina se insertan en los desmosomas confiriendo estabilidad en las uniones intercelulares. (21) (22).

En consecuencia, contribuyen no solo a la estabilidad entre las células epiteliales en sí, sino también a la fijación de la membrana basal y en la medida en que el compartimento del tejido conectivo de un epitelio dado (22). Más allá de sus funciones biológicas, los patrones de expresión de queratina no sólo caracterizan a las células como "epiteliales", sino que también son características para distintas etapas, incluida la terminal, durante la diferenciación epitelial celular de embrionario a adulto o del programa de maduración interna durante el desarrollo (21) (22).

El objetivo del presente estudio fue identificar la expresión de proteínas típicas del epitelio Desmogleína, Desmoplaquina y citoqueratina 8 mediante la técnica de inmunofluorescencia en folículo dental. Nuestros hallazgos de sus patrones de expresión serán comparados con los reportados en estudios previos, y se discuten con respecto a su papel contribuyente en los procesos fundamentales del desarrollo, tales como la proliferación, diferenciación y transición epitelial.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras de folículo dental

Previo consentimiento, asentimiento informado y aval ético institucional, se obtuvieron gérmenes dentales de terceros molares. Las muestras de folículo se obtuvieron a partir de 4 terceros molares en estadio de nolla 5 indicados para exodoncia de pacientes sistémicamente sanos. Todas las muestras fueron obtenidas con previo consentimiento informado. Una vez realizado el procedimiento, quirúrgico las muestras fueron almacenadas en un medio de transporte enriquecido de Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Lonza) suplementado con 30 ml de antibiótico (Sigma), que luego fueron procesadas en el laboratorio.

1.1 Cultivo celular

Se realizó la técnica de cultivo celular por explante estandarizado previamente por la línea de investigación en los laboratorios de la Universidad Antonio Nariño. Una vez obtenidas las muestras de folículo dental fueron lavadas con solución salina buffer fosfato (PBS) marca

(BG&M[®]), cortadas en trozos de 2 mm aproximadamente con un bisturí y posteriormente los trozos colocados en frascos de cultivo de 25ml con una espátula.

Una vez los trozos se adhirieron a la superficie del frasco aproximadamente por 2 a 4 minutos, se les agregó 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 fueron incubadas a 37°C a 5 atm de CO₂. Se realizaron controles de crecimiento con microscopio invertido y se realizó 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) (24)

2. Análisis microscópico

En cada pasaje se realizó control de los cultivos celulares mediante microscopía óptica para verificar la confluencia de más del 70%. Una vez se verificó la confluencia se procedió a tripsinizar (Trypsina Gibco[®]) el cultivo celular para realizar el siguiente pasaje. Además, en cada pasaje se hizo control de calidad de los cultivos celulares. En esta evaluación microscópica se tuvieron en cuenta los parámetros descrito por Dominici (2006) (23) quien establece ciertos parámetros que están relacionados con las características morfológicas típicas de las células madre y adherencia a la superficie del frasco de cultivo.

2.1 Citometría de flujo

En el cuarto pasaje se realizó la caracterización de marcadores específicos para células mesenquimales CD90 (Affymetrix), CD45 (Affymetrix) y CD105 (Affymetrix); utilizando el servicio de Citometría de la Universidad Nacional de Colombia). El citómetro utilizado fue Citómetro de Flujo FACSCanto II - Configuración 4-2-2. Se utilizaron 600.000 células para este ensayo y un microlitro de anticuerpo diluido en 100 µl de PBS.

a. 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 realizó el análisis bajo microscopía. Se tomaron células como vivas aquellas que conserven su integridad de membrana y como muertas aquellas que estén teñidas de color azul. Se aplicó la siguiente fórmula para obtener el porcentaje de células viables (23) (24)

