

CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO *in vitro* DE CÉLULAS AISLADAS EN DIFERENTES PORCIONES DE LA PULPA DENTAL HUMANA

Julio Alberto Montero Del Toro ^{1,2}, Geovanny Nic Can ^{2,3}, Beatriz Adriana Rodas Junco ^{2,3*}

¹ Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán, Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

² Laboratorio Traslacional de Células Troncales de Origen Bucal, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Yucatán, calle 61A x 90 y 92. Mérida, Yucatán, CP 97000.

³ CONACYT-Facultad de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Yucatán. Periférico Norte Kilómetro 33.5. Mérida, Yucatán, CP 97302.

Fecha de recepción: 26 de octubre de 2020 - Fecha de aceptación: 9 de agosto de 2021

Resumen

La pulpa dental representa una fuente accesible de células troncales con un enorme potencial terapéutico. En la literatura son escasos los reportes enfocados en el aislamiento y crecimiento de las células presentes en las diferentes porciones de la pulpa con fines para la obtención de células troncales. El objetivo del presente trabajo fue aislar y examinar las características de crecimiento de las células de las porciones coronal, media y apical de la pulpa dental humana. La pulpa fue extraída de un diente supernumerario donado por un paciente masculino de 8 años. Se analizó la masa y longitud de la pulpa con el fin de determinar los parámetros morfométricos para el aislamiento celular. Asimismo, en los cultivos celulares se evaluaron las características de morfología, densidad celular y eficiencia en la formación de unidades de colonias. Los resultados mostraron que 11.4 mg de masa de la pulpa permitió establecer tres cultivos celulares. En relación con la morfología, las células exhibieron una forma tipo fibroblastoide, pero también densidades celulares diferentes entre sí durante su cultivo. En relación con la eficiencia en la formación de colonias, la porción apical presentó la mejor eficiencia comparado con las porciones coronal y media. Estos resultados infieren que la porción apical de la pulpa de un diente supernumerario podría representar una fuente potencial para la obtención de células con características de cultivo *in vitro* similares a las células troncales.

Palabras clave: Células troncales, diente supernumerario, porción apical, porción coronal, pulpa dental.

*beatriz.rodas@correo.uady.mx; barodasju@conacyt.mx

CHARACTERIZATION OF THE *in vitro* GROWTH OF CELLS ISOLATED IN DIFFERENT PORTIONS OF THE HUMAN DENTAL PULP

Abstract

Dental pulp represents an accessible source of stem cells with enormous therapeutic potential. In the literature there are few reports focused on the isolation and growth of the cells present in the different portions of the dental pulp for the purpose of obtaining stem cells. The objective of the present work was to isolate and examine the growth characteristics of the cells of the coronal, middle and apical portions of human dental pulp. The dental pulp was extracted from a supernumerary tooth donated by an 8-year-old male patient. The pulp mass and length were analyzed to determine the morphometric parameters for cell isolation. Likewise, in the cell cultures the characteristics of morphology, cell density and colony forming efficiency were evaluated. The results showed that 11.4 mg of dental pulp mass allowed to establish three cell cultures. In relation to morphology, the cells exhibited a fibroblast-like shape, but also different cell densities from each other during their culture. Regarding the colony forming efficiency, the apical portion presented the best efficiency compared to the coronal and middle portions. These results infer that the apical portion of the pulp of a supernumerary tooth could represent a potential source for obtaining cells with *in vitro* culture characteristics like stem cells.

Keywords: apical portion, coronal portion, dental pulp, stem cells, supernumerary teeth.

