

Identificación inmunohistoquímica de las citoqueratinas 14 y 19 durante el desarrollo dental

Immunohistochemical identification of cytokeratin 14 and 19 during dental development

Kevin Díaz-Rojas¹ ; Víctor Simancas-Escorcía^{1,2*} 

¹Universidad de Cartagena, Grupo de Investigación GITOU. Cartagena de Indias - Bolívar, Colombia; e-mail: kdiazr2@unicartagena.edu.co

²Universidad del Sinú, sede Cartagena, Grupo de investigación GENOMA. Cartagena de Indias - Bolívar, Colombia; e-mail: victor.simancas@unisnu.edu.co

*autor de correspondencia: victor.simancas@unisnu.edu.co

Cómo citar: Díaz-Rojas, K.; Simancas-Escorcía, V. 2024. Identificación inmunohistoquímica de las citoqueratinas 14 y 19 durante el desarrollo dental. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 27(2):e2486. <http://doi.org/10.31910/rudca.v27.n2.2024.2486>

Artículo de acceso abierto publicado por Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, bajo una Licencia Creative Commons CC BY-NC 4.0

Publicación oficial de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A, Institución de Educación Superior Acreditada en Alta Calidad por el Ministerio de Educación Nacional

Recibido: junio 24 de 2023

Aceptado: julio 16 de 2024

Editado por: Helber Adrián Arévalo Maldonado

RESUMEN

La formación de los dientes tiene gran importancia en la vida animal gracias a funciones, como la alimentación, la fonética o el ataque-defensa. La biomineralización fisiológica del desarrollo del órgano dental correspondiente al incisivo, diente de crecimiento continuo en ratones, constituye un modelo de investigación, que permite comprender los procesos involucrados en la formación de los tejidos mineralizados dentarios (esmalte y dentina) y periodontales (cemento y hueso alveolar). En estos procesos, pocos comprendidos fisiológicamente, participan epitelios y filamentos intermedios de citoqueratinas (CK). Actualmente, el conocimiento sobre la identificación, la distribución y la participación de las CK durante la odontogénesis, particularmente, las CK19 y CK14, es escaso. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue identificar y describir la expresión inmunohistoquímica de CK 19 y 14 durante el desarrollo dental. Para ello, se analizaron 12 incisivos de crecimiento continuo de ratones macho Swiss WT (Janvier, St Berthevin), de 7 días de nacidos. El estudio comprendió un análisis inmunohistoquímico con anticuerpos primarios monoclonales de conejo anti-CK 14 y anti-CK 19. Las observaciones se realizaron en un microscopio Leica DM6. Los resultados muestran que la CK19 se localiza en la lámina dental, las células del asa cervical y de la pulpa dental, mientras que la CK14, se localiza, esencialmente, en la lámina dental, ameloblastos y dentinoblastos. Se recomiendan futuros análisis inmunohistoquímicos (CK19/CK14) en ratones transgénicos, con el propósito de lograr una mayor comprensión de la función de estas CK, durante la formación dental.

Palabras clave: Citoqueratina; Desarrollo dental; Formación de tejidos; Inmunohistoquímica; Ratón.

ABSTRACT

Tooth formation is essential in animal life due to feeding, phonetics, or attack-defense functions. The physiological biomineralization of the dental organ development corresponding to the incisor, a continuously growing tooth in mice, constitutes a research model that allows an understanding of the processes involved in the formation of mineralized dental tissues (enamel and dentin) and periodontal tissues (cementum and alveolar bone). In these processes, which are poorly understood physiologically, epithelial cells and intermediate filaments of cytokeratins (CK) participate. Knowledge about the identification, distribution, and participation of CKs during odontogenesis, particularly CK19 and CK14, is scarce. Therefore, this study aimed to identify and describe the immunohistochemical expression of CK19 and CK14 during dental development. For this purpose, 12 continuously growing incisors from 7-day-old male Swiss WT mice (Janvier, St Berthevin) were analyzed. The study included an immunohistochemical analysis with primary monoclonal rabbit antibodies anti-CK14 and anti-CK19. Observations were made using a Leica DM6 microscope. The results show that CK19 is localized in the dental lamina, cervical loop cells, and dental pulp, while CK14 is essentially localized in the dental lamina, ameloblasts, and dentinoblasts. Future immunohistochemical analyses (CK19/CK14) in transgenic mice are recommended to better understand these CKs' function during dental formation.

Keywords: Cytokeratin; Dental development; Immunohistochemistry; Mouse; Tissue formation.