Ecuación 1 Formula de Viabilidad Celular

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

b. Análisis por Inmunofluorescencia

Se realizó ensayo de inmunofluorescencia directamente a las células del cuarto pasaje cultivadas en láminas para identificar marcadores de diferenciación epitelial (citoqueratina 8, Desmoplaquina y Desmogleína). En primer lugar, se permeabilizo las muestras con 0.1% tritón x-100, posteriormente, se hizo bloqueo con suero de caballo al 2.5%. Las muestras fueron incubadas a 4°C durante 1 hora con anticuerpo primario (Novus biologicals Cytokeratin 8, Novus biologicals desmoplakin, Novus biologicals desmogleín) y por media

hora con anticuerpo secundario. Finalmente, se realizó lavado con PBS y se contrasto con Solución fluorescente DAPI (Novus biologicals). Las láminas fueron cubiertas con cubreobjetos para su análisis en microscopio de fluorescencia (Vanguard 1400FL series). Se tuvo en cuenta un control negativo (células que no se le adicione anticuerpo primario).

La expresión de las proteínas fue analizada semi-cuantitativamente por dos investigadores independientes. La expresión será almacenada de la siguiente manera:

(+++) Fuerte expresión; (++) Media expresión; (+) Leve expresión; (+/-) Muy baja expresión; (-) 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.

RESULTADOS

Cultivo de las células del folículo dental

Los resultados encontrados en este estudio demostraron que los cultivos de células madre de folículo dental presentaron adherencia a la superficie del frasco de cultivo y proliferación celular. El cultivo primario obtenido se caracterizó por varios parámetros: tasa de proliferación, y (MSC con adecuada viabilidad celular).

Una vez iniciado el cultivo del explante, las células fueron observadas diariamente bajo microscopía óptica para evaluar morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica, según los criterios de la ISCT (Dominici et al.). A las 4 semanas de cultivo se observó la presencia de células madres mesenquimales con la morfología mencionada y adherencia al plástico. Las CMM de folículo dental alcanzaron una confluencia de un 80%. Se demuestra su capacidad de proliferación respectivamente (Imagen 1)

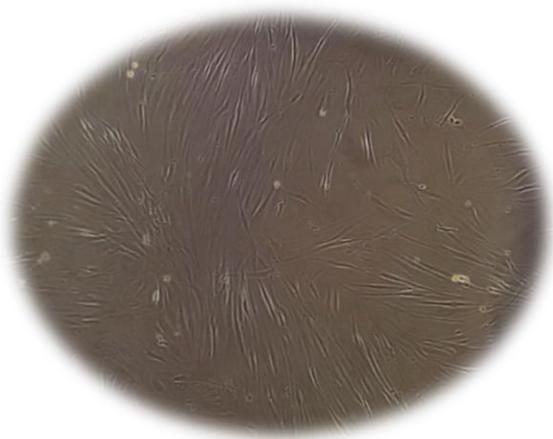


Imagen 1 Morfología fibroblastoide típica de células madre mesenquimales donde se observa adherencia a la superficie de cultivo

En cuanto a la proliferación celular en los dos primeros días no se observó crecimiento celular en el cultivo primario. Se pudo evidenciar crecimiento exponencial a partir de los 3 días después de realizar el cultivo primario. A los 15 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 22 días, el tercer pase a los 29 días y el cuarto pase a los 40 días. Se utilizó el pase cuatro para todas las pruebas formuladas en el apartado metodológico.

Caracterización celular

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⁻ 76,6(Figura 1)