1 Introducción

La pulpa dental (PD) es una masa de tejido conectivo extensamente vascularizado e innervado, que se encuentra contenida dentro de la cámara pulpar del órgano dentario (OD), (Gómez de ferraris y Campos (2019); Yildirim (2013). La PD es responsable de la formación de la dentina que conduce a la generación del esmalte, pero además cumple con funciones protectoras, sensoriales y de mantenimiento para la vitalidad del OD (Garma Álvarez 2019; Wei et al. 2007). Por otro lado, la cámara pulpar es una cavidad central que morfológicamente reproduce la forma del OD. Esta cavidad a su vez puede dividirse en la porción coronal y en la porción radicular. Del mismo modo se puede delimitar al tejido pulpar, la porción coronal de la PD es aquella contenida dentro de la corona del diente, que parte desde la línea del cuello anatómico hasta

el límite superior o techo de dentina, mientras que a la pulpa alojada en los conductos de la raíz se le denomina pulpa radicular (Gómez de ferraris y Campos, 2019; He et al., 2016). La pulpa radicular dividida por la mitad constituye dos porciones, la porción apical en el extremo más cercano a la punta de la raíz y la porción media comprendida entre los extremos apical y coronal (VanAmerongen et al. 1983). La PD en función de la matriz que conforma, alberga diferentes poblaciones celulares, principalmente odontoblastos, fibroblastos y células mesenquimáticas indiferenciadas o células troncales (Garma Álvarez 2019; Gómez de ferraris y Campos 2019; Yildirim 2013).

Las células troncales (CT) son células indiferenciadas de morfología fibroblastoide con elevadas capacidades de autorrenovación y diferenciación y cuya función es reponer la pérdida de células dañadas o en estado de muerte en los nichos donde se encuentran

(Montiel E. y Montiel J. 2012). Las células troncales de la pulpa dental (CTPD) fueron las primeras en ser aisladas de la cavidad bucal. Estas células poseen un enorme potencial terapéutico ya que los métodos para su obtención involucran métodos mínimamente invasivos y las limitaciones éticas y legales son escasas (Guadix et al. 2017; Rodas-Junco et al. 2017). Sin embargo, pocos son los estudios que se han enfocado en el análisis a nivel celular de las porciones coronal, media y apical de la PD con fines para el aislamiento de CT. Se ha reportado que a pesar de no existir barreras físicas entre las diferentes porciones, estas presentan composiciones diferentes en la estructura interna y densidad celular (Daud et al. 2014; Guerrero-Jiménez et al. 2019). Es por lo anterior que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar el crecimiento *in vitro* de las poblaciones celulares de las diferentes porciones de la PD humana, lo cual podría tener importantes aplicaciones para el aislamiento de las CT de origen dental.

2 Metodología

La presente investigación fue aprobada por el Comité De Ética En Investigación del Centro De Investigaciones Regionales “Dr. Hideyo Noguchi” de la Universidad Autónoma de Yucatán (Número de aprobación: CIE-06-2017).

2.1 Obtención del órgano dentario

El OD fue donado con previo consentimiento informado por un paciente masculino de 8 años, que ingresó a la Clínica de Odontopediatría de la UADY para la extracción quirúrgica de un diente supernumerario (Fig. 1). El OD fue extraído de forma íntegra sin lesiones de caries observables. Después, el OD se depositó en un tubo cónico que contenía una solución estéril de buffer de fosfatos (PBS 1X pH: 7.4) suplementado con una solución al 1% de antibiótico/antimicótico: A/A (penicilina [100 UI/mL] / estreptomina [100 µg/mL], Gibco). Posteriormente el OD fue transportado en un contenedor refrigerado al laboratorio de Cultivo Celular para su procesamiento.

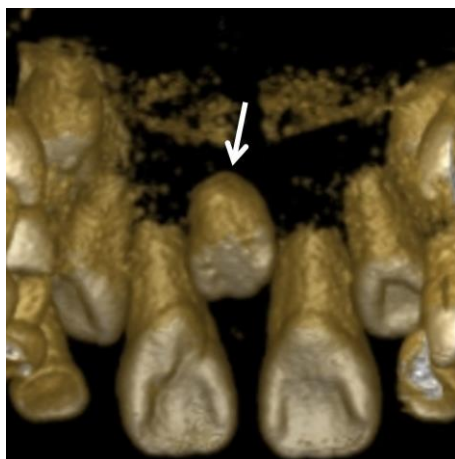


Figura 1. Localización del órgano dentario dentro de la cavidad bucal. Tomografía computarizada del diente supernumerario extraído a un paciente masculino de 8 años.