INTRODUCCIÓN

La odontogénesis (OG) es el proceso de formación de los dientes que involucra una serie de complejos mecanismos biológicos, tisulares y moleculares (Jheon *et al.* 2013; Takara *et al.* 2017). El desarrollo dental requiere de la participación del epitelio dental de origen ectodérmico y del ectomesénquima cefálico, derivado de las células de la cresta neural, donde acontecen interacciones entre los tejidos adyacentes, proceso denominado de inducción (Zhang *et al.* 2021). El proceso comienza con la formación de la lámina dental, engrosamiento del epitelio que reviste el estomodeo y que prolifera por mitosis dentro del ectomesénquima subyacente. La lámina dental continúa proliferando y se diferencia originando las estructural embrionarias de los gérmenes dentales. Así, atraviesa diferentes estadios, denominados de yema, casquete, campana inicial y campana aposicional. En el primer estadio, la condensación del epitelio en el extremo distal de la lámina dental y la condensación del mesénquima alrededor de éste, origina un engrosamiento redondeado o yema; sin embargo, el epitelio y el ectomesénquima se suelen separar por una membrana basal (Obara *et al.* 2017). La masa celular de origen ectodérmico formará, en futuro, el órgano del esmalte, mientras que el ectomesénquima, que rodea a la yema epitelial, dará origen a la papila dental.

En el segundo estadio, denominado casquete, ocurre una concavidad en el centro de la yema, tomando una forma semejante a un casquete. Esta invaginación ocurre como consecuencia de la activa proliferación de las células de los bordes laterales de la yema. Esta zona epitelial de la yema se denomina ahora órgano del esmalte, donde se diferencian un epitelio externo, uno interno y el retículo estrellado; además, estructuras transitorias, como el nudo del esmalte y la cuerda del esmalte (Peterkova *et al.* 2014). En la concavidad del casquete se localiza el ectomesénquima, que va a dar origen a la papila dental. En esta etapa, se expresan vías de señalización, como sonic hedgehog (SHH), proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) (Hosoya *et al.* 2020; Zhu *et al.* 2024). La desconexión de los órganos del esmalte con el epitelio bucal se produce en el estadio de campana, donde el futuro diente empieza a actuar como un tejido independiente (Hosoya *et al.* 2020). En el estadio de campana inicial aparece el estrato intermedio y, a partir del epitelio interno, se originan los preameloblastos y, luego, se transforman en ameloblastos jóvenes; estos últimos, interactúan con el ectomesénquima de la papila dental, iniciándose la diferenciación de los dentinoblastos que, luego, secretarán la matriz de la dentina. Al final de esta etapa, se diferencian los ameloblastos secretores que no secretarán matriz hasta que se forme la primera capa de dentina (Balzano *et al.* 2021).

En la etapa de campana aposicional, la dentina es el primer tejido mineralizado del diente que se forma, lo que induce a los ameloblastos, a la formación de la matriz y a su posterior mineralización. La fusión de los epitelios externo e interno forman el asa cervical, estructura encargada de formar la vaina epitelial radicular que, a posteriori, prolifera en profundidad y se diferencia formando la vaina epitelial de la raíz del diente, estructura fundamental para la formación de la raíz (Radlanski *et al.* 2015).

Por otro lado, las CKs son filamentos intermedios exclusivos de los tejidos epiteliales, de naturaleza variable, según la diferenciación de los epitelocitos. Las CK se clasifican en CK ácidas de bajo peso molecular, de tipo I y las citoqueratinas de alto peso, básicas o neutras de tipo II.

Estas CKs actúan en los procesos de diferenciación celular y cumplen la función de sostén, estabilidad e integridad de los epitelocitos (Jacob *et al.* 2018). La distribución de las CKs en los distintos epitelios es variable. CK1 y 10 se suelen encontrar en la capa supra-basal del epitelio estratificado escamoso cornificado, así como CK4 y CK13, se localizan en la capa supra-basal del epitelio estratificado escamoso no cornificado; CK5, se co-expresa con CK14 en capas basales y supra-basales de los epitelios escamosos, mientras que CK20 es un marcador específico de los epitelocitos táctiles, frecuentemente presentes en la mucosa oral cornificada (Li *et al.* 2015); sin embargo, son escasas las investigaciones que abordan la identificación de las CKs durante la odontogénesis en ratones (Yang *et al.* 2019).

Dada la limitada información sobre el rol que desempeñan las CKs durante el desarrollo dental, sería de gran interés detallar la distribución de estas proteínas durante el proceso de formación del diente. El objetivo del presente trabajo fue identificar y describir la expresión inmunohistoquímica de CK 19 y 14 durante el desarrollo dental de incisivos de ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 incisivos de ratones macho Swiss WT (Janvier, St Berthevin), de siete días de crecimiento continuo. Las mandíbulas se obtuvieron previa anestesia y perfusión con paraformaldehído (PFA, Sigma-Aldrich Co.), al 4 %. Se realizó la microdissección de los tejidos utilizando un estereomicroscopio (Leica MZ FLIII, Leica Microscopy Systems). Inicialmente, se aisló la mandíbula del hueso basal; luego, se eliminaron los tejidos blandos, previa extracción de los incisivos en erupción continua, mediante una cureta Gracey (Hu-Friedy). Los dientes recuperados se lavaron cuidadosamente con solución salina bufferada Dulbecco (DPBS, Invitrogen).

