

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI  
ȘCOALA DOCTORALĂ  
DOMENIUL MEDICINĂ**

**Cercetări de anatomie structurală ale țesuturilor moi  
dentomaxilare**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**Prof.Univ.Dr.Dr.RUSU MUGUREL CONSTANTIN**

**Student-doctorand:**

**STOENESCU MIHAI DRAGOMIR**

**2020**

# CUPRINS

Introducere .....	5
Lista de Abrevieri.....	7
1 Elemente de morfogeneză dentară .....	8
1.1 Dezvoltarea pulpei dentare.....	17
2 Elemente de histologie.....	19
2.1 Histologia mucoasei orale .....	19
2.1.1 Membrana bazală epitelială.....	20
2.1.2 Lamina propria .....	20
2.1.3 Submucoasa orală.....	21
2.1.4 Epiteliul oral .....	22
2.1.4.1 Epiteliul oral keratinizat .....	23
2.1.4.1.1 Stratul bazal .....	23
2.1.4.1.2 Stratul spinos .....	24
2.1.4.1.3 Stratul granular .....	24
2.1.4.1.4 Stratul cornos.....	25
2.2 Histologia papilei apicale .....	25
2.3 Celulele stem ale foliculilor dentari .....	26
2.4 Ligamentul periodontal – celulele.....	26
2.5 Histologia pulpei dentare.....	28
2.5.1 Odontoblaștii.....	29
2.5.2 Substanța intercelulară .....	30
2.5.3 Fibroblaștii pulpei dentare.....	30
2.5.4 Celulele de apărare ale pulpei dentare.....	31
2.5.5 Celulele stem ale pulpei dentare .....	33
2.5.6 Microvascularizația pulpei dentare.....	34
2.5.7 Diferențe între țesutul pulpar primar și cel permanent .....	34
2.6 Elemente de histopatologie a foliculului dentar.....	35
3 Elemente de anatomie a nișelor stem .....	37
3.1 Celulele nișelor hematopoietice .....	37
3.2 Celulele stem mezenchimale .....	38

4	Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară a sacului folicular .....	41
4.1	Introducere .....	41
4.2	Material și metodă .....	43
4.2.1	Material biologic .....	43
4.2.2	Metoda imunohistochimică .....	43
4.2.2.1	Pregătirea lamelor de microscopie .....	43
4.2.2.2	Anticorpii primari utilizați .....	43
4.2.2.3	Metoda de imunomarcare .....	44
4.2.2.4	Documentarea rezultatelor .....	47
4.3	Rezultate .....	47
4.4	Discuții .....	50
5	Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară în nișa mucoasei orale .....	54
5.1	Introducere .....	54
5.2	Material și metodă .....	55
5.2.1	Material biologic .....	55
5.2.2	Metoda imunohistochimică .....	56
5.2.2.1	Pregătirea lamelor de microscopie .....	56
5.2.2.2	Anticorpii primari utilizați .....	57
5.2.2.3	Metoda de imunomarcare .....	57
5.2.2.4	Documentarea rezultatelor .....	57
5.3	Rezultate .....	59
5.3.1	Evaluarea histologică a mucoasei orale .....	59
5.3.2	Evaluarea imunohistochimică a mucoasei orale .....	60
5.4	Discuții .....	63
5.4.1	Fenotipurile epiteliale ale mucoasei orale .....	63
5.4.2	Telocitele mucoasei orale .....	65
5.4.2.1	Telocitele CD34-pozitive din mucoasa orală .....	65
5.4.2.2	Telocitele perivasculare .....	66
5.4.2.3	Falsele telocite CD68-pozitive .....	66
5.4.3	Rolul celulelor epiteliale orale ca fagocite profesioniste .....	67
5.4.4	Limfaticile mucoasei orale, limfangiogeneza și telocitele perivasculare prelimfatice .....	68
5.4.5	Dubla marcarea a telocitelor .....	69
6	Cercetări privind anatomia moleculară și ultrastructurală a pulpei dentare .....	72
6.1	Introducere .....	72

6.2	Material și metodă .....	73
6.2.1	Material biologic .....	73
6.2.2	Metodă de studiu .....	74
6.2.2.1	Pregătirea lamelor de microscopie .....	74
6.2.2.2	Anticorpii primari utilizați .....	74
6.2.2.3	Metoda imunohistochimică .....	75
6.2.2.4	Documentarea rezultatelor.....	76
6.2.3	Microscopia electronică de transmisie .....	76
6.3	Rezultate - fenotipul imunohistochimic al celulelor nișei pulpare dentare.....	77
6.4	Rezultate – nișa stem pulpară dentară în microscopia electronică de transmisie	92
6.4.1	Celule stem latente ale pulpei dentare.....	92
6.4.2	Progenitorii pulpei dentare, celule clare.....	92
6.4.3	Comunicări reciproce ale celulelor stem și progenitoare pulpare.....	92
6.4.4	Microvase, angiogeneză și cordoane vasculogenice.....	94
6.4.5	Nucleoli giganți extrudați.....	94
6.4.6	Cordoane vasculogenice realizate de celule endoteliale cu material nucleolar extrudat	97
6.5	Discuții.....	98
6.5.1	Markerii imunohistochimici în nișa pulpară dentară adultă .....	98
6.5.2	Remodelarea vasculară pulpară.....	104
6.5.3	Nișa pulpară dentară în microscopia electronică.....	106
6.5.3.1	Pericitele în nișa pulpară dentară .....	108
6.5.3.2	Sistemul canalicular nucleolar.....	109
6.5.4	Celulele cu sisteme canaliculare nucleolare se grupează în nișe stem.....	111
6.5.5	Cromatină nucleară și nucleoli extrudați intracitoplasmatic .....	111
6.5.6	Extruzia nucleolară în celule stem canceroase .....	113
6.5.7	Pericitele și continuumul transdiferențierilor endotelial-endoteliale .....	114
7	Imunohistochimia pulpară și mecanismul formării calculilor pulpari – studiu original	115
7.1	Introducere .....	115
7.2	Material și metodă .....	115
7.3	Rezultate .....	116
7.4	Discuții.....	119
8	Cercetări imunohistochimice ale anatomiei moleculare a papilei apicale .....	124
8.1	Introducere .....	124
8.2	Material și metodă .....	125