2.2 Determinación de la masa del órgano dentario y la pulpa dental.

Para evaluar si el peso de la PD con respecto al OD es un factor importante en la calidad de tejido para el aislamiento celular, se procedió a determinar la masa del tejido pulpar y del diente. Para la determinación de la masa del OD, se inició con el lavado de la pieza dental en una solución estéril de PBS 1X pH 7.4 suplementado con 1% de A/A con el fin de remover cualquier suciedad o restos de sangre. Después, el OD se depositó en un microtubo (Eppendorf) estéril y se transportó a una balanza analítica (cx220, Citizen) para determinar el peso del diente. Para el cálculo del peso del diente se determinó la diferencia de la masa del microtubo vacío (previamente pesado) y el peso del microtubo con el OD.

Para la obtención de la PD, se realizó un corte longitudinal en la periferia del OD, empleando un micromotor equipado con un disco rotatorio de diamante (22 mm de diámetro) aplicando una irrigación constante con PBS 1X frío 1% A/A para evitar que el tejido pulpar incrementara su temperatura. Finalizado el corte, la PD expuesta se removió cuidadosamente de la cámara pulpar con la ayuda de una pinza de disección y se depositó en un microtubo (Eppendorf) nuevo y estéril de 1.5 mL que contenía 1 mL de medio basal α -MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) complementado con 15% de suero bovino fetal (SBF, Gibco) y 1% solución A/A (medio basal completo). El procedimiento para determinar la masa de la PD fue igual al descrito con el OD.

2.3 Análisis morfométrico del órgano dentario y la pulpa dental

El análisis morfométrico se llevó a cabo con el fin de determinar los parámetros morfométricos del diente (peso) y el tejido pulpar (peso, altura y grosor) empleado para el aislamiento de las células en las diferentes porciones. Para ello, se hizo un registro fotográfico del OD y la PD (antes y después de

dividirla en porciones) utilizando una sonda periodontal de 15 mm (Carolina del Norte) en el mismo campo visual como referencia de longitud. El análisis fotográfico se realizó utilizando el software ImageJ v1.52.

2.4 Aislamiento celular en las diferentes porciones de la pulpa dental por el método del explante

Las porciones de la PD se obtuvieron mediante dos cortes transversales. Para ello primero se identificó a la porción coronal para separarla de la pulpa radicular. Esta última fue seccionada por la mitad para obtener las porciones media y apical respectivamente. Posteriormente, cada porción de la PD se disoció mecánicamente con la ayuda de una hoja de bisturí en una placa Petri. Después, los explantes de cada porción se depositaron en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro (Nest®) que contenían 1 mL de medio basal completo, conformando así el cultivo primario. Luego las cajas se incubaron bajo condiciones estándar de cultivo: 37°C, 5% de CO₂ con un cambio de medio cada 48 horas. Cuando los cultivos alcanzaron el 70% de confluencia, las células fueron expandidas al primer pase celular (P1) en cajas de cultivo T-75 (Nest®) con un inóculo inicial de 7×10^4 cel/mL y mantenidas con medio de cultivo α -MEM suplementado con 10% SBF y 1% A/A (medio basal completo al 10% SBF), bajo las condiciones de cultivo anteriormente mencionadas. La morfología, adherencia y proliferación celular se comprobaron mediante un microscopio invertido (TCM400, LABOMED).

2.5 Ensayo de clonogenicidad

Para evaluar la capacidad de las células aisladas de formar agregados clonogénicos durante su crecimiento, se llevó a cabo el ensayo de Unidades Formadoras de Colonias-tipo Fibroblastoides (UFC-F). Para dicho ensayo, se inocularon 100 cel/pozo en una placa de 12 pozos (cuatro réplicas por población celular) mantenidos con 800 μ L de medio basal