Luego de la microdissección, los incisivos se fijaron por inmersión en paraformaldehído a 4 % (PFA, Sigma-Aldrich Co.) y glutaraldehído al 0,1 % (Sigma-Aldrich Co.), durante 24 horas. Posteriormente, se descalcificaron en EDTA al 10 %, durante 4 semanas; luego, se realizó la técnica de inclusión en parafina. Obtenido los bloques, se realizaron cortes de 6 µm, con un micrótopo Leica RM2125 RST. Finalmente, se identificaron las láminas que contenían cortes, cuyo aspecto morfológico podía ser verificado, mediante la coloración de Hematoxilina y eosina.

Inmunohistoquímica. Luego de seleccionar los cortes de los incisivos, se desparafinizaron y rehidrataron. Los cortes se colocaron en peroxidasa endógena durante 10 minutos y se lavaron con PBS1X. Los tejidos se incubaron durante 1 hora en la solución bloqueadora del kit Universal Quick Kit, Vectastain, Vector Laboratories, England. Inmediatamente, los cortes se incubaron

con los anticuerpos primarios a 4 °C, durante toda la noche. Posteriormente, las láminas permanecieron en contacto con el anticuerpo secundario biotinilado a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Previo lavado con PBS1X, los cortes se incubaron con diaminobencidina (Sistema Impact DAB, Nova Red; Vector Laboratories, England), por un tiempo máximo de 10 minutos, seguido de un lavado en agua destilada. Finalmente, se procedió al montaje de los cortes.

Para la técnica inmunohistoquímica se emplearon anticuerpos primarios monoclonales de conejo anti-CK14 [EP1612Y – aa 400-extremo c-terminal] (1:500, ab51054-abcam) y anti-CK 19 [EP1580Y] (1:500, ab52625-abcam). Como control positivo se empleó el anticuerpo primario policlonal anti-amelogenina (1:600, ab153915-abcam - AMG aa 1-191). El control negativo fue realizado sin la presencia del anticuerpo primario, reemplazado por la solución bloqueadora. Todas las observaciones se realizaron con un microscopio Leica DM6, al que se acopló una cámara fotográfica.

Aspectos éticos: Se respetó la resolución 008430 de 1993 de la República de Colombia. Los experimentos se realizaron según los principios internacionales de las 3R y las pautas para el cuidado y

uso de animales de laboratorio, en concordancia con la Guide for the care and use of laboratory animals (Degrazia *et al.* 2019). Este trabajo contó con el aval del comité de ética en investigación de la Universidad de Cartagena, Colombia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación inmunohistológica realizada puso en evidencia el proceso de desarrollo fisiológico presente en la formación dental. Esta observación permitió distinguir aquellas células de origen epitelial y de origen ectomesenquimático.

Se evidenciaron papilas dentales con múltiples células con núcleos ovalados de origen ectomesenquimático en toda su extensión. En el centro del órgano del esmalte se observaron algunas células con forma de estrella, formando el retículo estrellado, limitado, por fuera, por el epitelio dental externo y, por dentro, por el epitelio dental interno del esmalte (Figura 1). Alrededor del germen del esmalte se puede presenciar un ectomesénquima condensado, que constituía el saco dental. La localización inmunohistoquímica de CK19 era evidente en las zonas periféricas de ambos epitelios del órgano del esmalte (interno y externo), con una expresión inmunohistoquímica moderada (Figura 2a).