8.2.1	Material biologic .....	125
8.2.2	Metoda imunohistochimică .....	125
8.2.2.1	Pregătirea lamelor de microscopie .....	125
8.2.2.2	Anticorpii primari utilizați .....	125
8.2.2.3	Metoda de imunomarcare .....	126
8.2.2.4	Documentarea rezultatelor.....	126
8.3	Rezultate .....	126
8.4	Discuții.....	129
9	Concluziile tezei de doctorat.....	132
	Bibliografie .....	135
	Index de figuri în text .....	151
	Index de tabele în text .....	156
	Anexa 1 – licențe de copyright.....	157

## Introducere

Medicina dentară nu poate evita provocările medicinei regenerative <sup>1</sup>. Implementarea biomimeticelor dentare devine facilitată de mărirea volumului cunoștințelor despre celulele stem dentare, și despre procesul de diferențiere a acestora. Acest domeniu oferă perspective importante, precum bioingineria completă a dintelui, sau regenerarea țesutului periodontal <sup>1</sup>.

Obiectivul cercetărilor mele doctorale a fost de a aprecia structural nișe stem orodentare, fie epiteliale, fie stromale. Am urmărit nișa epitelială orală, nișele stem ale foliculilor dentari, papilei apicale și pulpei dentare, prin studii imunohistochimice și studii în microscopia electronică de transmisie. Au rezultat evidențe originale care fie sunt sustenabile prin informația specifică publicată până în prezent, fie aduc contribuții inedite la cunoaștere.

## PARTEA GENERALĂ A TEZEI DE DOCTORAT

Am documentat în partea generală a tezei mele de doctorat date fundamentale privind morfogeneza dentară, incluzând aici și dezvoltarea pulpei dentare. În continuare prezint elemente de histologie a mucoasei orale, cu cele două componente, epiteliul și țesutul conjunctiv, submucoasa orală, apoi histologia papilei apicale, celulele stem ale foliculilor dentari, celulele ligamentului periodontal, histologia pulpei dentare, și această nișă stem dentară. În cel de-al treilea capitol al părții generale sunt prezentate elemente privind structura nișelor stem hematopoietică și mezenchimală.

## PARTEA PERSONALĂ A TEZEI DE DOCTORAT

Am realizat 5 studii în partea originală a tezei de doctorat:

1. Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară a sacului folicular;
2. Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară în nișa mucoasei orale;
3. Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară și ultrastructurală a pulpei dentare;
4. Imunohistochimia pulpară și mecanismul formării calculilor pulpari;
5. Cercetări imunohistochimice ale anatomiei moleculare a papilei apicale.

### 1 Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară a sacului folicular

Țesuturile periodontale care persistă după odontogeneză constituie foliculul dentar (FD), care este considerat o nișă stem a adultului <sup>2</sup>. Totuși, posibilitățile de transdiferențiere ale endoteliilor din această nișă par a fi trecute cu vederea <sup>2</sup>.

Am ridicat ipoteza că celulele endoteliale ale FD prezintă deopotrivă un fenotip progenitor și unul mieloid <sup>2</sup>. Scopul acestui studiu a fost astfel de a testa *in situ* pe specimene tisulare umane expresiile CD117/c-kit, marker stem/progenitor, și CD68, marker monocitar/macrofagic, în endoteliile FD <sup>2</sup>.

Țesut uman folicular dentar a fost colectat de la 10 pacienți la care s-a practicat extracția molarilor trei incluși din motive ortodontice și terapeutice. Metoda imunohistochimică a utilizat anticorpi primari pentru: CD117/c-kit; nestină; p120; CD68. Am documentat histologia sacului folicular pe lame colorate cu hematoxilină-eozină. Pe lamele imunomarcate cu nestină markerul a fost exprimat în celule endoteliale ale FD. Deasemenea și p120 a fost exprimată în endoteliile vasculare de la nivelul FD. Am identificat cu acuratețe pe lamele microscopice structura sacului folicular. Celulele endoteliale microvasculare aparținând la venule postcapilare (după calibrul și datorită lipsei pericitelor) au prezentat expresia pozitivă atât a CD117/c-kit, cât și a CD68. Cei doi markeri au fost exprimați pozitiv și în celule stromale cu morfologie fibroblastoidă. De asemenea, CD68 a prezentat expresie pozitivă în celule epiteliale bazale ale epiteliului scuamos stratificat de la nivelul sacului folicular.

Baza celulară a regenerării țesuturilor este dată de capacitatea celulelor progenitoare de a se transdiferenția în diferite linii celulare și/sau de multipotențialul celulelor stem de a se diferenția în țesuturile țintă dorite <sup>3</sup>. Unul dintre țesuturile multipotente ale corpului, căruia i s-a atribuit o calitate de progenitor, este FD, un strat relativ omogen de celule ectomezenchimale care se consideră că pe lângă originea ligamentului periodontal, cementului și osului alveolar are și rol în menținerea statusului nemineralizat și a arhitecturii spațiale a ligamentului periodontal <sup>3</sup>. Cercetările existente demonstrează fie că FD conține populații heterogene de celule progenitoare, fie că celulele progenitoare ale FD au multipotențial <sup>3</sup>.