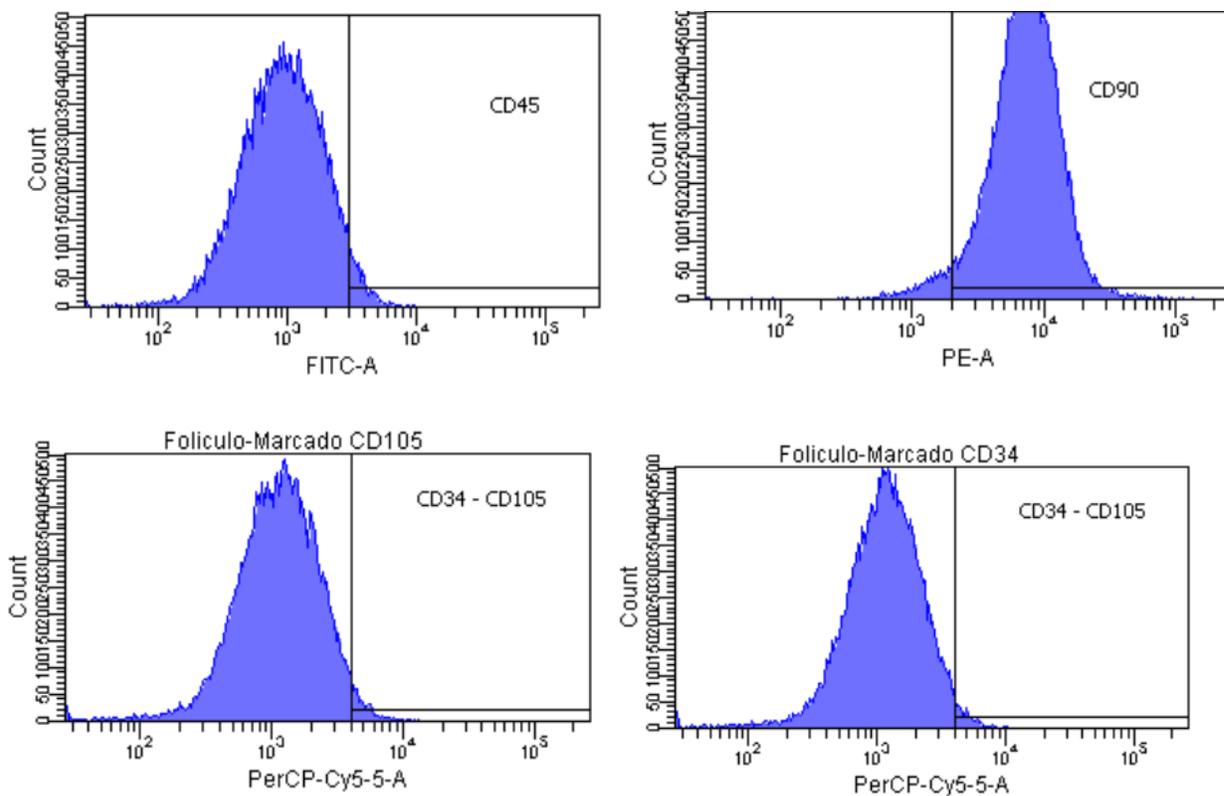
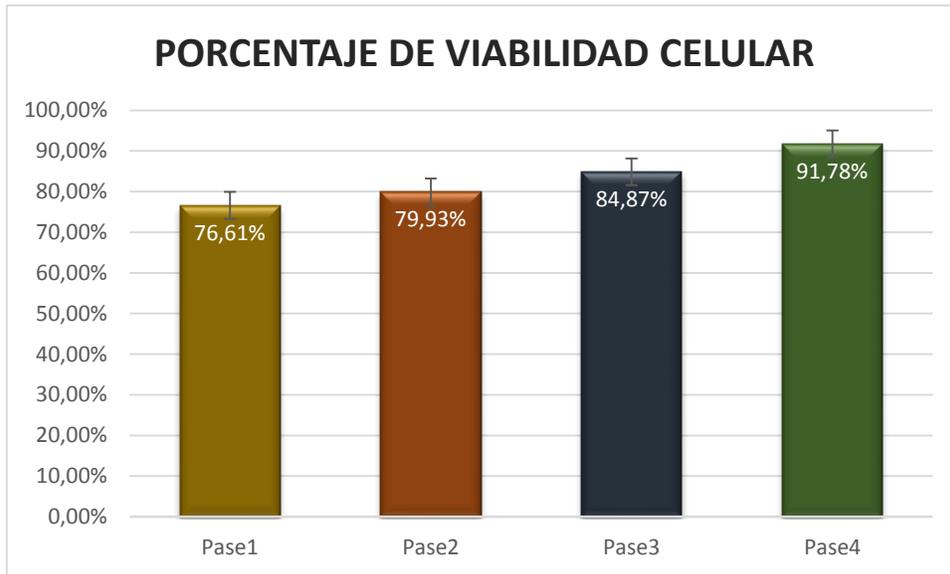


Figura 1 Histogramas de Citometría de flujo sobre la expresión de marcadores de superficie celular CD45, CD90, CD34 CD105 relacionados con células mesenquimales obtenidas de tejido folículo dental.