*beatriz.rodas@correo.uady.mx; barodasju@conacyt.mx

completo al 10% SBF. Las células se incubaron en condiciones estándar con cambios de medio cada 48 horas. Posteriormente, el cultivo se lavó tres veces con solución de PBS 1X pH 7.4 para eliminar completamente las trazas de medio de cultivo. Después, se agregaron 400 μ L de una solución al 0.5% (p/v) de cristal violeta durante 20 minutos con agitación constante. La caja de cultivo se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, para el conteo de las colonias celulares, se seleccionaron aquellas cajas de cultivo que tuvieran >50 células y se calculó la eficiencia de UFC-F (E_{UFC-F}) a partir del promedio del conteo de todas las réplicas (M_{UFC-F}) y el número inicial de células (N_i) (Sato et al. 2015), mediante la ecuación:

$$E_{UFC-F} = \left(\frac{M_{UFC-F}}{N_i} \right) \times 100 [=] \%$$

2.6 Análisis estadístico

Los datos de la E_{UFC-F} de las diferentes poblaciones se compararon entre sí mediante un análisis de varianza de un solo factor con la prueba post hoc de *t-Student*. La significancia estadística fue definida con un valor de $p < 0.05$.

3. Resultados y Discusión

3.1 Peso y morfometría del OD y la PD

La metodología empleada en el presente estudio para la determinación del grosor y la

altura de la PD se efectuó a través de un registro fotográfico, el cual permitió mantener la vitalidad del tejido pulpar debido a que el tiempo de medición fue menor comparado con el uso de instrumentos físicos como el vernier digital (Guerrero-Jiménez et al. 2019).

El peso del OD (Fig. 2A) utilizado en el presente estudio fue de 612.1 mg y el de la PD de 11.4 mg. Esto representa el 1.86% de la masa total del diente (**Error! Reference source not found.**). En relación con la PD, ésta presentó una morfología tubular acorde con la forma cónica del OD, lo que facilitó el reconocimiento de las porciones coronal, media y apical (Fig. 2B-C). De manera interesante, la altura de las porciones en su conjunto presentó una longitud mayor (9.876 mm) comparada con la PD sin procesar (8.013 mm) (Fig. 2B; Tabla 1). Esto puede deberse al relajamiento del tejido al ser procesado ya que la PD está compuesta por un 75% de agua y un 25 % de materia orgánica en la cual existen abundantes fibras elásticas que pierden tensión al ser seccionadas (Abreu Correa et al. 2011; Gómez de ferraris y Campos 2019). Asimismo, se pudo observar una variación de ± 0.31 mm de grosor entre las diferentes porciones, lo cual no representa una diferencia importante en longitud debido a la morfología de la PD estudiada.

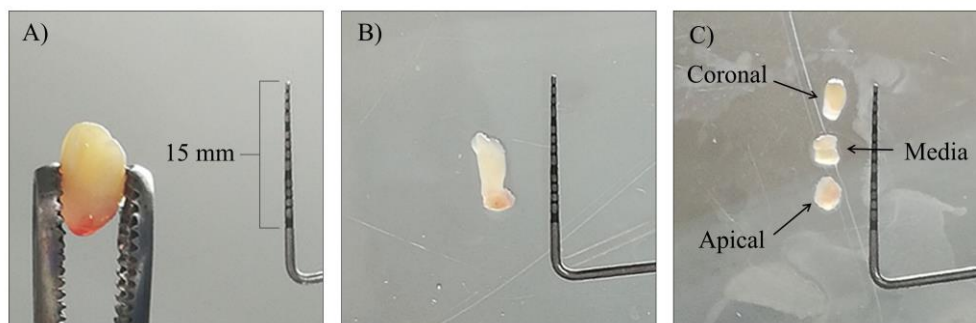


Figura 2. Obtención de las porciones de la pulpa dental. A) Órgano dentario previo al procesamiento junto a una sonda periodontal de 15 mm (Carolina del Norte) como referencia de longitud. B) Pulpa dental extraída de la cámara pulpar. C) Porciones coronal, media y apical de la pulpa dental.