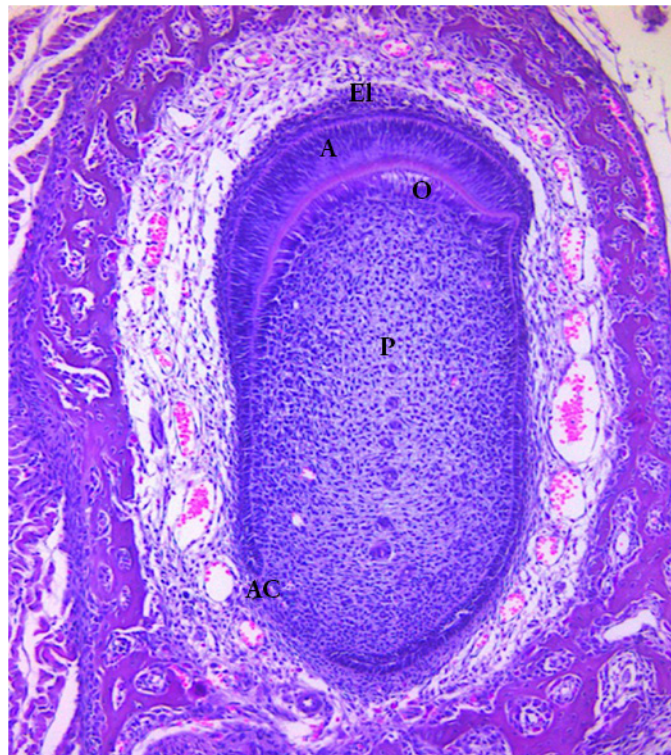


Figura 1. Aspecto anatómico de Incisivo de crecimiento continuo de ratón Swiss WT, de siete días posnatal. EI: estrato intermedio; A: ameloblastos; O: dentinoblastos; P: pulpa dental; AC: asa cervical. Coloración hematoxilina-eosina.

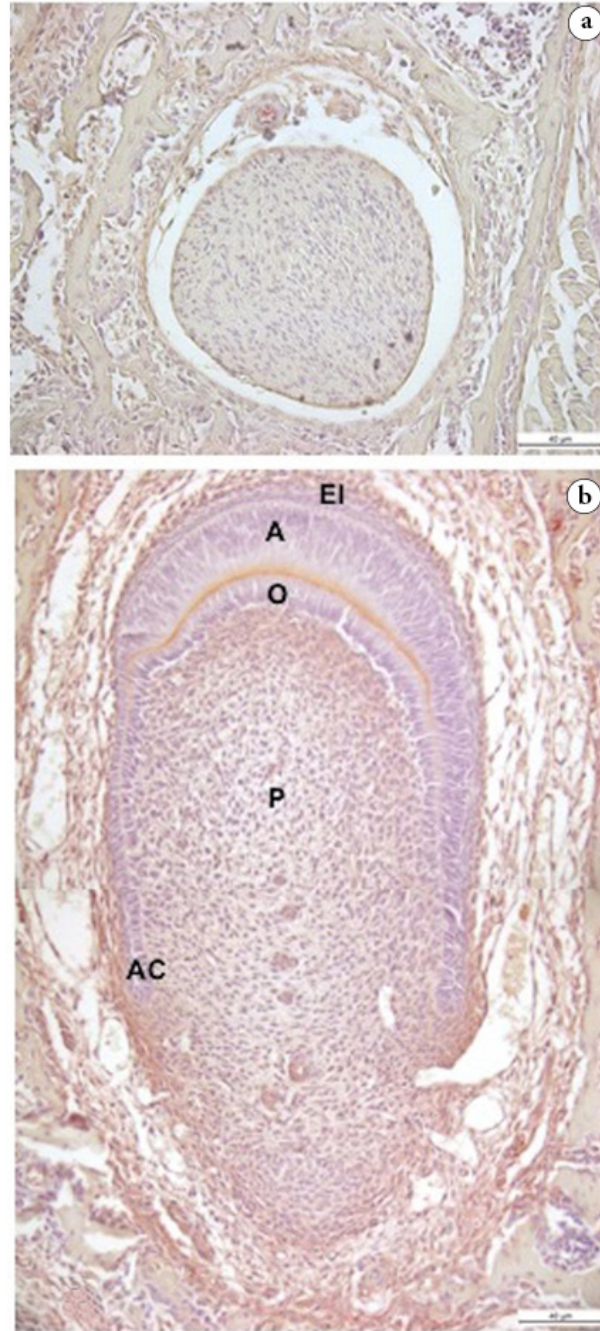


Figura 2. a) Expresión inmunohistoquímica de CK19 durante el inicio de la histodiferenciación celular. b) Expresión inmunohistoquímica de CK19 en etapas finales de la histodiferenciación celular, coincidente con la formación del esmalte dental. En marrón: inmunodetección de la CK19. EI: estrato intermedio; A: ameloblastos; O: dentinoblastos; P: pulpa dental; AC: asa cervical. Barra negra: 40 μ m (A,B).

En un estadio más avanzado, se observó la diferenciación de las células del órgano del esmalte en ameloblastos, debajo de la capa suprabasal y el comienzo de la aposición del esmalte. La condensación de los componentes ectomesenquimáticos que rodeaban al diente era bien manifiesta y la papila dental mostró un aumento de la proliferación celular. La expresión de CK19 era muy marcada en la zona de los tejidos epiteliales, principalmente, en la zona externa que rodea la formación del diente, incluyendo, las células de la zona que serán las futuras raíces dentales (asa cervical) (Figura 3b).

Las células de la papila dental próximas al órgano del esmalte mostraron una notoria expresión de CK19, mientras que su expresión en las células del órgano del esmalte era inferior, al compararla con las células de la papila dental. Se identificaron inmunomarcajes con CK19 en la matriz de esmalte recién sintetizada (Figura 3a). En las células distribuidas cerca de la zona del asa cervical, se observó la mayor expresión de CK19, estructura fundamental para el desarrollo radicular (Figura 3b).