Expresión positiva de los marcadores de membrana CD90, expresión negativa de CD45, CD34 CD105.

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).

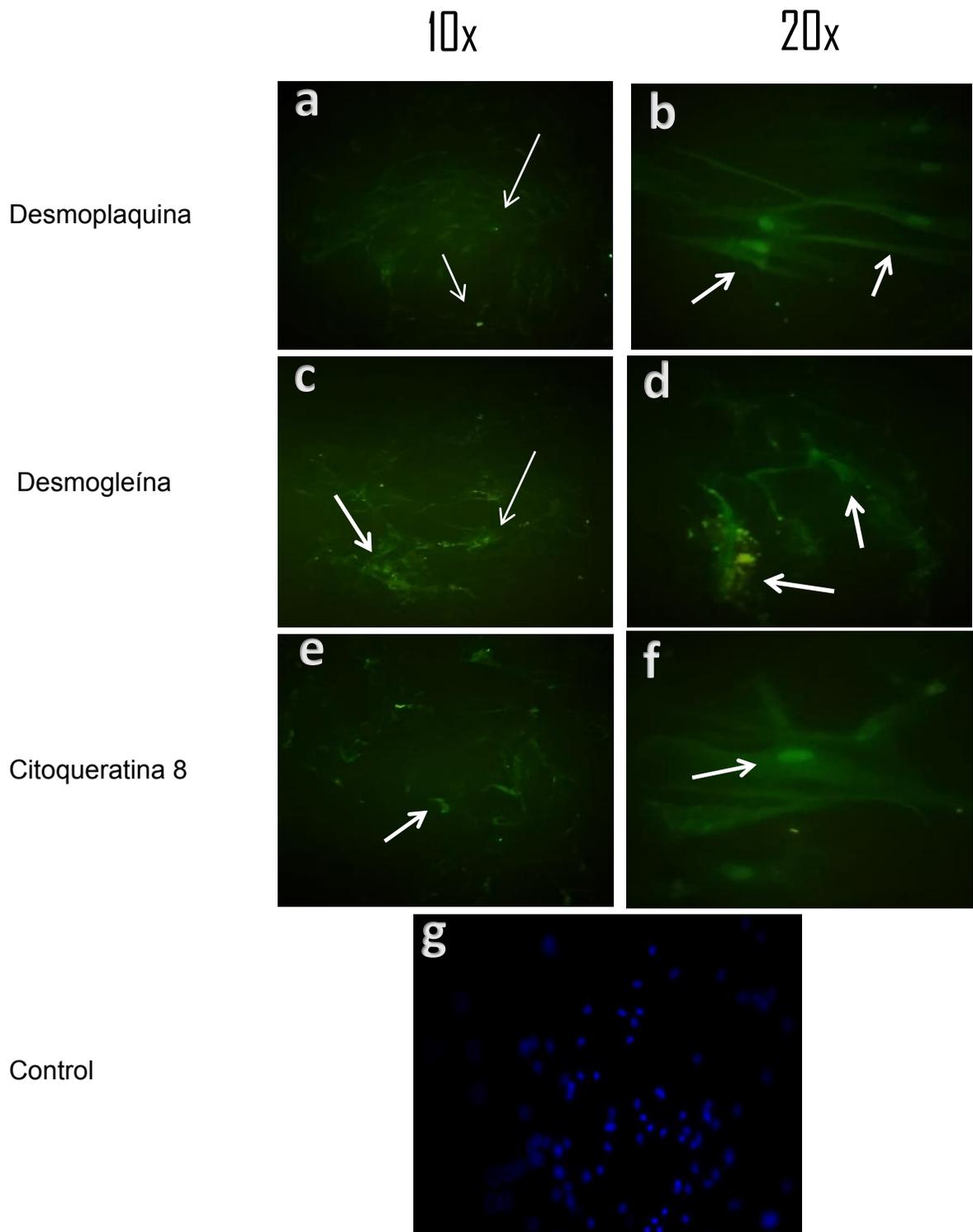


Gráfica 1 Porcentaje de Viabilidad en cada de uno de los Pasajes

Viabilidad celular promedio en células de fibroblastos humanos incubados. Valores medios de cuatro pasajes independientes para cada grupo experimental. Tercer y cuarto pasaje alcanzan una viabilidad celular superior al 80%.

Expresión de Citoqueratina 8, Desmogleína y Desmoplaquina

Los resultados encontrados en cuanto a la expresión de Citoqueratina 8, Desmogleína y Desmoplaquina; evidencian notable expresión de estas proteínas con una intensidad media de color verde. Sin embargo, cabe resaltar que la Desmogleína presentó una mayor inmunofluorescencia que se aprecia en ambas magnificaciones. Se observa expresión negativa en la microscopia de fluorescencia correspondiente al control (Figura1).



*Figura2 Resultados de Expresión a 10x y 20x. Microscopia de fluorescencia **a,e**. Leve expresión (+); **b,c,d,e y f**. Media expresión (++); **g**. Microscopia de fluorescencia correspondiente al control.*

DISCUSIÓN

Las células del folículo dental se han posicionado como una excelente fuente alternativa para la obtención de células madre, y han mostrado gran potencial para ser utilizadas en protocolos de Ingeniería Tisular. Diferentes estudios como el de Yamada (2014) o (25) encontraron la expresión de citoqueratinas en otras fuentes celulares, tales como células mesenquimales de la pulpa dental y células del germen dental.

El presente estudio caracterizó un modelo *ex vivo*, derivado de células madre de folículo dental, mediante la técnica de explante, cuyo objetivo fue identificar la expresión de proteínas típicas del epitelio; Citoqueratina 8, Desmogleína y Desmoplaquina para su posible utilización como fuente de células madre autólogas con aplicaciones clínicas. El modelo basado en explante fue confirmado por el mantenimiento de la composición, organización y arquitectura original del tejido.