Sunt diferite studii ale celulelor progenitoare ale FD în care a fost identificat faptul că acestea exprimă nestină, CD29, CD44, CD73, CD90, și nu exprimă CD14, CD31, CD34, CD45 and CD117 <sup>4</sup>. Având în vedere specificitatea acestor markeri reiese faptul că în nișa FD componentele celulare nu se leagă nici de un fenotip hematopoietic (CD34, CD45, CD117), nici de unul endotelial (CD31, CD34) și nici de unul monocitar/macrofagic (CD14). Un studiu al FD la molari de minte parțial erupți, asupra subseturilor de celule inflamatorii, precum macrofage identificate prin expresia CD68, a evaluat faptul că FD nu conțin un număr crescut de celule inflamatorii <sup>5</sup>. Astfel, se poate specula rezonabil că fenotipul CD68+ pe care l-am identificat nu are legătură cu inflamația, iar celulele stromale fibroblastoide CD68+ și c-kit+ pe care le-am găsit se leagă mai degrabă de subseturi de monocite și progenitori. Un astfel de fenotip poate indica progenitori endoteliali. Aceasta deoarece se cunoaște faptul că la adult hemagioblaștii părăsesc măduva osoasă și trec în țesuturi non-

hematopoiectice; astfel de celule sau progenia lor ar putea reprezenta o sursă de celule endoteliale la adult, progenitorii aceștia endoteliali fiind identificați atât prin expresia pozitivă a c-kit, cât și prin expresia pozitivă a CD68 <sup>6</sup>.

Interesant, am găsit expresii pozitive ale c-kit și CD68 în celulele endoteliale ale venulelor postcapilare din FD <sup>2</sup>. Expresia endotelială a CD68, de intensitate variabilă, a fost decelată anterior în celule ale liniei monocitar/macrofagice și în fibroblaști și celule endoteliale, ceea ce a susținut faptul că CD68 nu este un marker strict monocitar/macrofagic ci mai degrabă o proteină lizozomală care este mai bogat reprezentată în macrofage <sup>7</sup>. Acest lucru este susținut în plus și de expresia CD68 în celule mezenchimale stem/stromale <sup>8</sup>. Pe de altă parte, celule endoteliale umane normale, precum cele din vena ombilicală, din ganglionii limfatici normali și din măduva osoasă, produc *Stem Cell Factor* (SCF, factorul Steel, acesta fiind ligandul receptorului c-kit) și au receptori c-kit <sup>9</sup>. Se pare astfel că celulele endoteliale *in situ* ca și celulele stromale ale FD au în comun antigene monocitar/macrofagice și antigene hematopoiectice. Pe de o parte aceasta ar putea indica faptul că rezidenții stromei FD au potențialul de formare de neovase, însă pe de altă parte se sugerează rolul pe care celulele endoteliale l-ar putea juca în fiziologia unei nișe stem hematopoiectice locale. S-a demonstrat că celulele stem hematopoiectice se localizează la adult în nișe perivasculare <sup>10</sup> și că la embrion endoteliul poate genera celule stem hematopoiectice <sup>11</sup>. Acest fapt este susținut și de experimente care au identificat endoteliul aortic ca fiind hemogenic, celulele stem hematopoiectice din spațiul subaortic derivând prin tranziție endotelial-hematopoiectică <sup>12</sup>. Pe de altă parte, majoritatea celulelor endoteliale circulante din sângele periferic au originea din pereții vasculari <sup>13</sup> iar astfel de celule pot popula diferite țesuturi, inclusiv țesuturile în care au origine.

În lumina acestor demonstrații originea celulelor stem/progenitoare ale FD suportă revizuire, deoarece endoteliul poate reprezenta un donor al componentelor nișei. Acest lucru este întărit și de faptul că în celulele FD a fost identificată expresia Stro-1 <sup>14,15</sup> care, deși este considerat un marker de celule stem mezenchimale <sup>16</sup>, în fapt este un antigen endotelial de 75kD <sup>17</sup>.

## 2 Cercetări imunohistochimice privind anatomia moleculară în nișa mucoasei orale

Telocitele (TC) reprezintă un tip celular denumit în 2010, anterior aceste celule fiind considerate celule interstițiale Cajal-like; sunt celule stromale cu o caracteristică specifică – prelungirile celulare extreme de lungi, subțiri și moniliforme, numite telopode (dilațiile au fost denumite podoame, segmentele subțiri dintre podoame au fost denumite podomere) <sup>18-24</sup>. Deși s-a demonstrat că pot apare morfologii hibride <sup>22</sup>, în microscopia electronică de transmisie care este considerată metoda de elecție prin care pot fi identificate TC, în descrierile inițiale s-a considerat că

TC sunt distincte de fibroblaști<sup>18,19</sup>. Telocitele nu sunt însă acceptate de toți cercetătorii, nefiind incluse nici în Terminologia Histologica<sup>25,26</sup>.