Tabla 1. Peso y morfometría del órgano dentario y la pulpa dental

	Masa (mg)	Altura (mm)	Grosor (mm)
Órgano dentario	612.100	11.617	5.263
Pulpa entera	11.400	8.013	ND
Porción coronal	ND	4.208	2.103
Porción media	ND	2.915	2.013
Porción apical	ND	2.753	2.580

ND: No Determinado

Nuestro grupo de trabajo considera que la masa de la PD puede ser un parámetro importante para el aislamiento de células de la PD (Guerrero-Jiménez et al 2019). Sin embargo los reportes sobre medidas morfométricas en la PD en diferentes tipos de dientes son bastante limitados. Por ejemplo, Alsulaimani et al. (2016) reportaron una masa de 20 mg de PD obtenidos de dos dientes (sin especificar el tipo) de un mismo paciente para el aislamiento de células viables. En nuestro estudio se empleó 11.4 mg de PD de un diente supernumerario para establecer tres cultivos celulares. Estos resultados infieren que la masa de la PD en un diente supernumerario ofrece una fuente atractiva de obtención de PD para el aislamiento de células.

3.2 Aislamiento celular en las tres porciones de la PD

La caracterización morfológica de las células en las tres porciones de la PD se llevó a cabo mediante un récord fotográfico realizado a través de un microscopio de contraste de fases. Las células del cultivo primario en un lapso de 3-6 días presentaron una morfología redonda sin adherencia a la caja de cultivo. Esto podría deberse a la presencia de células derivadas de vasos sanguíneos en el tejido pulpar. La presencia de células adherentes fue observado después de 8 días del cultivo para las porciones coronal, media y apical respectivamente (Fig. 3 A-C), exhibiendo una morfología de tipo

fibroblastoide. La presencia de poblaciones celulares heterogéneas durante el establecimiento del cultivo primario es consistente con lo reportado en cultivos derivados de la PD por el método de explante realizado en este estudio (Eslaminejad et al. 2010; Gronthos et al. 2000; Patil et al. 2018; Stanislawski et al. 1997). De manera interesante, esta heterogeneidad marco también un comportamiento diferente para cada porción de la PD en su cultivo *in vitro*. Por ejemplo, las células de la porción coronal, presentaron una mayor densidad celular en el borde del tejido (Fig. 3A), contrario a lo observado en las células derivadas en las porciones media y apical. En el caso de las células aisladas en la porción media, la migración y adherencia de las células ocurrió a una distancia lejana del explante permaneciendo aisladas unas de otras (Figura 3B). El mismo comportamiento se observó en las células de la porción apical (Fig. 3C). De manera consistente, después de tres semanas de cultivo, las células derivadas de las tres porciones de la PD incrementaron notablemente su confluencia en la caja de cultivo (Fig. 3 D-F).

Por otro lado, un aspecto en el crecimiento de estas células fue la densidad celular. Las células de la porción media y apical presentaron mayor densidad comparado con la células de la porción coronal (Figura 4 A-C). Estas diferencias en la capacidad proliferativa se han

reportado en cultivos derivados de la pulpa coronal y radicular de dientes temporales y mesiodens (Gönen et al., 2019; Sato et al., 2015; Toriumi et al., 2015). La explicación a estas variaciones en el crecimiento podrían ser el resultado de los cambios fisiológicos implicados durante el proceso de formación del diente, ya que está reportado que la corona dental se forma tempranamente durante el desarrollo embrionario, mientras que la raíz en la etapa postnatal, lo que conlleva posibles

diferencias genéticas que dirigen la capacidad proliferativa de las células coronales y radicales (He et al. 2016). Por otro lado, se pudo observar en las poblaciones celulares una morfología tipo fibroblastoide (Fig. 4 D-F). Esta es una característica morfológica distintiva en las CT, lo cual hace inferir que en las tres porciones analizadas existen células indiferenciadas con una elevada capacidad proliferativa.