Posterior al cultivo celular, objeto de investigación, se logró aislar y caracterizar a las células madre mesenquimales provenientes de tejido folículo dental, estas células fueron evaluadas y monitoreadas diariamente, evidenciándose desde el tercer día crecimiento exponencial, observando como características; morfología fibroblastoide y adherencia al plástico, parámetros propuestos por The International Society for cellular therapy posición statement (26), y que también reporta en su estudio Mitrano (2010) considerándose que cumple con las condiciones ideales de cultivo y proliferación celular.

La capacidad para adherirse al plástico de las células del presente estudio sobresalen, además de su crecimiento y confluencia que en este caso alcanzo el 80% a los 15 días de iniciar el cultivo, por lo cual en este día se decide realizar el primer pasaje, ya que se cumplían las condiciones necesarias para llevarlo a cabo, y es compatible con los resultados presentados en estudios previos (27). Las células no adherentes se eliminaron cambiando el medio.

En cuanto a la caracterización de marcadores, se evidencio la expresión positiva de CD90 definido como una glicoproteína marcador de superficie común al igual que CD105, que se expresa principalmente en leucocitos y que participa en las interacciones celulares entre sí y con la matriz celular (28), se presenta expresión negativa de CD34, CD45, CD 105, resultados obtenidos a través de la técnica de citometría de flujo y están en concordancia con lo reportado en otros estudios como el de Xiyao Pang (29), en donde hubo expresión negativa de CD45 y CD34 y expresión positiva de CD90 y CD105. Estos marcadores están caracterizados como marcadores de células mesenquimales, como lo describe Kawashima (2012) (30); sin embargo se plantea que un motivo por el cual no se expresen estos marcadores sea por hacer parte de tejidos hematopoyéticos.