În prezent, sunt numeroase lucrări care discută limitările studiilor inițiale despre TC și care pun la îndoială ideea că TC ar putea reprezenta un nou tip celular<sup>26-38</sup>. De aceea, este necesară prudență pentru a face diferența între un TC și o celulă TC-like (fals TC) iar studii noi sunt necesare pentru a diferenția corespunzător TC de celulele liniei endoteliale<sup>24</sup>. Ar trebui utilizați în studiul TC și markeri limfatici, pentru a distinge TC de celulele endoteliale limfatice<sup>35</sup>. Markerul endotelial CD31 ar trebui folosit în studiile imunohistochimice despre TC pentru a face distincția TC CD34+/CD31- de celulele vasculare endoteliale CD34+/CD31+<sup>39</sup>. Totuși, CD31 marchează și celule endoteliale limfatice<sup>28</sup>. Pe de altă parte, CD34 care este privit ca un identificator al TC, este deasemenea un marker hematopoietic<sup>33</sup>, la fel ca și c-kit, ceea ce nu este în avantajul identificărilor TC prin imunohistochimie<sup>24</sup>.

Scopul acestui studiu imunohistochimic al tezei mele de doctorat a fost astfel reprezentat de investigarea nișei stem a mucoasei orale și de punerea la punct a unui panel de markeri imunohistochimice care să diferențieze celulele nișei, inclusiv prin testarea macrofagelor în această nișă. Studiul a fost realizat retrospectiv pe specimene arhivate incluse la parafină cu mucoasă orală keratinizată umană (treizeci de cazuri). Metoda imunohistochimică a utilizat anticorpi primari pentru: CD34, D2-40, CD31, CD68, citokeratina 5 (CK5), Ki67 și alfa-actina mușchiului neted ( $\alpha$ -SMA).

După aplicarea anticorpilor anti-CD34 am observat că doar câteva celule epiteliale au prezentat expresia aceluși marker. În lamina propria a mucoasei orale am pus în evidență expresia CD34 în endotelii. În plus am evidențiat două subpopulații distincte morfologic de celule stromale care au exprimat CD34: (i) celule multipolare în planul secțiunii, care proiectau prelungiri telopodiale dihotomice; (ii) celule fusiforme delicate, telocit-like, care proiectau deasemenea prelungiri telopodiale dihotomice. Anticorpul anti-CD31 a prezentat o expresie exclusivă endotelială. Astfel de celule endoteliale au prezentat deasemenea expresia markerului monocitar/macrofagic CD68. Macrofagele CD68-pozitive au populat în număr mare lamina propria și la acel nivel se învecinau cu monocite CD68-pozitive care erau lipsite de prelungiri. Aceste macrofage CD68-pozitive au apărut în secțiuni fie ca celule largi multipolare, atunci când au fost secționate tangențial, fie ca bastonașe alungite, atunci când au fost secționate ortogonal. Am observat că macrofagele proiectau prelungiri bine reprezentate și dihotomice. Am identificat deasemenea morfologii telocitare și telopodiale, inclusiv în stratul imediat subepitelial și în nișa perivasculară. Am găsit deasemenea celule epiteliale bazale și suprabazale care au fost marcate pozitiv cu anticorpul anti-CD68. În plus, am pus în evidență, foarte rar, celule epiteliale apoptotice. Markerul limfatic D2-40 a fost exprimat în celule epiteliale bazale. Anticorpii anti-D2-40 au marcat deasemenea capilarele limfatice și colectoarele

limfatice din lamina propria. Am observat capilare limfatice localizate în vecinătatea vaselor sanguine care erau negative pentru markerul D2-40. Colectoarele limfatice largi proiectau filopode și erau în bună parte lipsite de pericite, au apărut precum cordoane groase cu filopode atunci când erau secționare tangențial. În plus am pus în evidență pilieri intraluminali în colectoarele limfatice largi. Deasemenea am evidențiat celule telocit-like perivascularare D2-40-pozitive dar acest lucru trebuie interpretat cu prudență pe secțiunile microscopice bidimensionale.

Numeroase studii au indicat faptul că TC au un fenotip CD34+ <sup>20,40-44</sup>. Diaz-Flores și colab. (2014) au realizat o documentare complexă, demonstrând că „telocitele” sunt doar un alt termen folosit pentru a indica celule stromale CD34+ <sup>45</sup>. Un studiu anterior privind expresia CD34 în mucoasa orală a identificat distribuția uniformă a celulelor stromale CD34+ în țesutul normal <sup>46</sup>. Am constatat că celulele stromale pot prezenta o morfologie telocitară pe secțiuni bidimensionale <sup>24</sup>. Totuși în studiul acesta am identificat două seturi de celule stromale CD34+, primul fiind cu celule largi cu numeroase prelungiri telopodiale, care ar putea aparține liniei hematopoietice, iar al doilea fiind celulele stromale cu morfologie telocitară CD34+ <sup>24</sup>. Acestea din urmă par a nu aparține liniei endoteliale deoarece nu am identificat astfel de celule marcate cu CD31. Este interesant în acest context faptul că în cazuri cu fibroză submucoasă orală, care este un status potențial premalign tisular, apare o reducere sau chiar dispariție completă a celulelor stromale CD34+ <sup>46</sup>. Astfel, în timp ce evidența TC CD34+ în mucoasa orală indică un status normal, sănătos, al țesutului, lipsa rețelelor de TC CD34+ ar putea indica modificări patologice <sup>24</sup>. Aceasta oglindește modificările cutanate din sclerodermă, când TC dispar progresiv, ceea ce poate afecta reparația sau regenerarea cutanată, poate conduce la alterări ale matricei extracelulare și reduce controlul asupra activității miofibroblaștilor și mastocitelor <sup>44</sup>. Din păcate, CD34 este binecunoscut precum marker hematopoietic <sup>47</sup>, nefiind astfel chiar atât de semnificativ pentru diferențierea între TC și celulele liniei hematopoietice <sup>24</sup>. Este important din această perspectivă de discutat aici faptul că diverse studii au indicat și fenotipul CD117/c-kit+ pentru TC <sup>48-52</sup>, dar și acest ultim marker este deasemenea specific pentru linia hematopoietică <sup>24</sup>. Se consideră că nișa stem universală a adultului este nișa perivasculară, după cum indică o serie de cercetări anterioare <sup>40,53,54</sup>. Celulele stem mezenchimale sunt derivate din celule perivascularare <sup>55</sup>. Din această perspectivă, faptul că am identificat celule telocitare perivascularare exprimând D2-40 ar putea fi explicat prin aceea că podoplanina poate acționa ca reglator al morfologiei celulare normale, atât în celule normale cât și în celule maligne <sup>56</sup>. Dacă se consideră că celulele telocitare perivascularare ce exprimă D2-40 ar fi celule endoteliale limfatice, atunci se poate specula rezonabil faptul că un spațiu interstițial perivascular prelinfatic ar fi delimitat de celule telocitare <sup>24</sup>. Trebuie însă avut în vedere că MSC pot exprima un fenotip limfatic atunci când sunt puse în contact cu un mediu inductiv limfatic <sup>57,58</sup>. Într-un studiu publicat în 2012, realizat prin