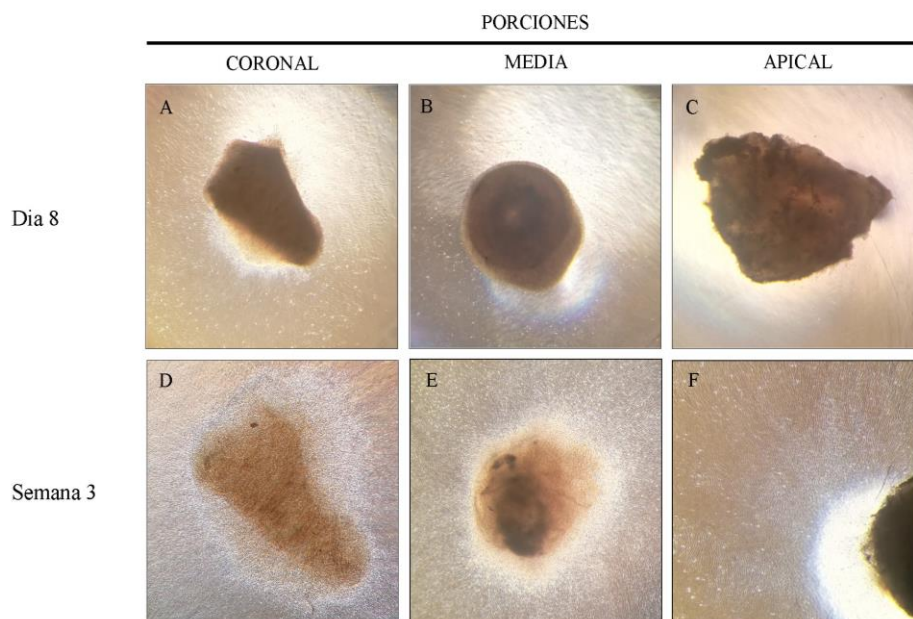


Figura 3. Cultivo celular de las diferentes porciones de la pulpa dental en etapa de explantes. (A–C) Microscopías a 4× después de 8 días de cultivo *in vitro* visto a través de un microscopio invertido de contraste de fases. (D–F) Células emergentes del explante después de 3 semanas de cultivo.

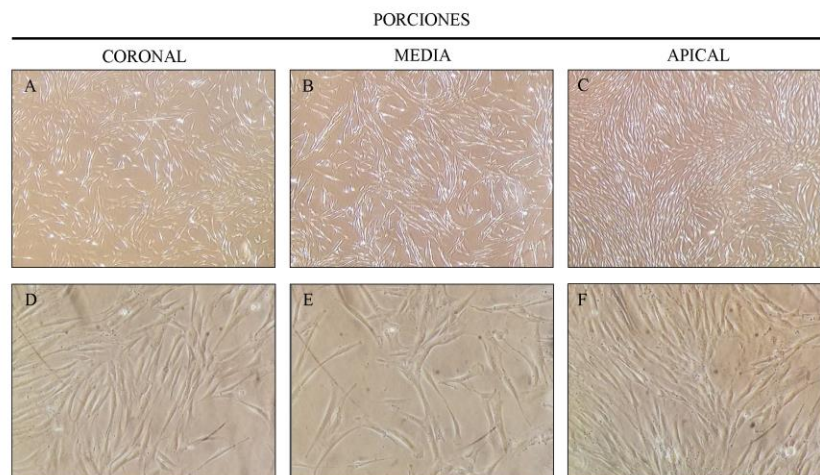


Figura 4. Densidad y morfología celular de los cultivos *in vitro* derivados de las diferentes porciones de la pulpa dental. (A-C) Microscopías a 4× de las poblaciones celulares bajo las mismas condiciones de cultivo después de 6 días a partir de in inoculo inicial de 7×10^4 células. (D-E) Magnificación a 20× de las poblaciones celulares donde se exhibe una morfología predominante de tipo fibroblastoide.

3.3 Ensayo de clonogenicidad

La capacidad proliferativa de las células de la porción coronal, media y apical fue evaluada mediante un ensayo de UFC-F donde se observó que las tres poblaciones celulares mostraron colonias después de 7 días de cultivo *in vitro*, presentando las células de la porción apical la mayor eficiencia de clonogenicidad (Fig. 5).