En nuestra investigación evidenciamos un 91,78% de viabilidad celular, lo que permitió realizar un análisis a través de inmunofluorescencia. Realizando un análisis comparativo con estudios previos como el de Garzón (2015) quien realizo su estudio en células de la pulpa dental, encontramos que las células derivadas del folículo dental de nuestro estudio presentaron una mayor confluencia de aparición en relación a las reportadas en ese estudio (31). Sin embargo, esto puede estar relacionado 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 (2). Estos resultados observados a través de la técnica de inmunofluorescencia, reflejan la expresión de marcadores epiteliales Citoqueratina 8, desmogleína y desmoplaquina, niveles de expresión que se registraron de manera semicuantitativa por medio de una escala visual, siendo la desmogleína quien presento mayor expresión, seguida por las Citoqueratina 8, y desmoplaquina. Para nuestro estudio este resultado cobra vital importancia ya que no hay estudios que involucren estas proteínas en células mesenquimales de folículo dental.

Esta evidencia de los marcadores de expresión es muy importante, considerando que estas proteínas son fundamentales dada su conformación estructural brindan estabilidad mecánica e integridad a las células y tejidos epiteliales. Además, también poseen funciones reguladoras y están involucradas en las vías de señalización intracelular, por ejemplo, protección contra el estrés, cicatrización de heridas y apoptosis. (22)

De tal manera podemos establecer que el folículo dental puede ser una fuente viable y de fácil obtención de estas proteínas, pues son estratégicas para mejorar el soporte mecánico y estructural en los cultivos de elaboración de mucosa oral artificial; que sumadas con factores de crecimiento y biomateriales como reporta Kao (2009) (32) en sus estudios de mediadores biológicos, pueden utilizarse para la elaboración de tejidos artificiales en ingeniería tisular.

CONCLUSIONES

Los resultados preliminares proporcionan evidencia inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas típicas del epitelio Citoqueratina 8, Desmogleína y Desmoplaquina, obtenidas de tejido folículo dental, resultado que puede ser relevante para las investigaciones de ingeniería tisular, constituyendo un complemento útil para su utilización como alternativa estructural para la generación de tejidos orales o mucosa oral.

Los resultados reportados en este trabajo confirman la heterogeneidad, la viabilidad y la adecuada forma para seleccionar el mayor potencial de las células de folículo dental en concordancia al órgano o tejido a regenerar Como una fuente accesible con alto potencial de proliferación y diferenciación, las células madre del folículo dental emergen como una fuente alternativa para desarrollar protocolo de Ingeniería Tisular en los cuales las células nativas epiteliales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Menicanin D BP. Identification of a common gene expression signature associated with immature clonal mesenchymal cell populations derived from bone marrow and dental tissues. *Stem Cells Dev.* 2010 Oct; 19(10):1501-10. doi: 10.1089/scd.2009.0492.; 19(10) 1501-1510(doi: 10.1089/scd.2009.0492.).
2. Saito MT SK. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J Stem.* 2015 Julio; (2) 399-407(DOI: 10.4252/wjsc.v7.i2.399).
3. Jurga M LA. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 2009; 15 (365-372)(DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0485).
4. Reinke S DA. Qualifying stem cell sources: how to overcome potential pitfalls in regenerative medicine? *J Tissue Eng Regen Med.* 2014 Junio; 12(DOI: 10.1002/term.1923).
5. Kriegebaum U MM. Tissue engineering of human oral mucosa on different scaffolds: In vitro experiments as a basis for clinical applications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(5).
6. Viñuela-Prieto JM SQM. Sequential keratinocytic differentiation and maturation in a three-dimensional model of human artificial oral mucosa. *J Periodontal Res.* 2014 oct; 50(5).
7. Garzón I MJ. Wharton's jelly stem cells: a novel cell source for oral mucosa and skin epithelia regeneration. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2(8).
8. Hayward CJ FJ. Using human umbilical cord cells for tissue engineering: A comparison with skin cells. *Differentiation.* 2014; 83(7).
9. Heller M FOEV. Tissue engineered pre-vascularized buccal mucosa equivalents utilizing a primary triculture of epithelial cells, endothelial cells and fibroblasts. *Biomaterials.* 2016; 77(207-215).
10. Gronthos S MM. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 May; 97:13625–13630(DOI 10.1073 / pnas.240309797).
11. Iohara K IK. Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105+ stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A.* 2011; 17:1911–1920(doi: 10.1089 / ten.TEA.2010.0615.).
12. Silvério KG RT. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol.* 2010 Aug.; 81(8):1207-15(doi: 10.1902/jop.2010.090729).