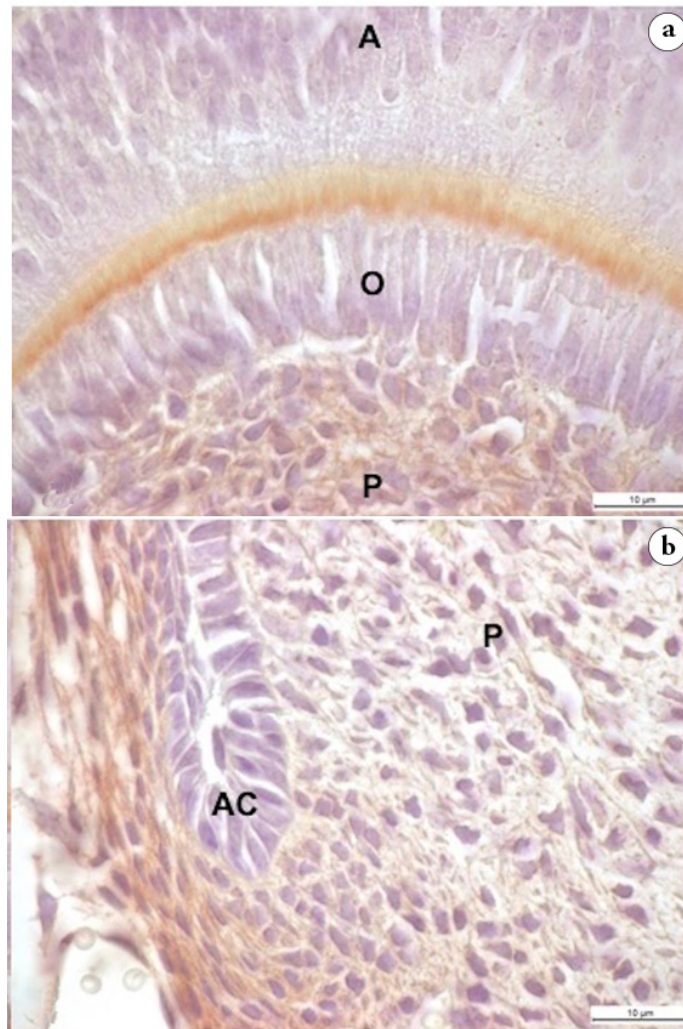


Figura 3. a) Inmunolocalización de la CK19 durante la etapa inicial de secreción de la matriz del esmalte dental. b) Localización inmunohistoquímica de la CK19 en la zona del asa cervical del incisivo dental. En marrón: inmunodetección de la CK19. A: ameloblastos; O: dentinoblastos; P: pulpa dental; AC: asa cervical. Barra negra: 10 µm (A,B).

En el análisis inmunohistológico de la CK14 en los incisivos de crecimiento continuo, se identificaron células morfológicamente normales, que conservaron su polaridad celular. Estas células presentaban núcleos ovalados, incluyendo, aquellas células situadas dentro de la papila dental. La localización inmunohistoquímica de la CK14 estuvo presente en células, que surgieron de la unión del epitelio dental externo y del epitelio dental interno, con un marcaje más acentuado en las células del estrato intermedio y en las células situadas en la periferia de la pulpa dental (Figura 4). En una observación más detallada, se pudo constatar que los ameloblastos, dentinoblastos y una población importante de células, próximas del asa cervical, eran positivas para CK14 (Figura 4). En la tabla 1 se resumen las principales localizaciones inmunohistoquímica de las proteínas CK19 y CK14, durante la odontogénesis.

La inmunomarcación con las CKs empleadas fue evidente en distintas etapas de la odontogénesis. La inmunolocalización de estos filamentos intermedios (CK19, CK14) pone en evidencia su importancia fisiológica en la formación dental. En la presente

investigación, el patrón de expresión de la CK19, estudiado en los incisivos de crecimiento continuo, fue más pronunciada en las células del estrato intermedio, matriz del esmalte recién sintetizado y algunas células presentes en la periferia de la pulpa dental, a diferencia de los ameloblastos y dentinoblastos. La CK19 es proteína ácida de la familia de CKs, habitualmente, expresada en células basales de epitelios escamosos (Akhila *et al.* 2021). Se ha informado que la expresión de la CK19, cuando ocurre en células suprabasales de epitelios no cornificados, se relaciona con los diferentes grados de la displasia epitelial (Safadi *et al.* 2020); sin embargo, en la literatura consultada no se investigó en estudios previos esta expresión durante el proceso fisiológico de la formación dental, en incisivos de ratones.