Los resultados obtenidos en este ensayo es consistente con lo reportado en las porciones coronal y radicular de la PD en dientes primarios (Toriumi et al. 2015). En ese estudio, los investigadores reportaron que la formación de colonias en la porción radicular fue 2.4 veces mayor que las colonias en la porción coronal mientras que en nuestro estudio fue 1.4

veces mayor. En otro estudio relacionado con dientes mesiodens, reportaron una mayor eficiencia de formación de colonias en las células derivadas de la raíz (19 %) comparado con la porción coronal (12%). En ese sentido, nuestros resultados son consistentes con lo reportado por esos autores. Es importante señalar que los resultados reportados por otros grupos de investigación en PD de dientes primarios y mesiodens, no consideran los parámetros morfométricos para establecer cuantitativamente a las porciones de la PD. Por ejemplo, para la porción media no se encontraron reportes que la distinguan de los extremos apical y coronal de la PD con fines para el aislamiento celular. Sin embargo, para una mejor comparación de nuestros resultados sería preciso en un futuro estudiar un mayor número de muestras del mismo tipo de diente.

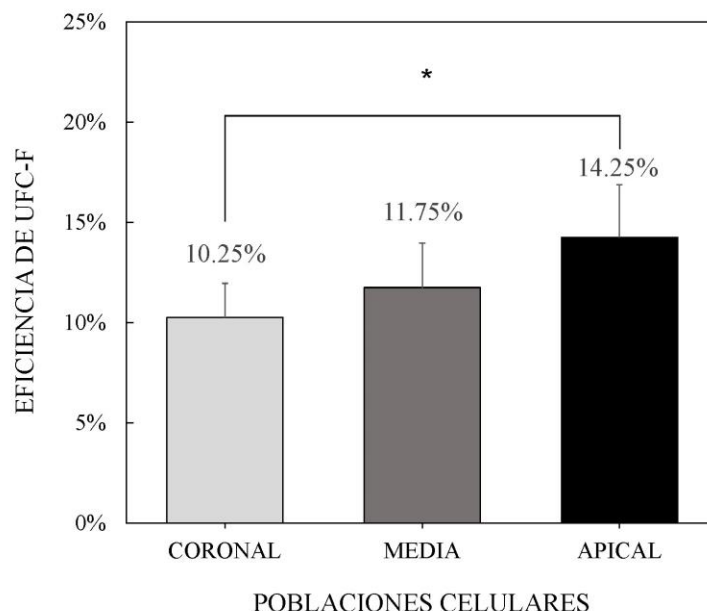


Figura 5. Eficiencia en la clonogenicidad de las células derivadas de las porciones de la pulpa dental. Las barras de error corresponden a la desviación estándar media de cada línea celular por cuadruplicado. * representa diferencia significativa de $p < 0.05$.

4. Conclusiones

En este estudio se abordó la caracterización del crecimiento de células aisladas en tres porciones de la pulpa dental de un diente supernumerario. Se demostró que las células aisladas de las porciones de la pulpa dental mostraron características de crecimiento *in vitro* similares a las células troncales. Este hallazgo no ha sido descrito antes en dientes supernumerarios y podría tener importantes aplicaciones en el aislamiento de células troncales en este tejido.

5. Agradecimientos

La presente investigación es financiada por el CONACYT en el marco del programa Cátedras-CONACYT (No. 1882). También se agradece al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Química y al Laboratorio Traslacional de Células Troncales de Origen Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán por el apoyo brindado.

6. Referencias

- Abreu Correa, J. M., Marbán González, R., Morffi López, I., & Ortiz de la Cruz, I. (2011). Complejo dentino pulpar. Estructura y diagnóstico. *Remij*, 12(1), 82–92.
- Alsulaimani, R. S., Ajlan, S. A., Aldahmash, A. M., Alnabaheen, M. S., & Ashri, N. Y. (2016). Isolation of dental pulp stem cells from a single donor and characterization of their ability to differentiate after 2 years of cryopreservation. *Saudi Medical Journal*, 37(5), 551. <https://doi.org/10.15537/smj.2016.5.13615>