13. Morsczeck C1 GW. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005 Apr; 24(2):155-65.(DOI: 10.1016/j.matbio.2004.12.004).
14. Guo L LJ. Comparison of odontogenic differentiation of human dental follicle cells and human dental papilla cells. *PLoS One.* 2013 19 de abril de 2013; 8 (4): e62332.(doi: 10.1371 / journal.pone.0062332).
15. Wang J LB. Effects of Wnt/ β -catenin signalling on proliferation and differentiation of apical papilla stem cells. *Cell Prolif.* 2012 Abril; 45:121-131.(doi: 10.1111 / j.1365-2184.2012.00806.x).
16. Fu X JL. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol.* 2014 Junio; 85:845-851(doi: 10.1902 / jop.2013.130254.).
17. Fukushima H KN. SSEA-4 is a marker of human deciduous periodontal ligament stem cells. *J Dent Res.* 2012. Octubre; 91:955-960(DOI: 10.1177 / 0022034512458123).
18. Kémoun P,LDS. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell and Tissue Research.* 2007 Agosto; 329 (2)(DOI: 10.1007/s00441-007-0397-3).
19. G B. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008 Jul; 31;16:1-9.
20. Bova RRM. Evaluation of bone regeneration potential of dental follicle stem cells for treatment of craniofacial defects. *Cytotherapy.* 2015 Noviembre; 17 issue 11(doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.013).
21. Krebs DL BK. Use of cytokeratin 8 immunohistochemistry for assessing cell death after radiofrequency ablation of breast cancers. *Biotechnic & Histochemistry.* 2011; 86(6).
22. Moll R DM. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 2008; 129(6).
23. K. DMLB. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4 (315-317)).
24. Aonuma H. Ogura N. Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell And Tissue Research.* 2018; 350(2).
25. Kitajima YR. Cytokeratin expression of engrafted three-dimensional culture tissues using epithelial cells derived from porcine periodontal ligament. *j Oral Pathol Med.* 2014; 43(637-645).
26. Blanc DML. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4 (315-317)).

27. Ti M. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue. *J. Periodontol.* 2010; 81(6 (917-925)).
28. Hagood RT. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB journal.* 2006; 20(1045-1054).
29. Martin-Piedra M GIOARC. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures.. *Cytotherapy.* 2014; 16((2) 266-77).
30. Kawashima. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol.* 2012 Noviembre; 57(11 (1439-58)).
31. Garzón I MM. Human dental pulp stem cells. A promising epithelial-like cell source. *Med Hypotheses.* 2015; 84(5).
32. K. YRK. Cytokeratin expression of engrafted three-dimensional culture tissues using epithelial cells derived from porcine periodontal ligament. *J Oral Pathol Med.* 2014; 43(637-645).
33. Bluteau. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008 Jul; 31;16:1-9.
34. Steimberg NAF. Advanced 3D Models Cultured to Investigate Mesenchymal Stromal Cells of the Human Dental Follicle. *TISSUE ENGINEERING: Part C.* 2018; Volume 24(3).