Aunque la expresión de la CK19 se presenta en diversas condiciones patológicas sistémicas, como fue reportado, también, se describe su presencia en los hepatocitos humanos normales y su importancia durante el desarrollo embrionario del hígado (Lee *et al.* 2020; Koike *et al.* 2022), en las células madre de la epidermis y su rol durante la

reparación de heridas (Sukmawati *et al.* 2020). En este estudio, la detección inmunohistoquímica de la CK19 en las células presentes a la zona adyacente del asa cervical sería indicativo de la elevada presencia de células madre en una zona formadora de la futura raíz dental. Por su parte, la inmunolocalización de la CK19 en la zona rica en células de la pulpa dental, mostraría la localización de

células precursoras totipotenciales de la pulpa dental, posiblemente, responsables de dar origen a células, como dentinoblastos y endotelocitos. Los hallazgos de la CK19 en estas localizaciones celulares permiten corroborar que una mayor expresión de CK19 se relaciona con un mayor potencial proliferativo y troncalidad celular, tal como ha sido reportado por Li *et al.* (2021).

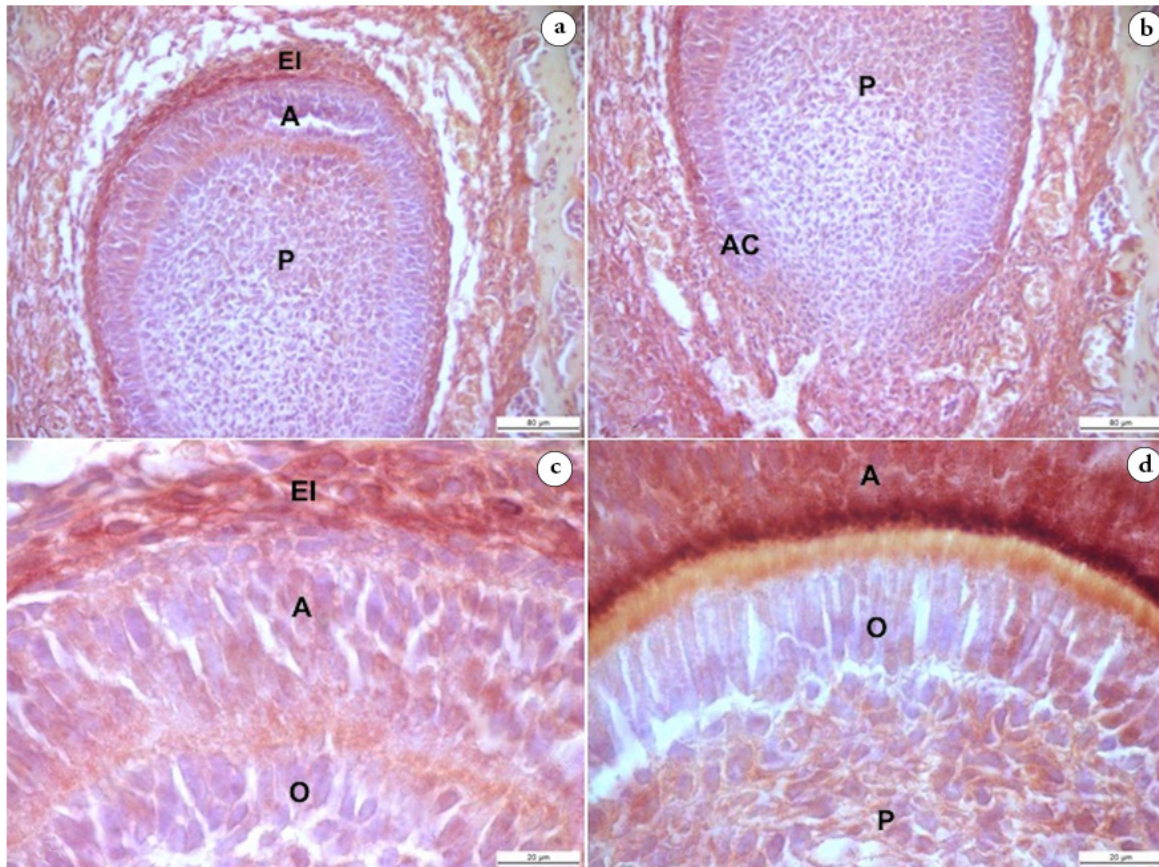


Figura 4. Expresión inmunohistoquímica de CK14 en estrato basal y células pulpares. Inmunolocalización de la CK14 en ameloblastos, y dentinoblastos. En marrón: inmunodetección de la CK14. EI: estrato intermedio; A: ameloblastos; O: dentinoblastos; P: pulpa dental; AC: asa cervical. Barra negra: 80 µm (a, b) y 20 µm (c, d).