- Daud, S., Nambiar, P., Hossain, M. Z., Ab Rahman, M. R., & Bakri, M. M. (2014). Changes in cell density and morphology of selected cells of the ageing human dental pulp. *Gerodontology*, 33(3), 315–321.
- Eslaminejad, M. B., Vahabi, S., Shariati, M., & Nazarian, H. (2010). In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*, 7(4), 185–195.
- Garma Álvarez, M. V. (2019). *Obtención de células troncales de pulpa dental de Premolares*. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma De Yucatán, Yucatán México.
- Gómez de ferraris, M., & Campos, A. (2019). Pulpa dental. En *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental* (3a ed., pp. 157–183). Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Gönen, Z. B., Selami, D., Aysegul, D., Sardogan, A., Abdullah, E., & Alper, A. (2019). Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived From the Apical Papilla of a Supernumerary Tooth Compared to Stem Cells Derived From the Dental Pulp. *Erciyes Medical Journal*, 41(1), 18–24. <https://doi.org/10.14744/etd.2019.62592>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Guadix, J. A., Zugaza, J. L., & Gálvez-Martín, P. (2017). Características, aplicaciones y perspectivas de las células madre mesenquimales en terapia celular. *Medicina Clinica*, 148(9), 408–414. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.11.033>
- Guerrero-Jiménez, M., Nic-Can, G. I., Castro-Linares, N., Aguilar-Ayala, F. J., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A., Peñaloza-Cuevas, R., & Rodas-Junco, B. A. (2019). In vitro histomorphometric comparison of dental pulp tissue in different teeth. *PeerJ*, 7, e8212. <https://doi.org/10.7717/peerj.8212>
- He, Y. D., Sui, B. D., Li, M., Huang, J., Chen, S., & Wu, L. A. (2016). Site-specific function and regulation of Osterix in tooth root formation. *International Endodontic Journal*, 49(12), 1124–1131. <https://doi.org/10.1111/iej.12585>
- Montiel-Eulefi, E., & Montiel, J. F. (2012). origen y migración de células troncales. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1332–1337. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022012000400013>
- Patil, V. R., Kharat, A. H., Kulkarni, D. G., Kheur, S. M., & Bhonde, R. R. (2018). Long term explant culture for harvesting homogeneous population of human dental pulp stem cells. *Cell Biology International*, 42(12), 1602–1610. <https://doi.org/10.1002/cbin.11065>
- Rodas-Junco, B. A., Canul-Chan, M., Rojas-Herrera, R. A., De-la-Peña, C., & Nic-Can, G. I. (2017). Stem cells from dental pulp: What epigenetics can do with your tooth. *Frontiers in Physiology*, 8, 899. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00999>
- Sato, M., Toriumi, T., Watanabe, N., Watanabe, E., Akita, D., Mashimo, T., Akiyama, Y., Isokawa,

- K., Shirakawa, T., & Honda, M. J. (2015). Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp from human mesiodentes. *Oral Diseases*, 21(1), e86–e97. <https://doi.org/10.1111/odi.12234>
- Stanislawski, L., Carreau, J. P., Pouchelet, M., Chen, Z. H., & Goldberg, M. (1997). In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clinical oral investigations*, 1(3), 131–140. <https://doi.org/10.1007/s007840050024>
- Toriumi, T., Takayama, N., Murakami, M., Sato, M., Yuguchi, M., Yamazaki, Y., Eto, K., Otsu, M., Nakauchi, H., Shirakawa, T., Isokawa, K., & Honda, M. J. (2015). Characterization of mesenchymal progenitor cells in the crown and root pulp of primary teeth. *Biomedical Research (Japan)*, 31(1), 31–45. <https://doi.org/10.2220/biomedres.36.31>
- Van-Amerongen, J. P., Lemmens, I. G., & Tonino, G. J. M. (1983). The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp. *Archives of Oral Biology*, 28(4), 339–345. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(83\)90076-6](https://doi.org/10.1016/0003-9969(83)90076-6)
- Wei, X., Ling, J., Wu, L., Liu, L., & Xiao, Y. (2007). Expression of Mineralization Markers in Dental Pulp Cells. *Journal of Endodontics*, 33(6), 703–708. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.02.009>
- Yildirim, S. (2013). Dental Pulp Stem Cells (DPSC). En *Dental Pulp Stem Cells* (pp. 25–40). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5687-2_4