microscopie electronică de transmisie, au fost prezentate TC, macrofage în contact cu telopode, dar și macrofage proiectând telopode, la nivelul spațiului subcapsular renal <sup>59</sup>. Nu este surprinzător, deoarece, după cum reiese și din studiul prezent, macrofagele proiectează numeroase procese subțiri <sup>24</sup>. Cum în studiul respectiv nu a fost utilizat niciun marker pentru macrofage, distincția dintre TC și macrofage în microscopia electronică rămâne discutabilă <sup>24</sup>. Proprietățile fagocitare ale TC CD34+ au fost demonstrate în diferite țesuturi, inclusiv în țesuturile periodontale, deși aceste celule au fost identificate ca negative pentru CD31 și  $\alpha$ -SMA, ceea ce autorii demonstrează prin evidențe prezentate, dar negative pentru CD45, CD68 și h-caldesmon, ceea ce nu se susține prin evidențele prezentate atunci <sup>60</sup>. S-a sugerat atunci că TC fagocitare exprimă CD34 dar nu exprimă CD68, în timp ce macrofagele exprimă CD68 dar sunt negative pentru CD34 <sup>60</sup>. Dar, experimente realizate anterior de studiul pe care îl discut au demonstrat faptul că celulele endoteliale care rezultă din celule mononucleare și exprimă markeri specifici endoteliali, precum CD34, CD144 și factorul von Willebrand, exprimă deasemenea CD68 <sup>47</sup>. Deoarece am pus în evidență celule cu morfologie telocitară, fusiforme și proiectând telopode, care exprimă CD68, consider că este nevoie de prudență atunci când CD68 este folosit pentru a face distincția dintre TC și alte tipuri celulare. Înainte ca TC să fie lansate drept un nou tip celular în anul 2010, de către Popescu și Faussone-Pellegrini <sup>19</sup>, specificitatea a trei anticorpi monoclonali anti-CD68 fusese testată prin imunohistochimie și citometrie în flux <sup>61</sup>. Au fost atunci documentate clonele KP1, EBM11 și PGM1 ale CD68, precum și markerii fibroblastici CD90 și prolil-4 hidroxilaza <sup>61</sup>. S-a demonstrat atunci că la testarea în citometrie în flux a fibroblaștilor CD68+, aproape toate celulele testate au fost pozitive pentru KP1 <sup>61</sup>, clona pe care am folosit-o în acest studiu. De aceea, identificarea de celule telocitare CD68(KP1)-pozitive, apare normală. Acest lucru se corelează cu identificarea în alt studiu precedent a expresiei în fibroblaștii gingivali a expresiei CD14 <sup>62</sup>, un alt marker pentru monocite și macrofage. Diferite linii celulare de fibroblaști exprimă CD68 la niveluri comparabile cu macrofagele <sup>63</sup>, de aceea distincția în microscopia optică a celulelor fibroblastoide de macrofage secționate tangențial poate apare speculativă.

Anumite tulpini de *Escherichia coli* produc factor citotoxic necrotizant 1 (CNF1, *Cytotoxic Necrotizing Factor 1*) care acvitează permanent Rho GTPazele și permite astfel celulelor epiteliale să supună macropinocitozei nu doar particule de latex și bacterii, dar și celule apoptotice, într-un mod similar fagocitelor profesioniste precum macrofagele și neutrofilele <sup>64-66</sup>. S-a demonstrat că celulele Hep-2 ale carcinomului laringian uman exprimă markerul fagocitar specific CD68, și deasemenea s-a demonstrat că activarea Rho prin intermediul CNF1 variază localizarea intracelulară a CD68 <sup>66</sup>. Aceste rezultate demonstrează că celulele epiteliale Rho-activate se comportă de regulă în același fel precum fagocitele profesioniste <sup>66</sup>. Până la studiul prezent, prezența celulelor epiteliale rezidente