Tabla 1. Inmunolocalización de CK19 y CK14 en tejidos dentales.

Marcador inmunohistoquímico	Estrato intermedio	Ameloblastos	Dentinoblastos	Pulpa dental	Asa cervical
CK19	No	No	No	Si	Si
CK14	Si	Si	Si	Si	Si

La identificación inmunohistoquímica permitió constatar la CK18, considerada la citoqueratina ácida de menor peso molecular, en estructuras, como la lámina dental y el epitelio del esmalte. La identificación de la CK18, ubicada en estas regiones anatómicas, se relacionaría con áreas de elevada migración celular (Infante *et al.* 2022). Es bien conocido que la CK18 brinda un andamiaje

intracelular al citoplasma y contribuye a las diferentes tensiones a las que son sujetas las células, particularmente, durante el proceso de morfodiferenciación celular, acontecido en la odontogénesis; no obstante, las funciones de la CK18 también involucran a la progresión del ciclo celular, señalización y procesos celulares, como la mitosis y la apoptosis (Cheng *et al.* 2019).

La localización de la CK18 en el estrato intermedio indicaría que esta zona del germen dental se encuentra regulada, a través de vía de señalización, que facilitan la motilidad celular (Infante *et al.* 2022). Aunque el presente trabajo de investigación no incluyó la identificación de vías de señalización, estudios precedentes han informado que en el mecanismo de regulación del crecimiento con participación activa de la CK18 involucran a la fosfoinositida 3-quinasa (PI3K)/Akt. Todo indicaría que la interacción entre vía PI3K/Akt con el citoesqueleto regularía el normal desarrollo de procesos proliferativos, tal como ocurre durante la odontogénesis (Deng *et al.* 2022). Con el propósito de mejorar la comprensión de la CK18 en la formación de tejidos dentales es menester lograr la identificación de nuevas proteínas relacionadas con la CK18 y analizar en modelos animales, por ejemplo, ratones transgénicos, las posibles modificaciones presentes durante la formación de los dientes dental.

De los resultados obtenidos se puede concluir que las CK19 y CK14 fueron inmunohistoquímicamente identificadas en los incisivos, dientes de crecimiento continuo, de ratones macho Swiss. La CK19 se localiza en la lámina dental, las células que rodean el asa cervical y células de la pulpa dental, mientras que la CK14 se localiza en la lámina dental, ameloblastos y dentinoblastos.

Conflictos de intereses: El artículo fue redactado y revisado por todos los autores, quienes declaran que no existen conflicto de intereses que pongan en riesgo la validez de los resultados presentados. Contribución autores: Kevin Díaz-Rojas y Víctor Simancas-Escorcia realizaron la curaduría y el análisis formal de los datos para la escritura del borrador del manuscrito; asimismo, contribuyeron con la investigación en campo y manejo de recursos. Particularmente, Víctor Simancas-Escorcia lideró la contextualización y la metodología del manuscrito. Todos los autores participaron en la redacción, la revisión, la edición del manuscrito y la versión final. Financiación: Este estudio fue autofinanciado.