macrofag-like CD68+ în mucoasa orală nu a mai fost testată <sup>24</sup>. Se cunoaște totuși că integrarea incompletă a complexelor adherens ale joncțiunilor intercelulare conduce la degenerarea edematoasă a epitelului care, în sindromul Sjögren, este infiltrat de macrofage <sup>67</sup>. De aceea, este posibil ca în timp ce celulele epiteliale acționează ca fagocite profesionale în epiteliile normale, în epiteliile degenerative să fie importate macrofage din stromă <sup>24</sup>. Mucoasa orală este un derivat ectodermal, așa cum este și pielea <sup>68</sup>. S-a sugerat anterior faptul că macrofagele CD68+ migrează din derm în epiderm și se transdiferențiază în celule Langerhans rezidente <sup>69</sup>. Un alt studiu a documentat faptul că în pielea normală se află celule dendritice epidermale CD68+ <sup>70</sup>. De aceea, expresia pe care am identificat-o, a celulelor epiteliale orale adendritice CD68+ ar putea să corespundă cu stadii tranzitionale ale unei transdiferențieri a macrofagelor <sup>24</sup>. Studii viitoare care să utilizeze metode de dublă marcarea ar putea elucida acest aspect.

### 3 Cercetări privind anatomia moleculară și ultrastructurală a pulpei dentare

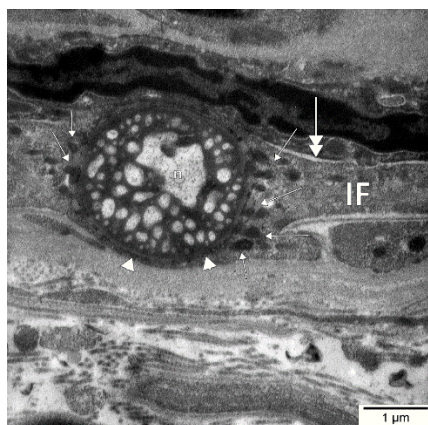
Pulpa dentară reprezintă un micromediu complex <sup>71</sup> unde celulele stem mezenchimale (MSC, *Mesenchymal Stem Cells*) și celulele progenitoare cohabitează <sup>72</sup>, de regulă în nișe stem perivasculare <sup>73-75</sup>. Imunofenotipul CS ale pulpei dentare (DPSC, *Dental Pulp Stem Cells*) a fost descris cu precădere prin cercetări *in vitro* <sup>71</sup>. Se cunosc posibilități de modificare fenotipică ale DPSC după adăugarea în mediul lor a diferitelor molecule <sup>76</sup>. Experimentele realizate *in vitro* nu oferă însă date obiective privind caracterizarea *in situ* a DPSC <sup>71</sup>.

Am urmărit în acest studiu să documentez anatomia imunohistochimică și ultrastructurală în nișa pulpară, pentru realizarea de corelații adecvate cu referențialul specific. Metoda imunohistochimică a utilizat anticorpi primari pentru CD10; CD 105; CD117/c-kit; CD146; CD34; CD45; nestină; Stro-1; enolaza neuron-specifică; Ki67;  $\alpha$ -actina mușchiului neted; proteina fibrilară acidică glială (GFAP). Microscopia electronică de transmisie: fragmentele tisulare (pulpe dentare prelevate de la nivelul dinților frontali) au fost procesate și montate pe grile.

Enolaza neuron-specifică (NSE) a marcat pozitiv nervii pulpari și elemente ale plexului subodontoblastic al lui Raschkow. Expresia CD10 la nivelul pulpei dentare umane adulte a fost panstromală în mantaua pulpară, unde au apărut marcate rețele stromale complexe, inclusiv endotelii. La nivelul miezului pulpar endoteliile vaselor pulpare mari nu au exprimat CD10. Deasemenea expresia CD10 a fost negativă în nervi pulpari. La nivelul pulpei dentare expresia CD117/c-kit a fost pozitivă în rețele stromale construite în bună parte de celule fibroblastoide și celule multipolare. Stro-1 a prezentat expresie pozitivă în celule endoteliale și în celule stromale ale pulpei dentare. Expresia CD146 a fost slabă și inconstantă în celulele endoteliale ale vaselor pulpare rezidente dar acest marker

a fost bine exprimat în capilarele născânde. CD146 nu a avut expresie pozitivă în celule stromale non-endoteliale ale PD testate de mine. Am identificat în pulpa dentară expresia CD34 la nivelul celulelor endoteliale vasculare dar și în capilare născânde și în celule stromale izolate. Expresia CD45 a fost pozitivă în celule endoteliale ale vaselor rezidente pulpare și în capilarele născânde. Rare celule stromale izolate au prezentat fenotip CD45+ pe secțiunile bidimensionale. CD105 (endoglina) a prezentat expresie endotelială și am putut demonstra celulele endoteliale germinative prin proiecția stromală a filopodelor acestora. Expresia CD105 a fost prezentă și în celule stromale izolate ale pulpei dentare. Markerul proliferativ Ki67 a fost exprimat la nivelul pulpei dentare în celule ale pereților vasculari – celule endoteliale și celule periendoteliale (ex. celule musculare netede vasculare) precum și în celule stromale izolate. Imunomarcarea cu nestină a pulpei dentare umane adulte a demonstrat rețele nestin+ panstromale la nivel pulpar. Alfa-actina de mușchi neted a fost exprimată exclusiv în celule mioide periendoteliale intramurale, pericite și celule musculare netede vasculare. Am pus în evidență, în pulpa dentară umană adultă, expresia GFAP la nivelul pericitelor (săgeți) și nervilor pulpari (săgeți cu vârf dublu).

*Secțiune ultrafină a pulpei dentare de la nivelul unui incisiv lateral superior. Nucleolul (n) prezintă o morfologie intermediară în cursul citokinezei (săgeata cu vârf dublu). Nucleolul este învelit parțial de un strat de preribozomi (vârfuri de săgeți) și are în vecinătate grămezi de cromatină (săgeți), într-o celulă-fiiică cu filamente intermediare (IF).*



În microscopia electronică de transmisie am pus în evidență un aspect morfologic particular legat de nucleolii DPSC – nucleoli giganți extrudați în citoplasmă (**figura**). Acești nucleoli erau cel mai probabil legați de regiuni de organizare nucleolară (NOR, Nucleolar Organiser Regions) ale acelor nucleu, fie central, fie polar. Interesant, acei nucleoli erau de dimensiuni comparabile și erau parțial înglobați în nucleu și parțial extrudați în citoplasma celulei. Acești nucleoli au constat din centri fibrilari și componentele densă fibrilară și granulară; pe flancul adnuclear erau tapetați de heterocromatină iar pe flancul abnuclear (citoplasmatic) erau tapetați de o peliculă subțire de (pre)ribozomi, care venea în contact direct cu filamentele intermediare din citoplasmă. Prezența (pre)ribozomilor a fost utilă pentru a considera acești nucleoli precum maturi, funcționali, și nu de tip primitiv, care ar fi trebuit să fie mai largi și lipsiți de înveliș ribozomal. O altă morfologie intermediară a acestor nucleoli a fost cea multiloculară. În stadiul morfologic intermediar, nucleolul era înconjurat de un strat incomplet de (pre)ribozomi, precum și de grămezi de cromatină condensată, aparent într-

o celulă aflată în citokineză. Nucleolul multilocular era învelit complet de (pre)ribozomi și aparent părea format din trei corpi nucleolari. Nu pot exclude însă o formă tridimensională multilobată a unui singur nucleol. Pe unele dintre grilele de microscopie electronică am găsit cordoane celulare construite de celule slab diferențiate, cordoane care căpătau lumene și au fost considerate ca fiind vasculogenice. Aceste cordoane vasculogenice au apărut ocazional acoperite de pericite. Celulele endoteliale progenitoare au prezentat nucleoli giganți extrudați și, rar, corpi Weibel-Palade.

Am pus în evidență prin acest studiu structuri care nu au mai fost găsite în organismul uman, pe care le-am denumit nucleoli extrudați giganți, care erau identici ca structură și dimensiuni cu nucleolii intranucleari. Inițial am fost tentat să indic nucleolii extrudați drept sisteme canaliculare nucleolare (NCS, Nucleolar Channel Systems). Endometrul formează consistent în faza luteală NCS, indiferent de statusul fertilității <sup>77</sup>. NCS a mai fost numit și coșuleț nucleolar sau canalicule nucleolare și a fost identificat ca structură tranzitorie în nucleii celulelor epiteliale endometriale <sup>78</sup>. Se consideră că NCS sunt structuri specifice umane <sup>79</sup>. Prin supraexpresia proteinei nucleolare Nopp140 a fost indusă formarea în nucleii celulelor din culturi a unor structuri numite R-rings, sisteme de membrane cu o mare asemănare ultrastructurală cu NCS; R-rings constau din câteva straturi de cisterne tubulare de membrane înglobate într-o matrice electronodense și asociate frecvent cu nucleoli și cu anvelopa nucleară <sup>79</sup>. Astfel de R-rings constau de bună seamă din reticul endoplasmic însă sunt structuri lipsite de elemente specifice anvelopei nucleare <sup>79</sup>. Evaluarea ultrastructurală este singura capabilă de a identifica fără echivoc NCS <sup>79</sup>.

Terzakis (1965) a documentat și a descris cu acuratețe posibilitățile morfologice ale NCS <sup>80</sup>. NCS constă din matrice, granule dense și canale ramificate și anastomozate, matricea amorfă fiind la fel de densă precum cea mai densă componentă a nucleolului <sup>80</sup>. Forma NCS este variabilă, apărând fie ca un elipsoid, sau sferă solidă, fie ca o sferă subțire goală, sau ca un torus, sau inelar <sup>80</sup>. NCS se localizează frecvent la periferia nucleolului, sau poate fi separat de acesta <sup>80</sup>. NCS poate fi despărțit de anvelopa nucleară prin nucleoplasmă, sau poate veni în contact cu membrana nucleară internă, canalele NCS fiind în această situație deschise în spațiul perinuclear care, la rândul său, este conectat cu cisternele RER <sup>80</sup>. O a treia posibilitate pentru NCS este cea în care comunică direct cu citoplasma <sup>80</sup>. Deși este neobișnuit, NCS este evaginat din nucleu cât este încă acoperit de anvelopa nucleară <sup>80</sup>. În studiul prezent diagnosticul de NCS al structurilor identificate precum nucleoli giganți extrudați a fost declinat din mai multe motive: (a) PD nu este un țesut epitelial; (b) nucleolii extrudați pe care i-am documentat ultrastructural nu au fost acoperiți de anvelopele nucleare, asemănându-se din acest punct de vedere cu R-rings; (c) nu am găsit evidențe de NCS conectați cu nucleoli, precum în studiul lui Terzakis; (d) nucleolii pe care i-am identificat nu prezintă dimensiunea regulată și repartiția

uniformă a NCS. Mai mult, lumenul tubulilor individuali în NCS comunică direct cu spațiul perinuclear <sup>80</sup>, ceea ce nu este cazul în studiul prezent.