REFERENCIAS

- AKHILA, C.N.V.; SREENATH, G.; PRAKASH, A.R.; KANTH, M.; REDDY, A.V.S.; KUMAR, S.N. 2021. Expression of stem cell marker cytokeratin 19 in reduced enamel epithelium, dentigerous cyst and unicystic ameloblastoma - A comparative analysis. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 25(1):136-140. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_316_19
- BALZANO, R.; STELLINI, E.; MUCIGNAT-CARETTA, C. 2021. Cell differentiation and replication during postnatal development of the murine first molar. *Biology*. 10(8):776. <https://doi.org/10.3390/biology10080776>
- CHENG, Y.; QIN, K.; HUANG, N.; ZHOU, Z.; XIONG, H.; ZHAO, J.; ZHANG, Y.; YU, S. 2019. Cytokeratin 18 regulates the transcription and alternative splicing of apoptotic related genes and pathways in HeLa cells. *Oncology Reports*. 42(1):301-312. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7166>
- DEGRAZIA, D.; BEAUCHAMP, T.L. 2019. Beyond the 3 Rs to a more comprehensive framework of principles for animal research ethics. *ILAR journal*. 60(3):308-317. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz011>
- DENG, S.; LEONG, H.C.; DATTA, A.; GOPAL, V.; KUMAR, A.P.; YAP, C.T. 2022. PI3K/AKT Signaling Tips the balance of cytoskeletal forces for cancer progression. *Cancers*. 14(7):1652. <https://doi.org/10.3390/cancers14071652>
- HOSOYA, A.; SHALEHIN, N.; TAKEBE, H.; SHIMO, T.; IRIE, K. 2020. Sonic Hedgehog signaling and tooth development. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(5):1587. <https://doi.org/10.3390/ijms21051587>
- INFANTE, E.; ETIENNE-MANNEVILLE S. 2022. Intermediate filaments: Integration of cell mechanical properties during migration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 10:951816. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.951816>
- JACOB, J.T.; COULOMBE, P.A.; KWAN, R.; OMARY, M.B. 2018. Types I and II keratin intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 10(4):a018275. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018275>
- JHEON, A.H.; SEIDEL, K.; BIEHS, B.; KLEIN, O.D. 2013. From molecules to mastication: the development and evolution of teeth. *Wires Mechanism of Disease*. 2(2):165-182. <https://doi.org/10.1002/wdev.63>
- KOIKE, N.; TADOKORO, T.; UENO, Y.; OKAMOTO, S.; KOBAYASHI, T.; MURATA, S.; TANIGUCHI, H. 2022. Development of the nervous system in mouse liver. *World Journal of Hepatology*. 14(2):386-399. <https://doi.org/10.4254/wjh.v14.i2.386>
- LEE, S.M.L.; BERTINETTI-LAPATKI, C.; SCHIERGENS, T.S.; JAUCH, K.W.; ROTH, A.B.; THASLER, W.E. 2020. Concurrent isolation of hepatic stem cells and hepatocytes from the human liver. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*. 56(3):253-260. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00433-w>
- LI, B.; TANG, H.; BIAN, X.; MA, K.; CHANG, J.; FU, X.; ZHANG, C. 2021. Calcium silicate accelerates cutaneous wound healing with enhanced re-epithelialization through EGF/EGFR/ERK-mediated promotion of epidermal stem cell functions. *Burns & Trauma*. 9:tkab029. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkab029>
- LI, S.; GE, S.; YANG, P. 2015. Expression of cytokeratins in enamel organ, junctional epithelium and epithelial cell rests of Malassez. *Journal of Periodontal Research*. 50(6):846-854. <https://doi.org/10.1111/jre.12272>

- MINISTERIO DE SALUD, COLOMBIA. 1993. Resolución número 8430 de 1993, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. Disponible desde Internet en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>
- OBARA, N.; SUZUKI, Y.; IRIE, K.; SHIBATA, S. 2017. Expression of planar cell polarity genes during mouse tooth development. *Archives of Oral Biology*. 83:85-91. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.07.008>
- PETERKOVA, R.; HOVORAKOVA, M.; PETERKA, M.; LESOT, H. 2014. Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Australian Dental Journal*. 59(1):55-80. <https://doi.org/10.1111/adj.12130>
- RADLANSKI, R.J.; RENZ, H.; ZIMMERMANN, C.A.; MEY, R.; MATALOVA, E. 2015. Morphogenesis of the compartmentalizing bone around the molar primordia in the mouse mandible during dental developmental stages between lamina, bell-stage, and root formation (E13-P20). *Annals of Anatomy*. 200:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2015.01.003>
- SAFADI, R.A.; ALROMAIZAN, A.; ALSHAGROUD, R.S.; DIVAKAR, D.D.; ALSHIEBAN, S. 2020. Cytokeratin 19 immunostain reduces variability in grading epithelial dysplasia of the non-keratinized upper aerodigestive tract mucosa. *Head and Neck Pathology*. 14(1):183-191. <https://doi.org/10.1007/s12105-019-01038-w>
- SUKMAWATI, D.; ERYANI, A.; DAMAYANTI, L. 2020. Silver sulfadiazine's effect on keratin-19 expression as stem cell marker in burn wound healing. *Biomedicine*. 10(2):5-11. <https://doi.org/10.37796/2211-8039.1014>
- TAKARA, K.; MARUO, N.; OKA, K.; KAJI, C.; HATAKEYAMA, Y.; SAWA, N.; KATO, Y.; YAMASHITA, J.; KOJIMA, H.; SAWA, Y. 2017. Morphological study of tooth development in podoplanin-deficient mice. *PLoS One*. 12(2):e0171912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171912>
- YANG, X.; YAMAZAKI, H.; YAMAKOSHI, Y.; DUVERGER, O.; MORASSO, MI.; BENIASH E. 2019. Trafficking and secretion of keratin 75 by ameloblasts *in vivo*. *Journal of Biological Chemistry*. 294(48):18475-18487. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010037>
- ZHANG, W.; YELICK, P.C. 2021. Tooth repair and regeneration: potential of dental stem cells. *Trends in Molecular Medicine*. 27(5):501-511. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.02.005>
- ZHU, X.; LI, Y.; DONG, Q.; TIAN, C.; GONG, J.; BAI, X.; RUAN, J.; GAO, J. 2024. Small molecules promote the rapid generation of dental epithelial cells from human-induced pluripotent stem cells. *International Journal of Molecular Sciences* 25:4138. <https://doi.org/10.3390/ijms25084138>