Holmgren a descris pentru prima oară, în 1899, corpi nucleolar-like în citoplasma neuronilor din ganglionii spinali la iepuri și broaște <sup>81</sup>, după cum este citat de Santolaya (1973) <sup>82</sup>. Conform lui Santolaya (1973) structuri similare au fost identificate în neuronii ganglionilor spinali umani de către Korner (1937) și în celulele organului pineal uman de Bargmann (1943) <sup>82-84</sup>. Acești corpi nucleolar-like reprezintă nucleoli extrudați din nucleii în citoplasmele neuronale <sup>85</sup>. Ehret și Powers (1955) au studiat dezvoltarea nucleolilor la *Paramecium Bursaria* și au comentat că deoarece s-au observat nucleoli mici extrudați de până la 0,2 μm diametru, este posibil de considerat că lărgirea acestora în citoplasmă are loc prin creștere sau prin coalescență <sup>86</sup>. Alți autori, Shimizu și Ishii (1965), au găsit la nivelul hipotalamusului de șobolan prin utilizarea microscopiei electronice de transmisie, ocazional, corpi nucleolar-like intracitoplasmatici pe care i-au considerat a fi rezultatul extruziei nucleolare și nu artefacte <sup>87</sup>. Re-analizând imaginile acestor doi autori am identificat *bona fide* corpi Weibel-Palade în acele celule cu corpi nucleolar-like citoplasmatici. Acest fapt ar fi putut fi trecut ușor cu vederea, deoarece acești corpi specifici celulelor liniei endoteliale au fost comunicați și prezentați cu doar un an înainte de către Ewald Weibel și George Palade <sup>88</sup>. Această observație leagă nucleolii citoplasmatici de linia celulară endotelială. Și Kawabata (1965) a studiat hipotalamusul de șobolan, a raportat corpi nucleolar-like incluși în citoplasmă, și a discutat despre mecanismul probabil al extruziei nucleolilor în citoplasma unor celule neurosecretorii <sup>89</sup>. Autorul nu a prezentat probe morfologice directe ale extruziei, deși au fost analizate sute de secțiuni de hipotalamus <sup>89</sup>. Nu este cazul pentru studiul PD prezentat aici care, deși static, a arătat extruzia nucleolară intracitoplasmatică. Biggiogera și colab. (1997) au observat faptul că în decursul apoptozei timocitelor, componente cu ribonucleoproteină nucleară (RNP) formează grămezi care sunt extrudate în citoplasmă <sup>90</sup>. Acest grup de cercetare a observat că aceste structuri ectopice heterogene derivate din RNP (HERD, Heterogeneous Ectopic RNP-Derived) constau din fibrile de pericromatină, granule de intercromatină, granule de pericromatină și din material nucleolar <sup>90,91</sup>. Au fost prezentate ulterior și evidențe ultrastructurale <sup>92</sup>. Astfel, se poate specula rezonabil că prezența nucleolilor extrudați în cordoanele vasculogenice ale PD poate fi corelată cu faza de lumenizare a acestor cordoane, fază caracterizată prin remodelări celulare. Este interesant faptul că nucleolii extrudați nu sunt o caracteristică specifică celulelor de la mamifere.

Nucleolii extrudați pe care i-am pus în evidență prin microscopia electronică de transmisie au fost mai mari decât nucleii respectivi. Acest fapt ar putea sugera o aberație nucleolară precum cea din celulele maligne unde un concept disputat indică faptul că „nucleolul este mult mai larg față de dimensiunea nucleului în toate celulele maligne, indiferent de tipul sau originea neoplasmului” <sup>93</sup>.

Emodina este un anticarcinogenetic ce inhibă creșterea celulelor canceroase, crește mRNA și expresia proteinei Notch1 în timp ce reduce semnificativ mRNA și expresia proteinei VEGF <sup>94</sup>. Notch1 nu se localizează numai în membrana celulară și în citoplasmă, ci și în nucleolul celulelor canceroase, fiind implicată în mecanismele de supresie tumorală <sup>94</sup>. Activarea căilor de semnalizare pentru Notch induce downreglarea VEGF, suprimând tumorigeneza și angiogeneza <sup>94</sup>. Interesant este aici faptul că leziunile dentare activează expresia nestinei în odontoblaști și expresia Notch în celulele PD, inclusiv în acele celule ale vaselor sangvine <sup>95</sup>. Sunt necesare de aceea studii ulterioare care să evalueze expresia Notch în DPSC și să o localizeze în compartimentele celulare, inclusiv în nucleoli. Deși activarea Notch în celulele stem canceroase este determinată de semnalizarea juxtacrină dintre aceste celule și celulele endoteliale din nișele respective <sup>96</sup>, pare speculativă extrapolarea acestui mecanism la nivelul nișei non-maligne a PD.

#### 4 Imunohistochimia pulpară și mecanismul formării calculilor pulpari – studiu original

Mecanismul formării de calculi pulpari (DPS, *Dental Pulp Stones*) nu este încă identificat, iar un rol posibil al nișei stem pulpare în formarea acestora a fost ignorat, deși se cunoaște potențialul osteogenic al DPSC. Fenotipurile moleculare ale DPSC au fost studiate extensiv, nestina fiind un marker pozitiv al DPSC, printre alți markeri. Expresia nestinei poate indica celule stem neurale însă și MSC sau progenitori orientați spre linia osteogenică. Rolul DPSC în formarea de DPS nu trebuie ignorat și îl susțin prin studiul următor de caz în care am documentat anatomia imunohistochimică a nișei pulpare care îngloba DPS. Studiul imunohistochimic a fost realizat pe PD extrasă de la un molar de minte mandibular inclus care a fost obținut de la o pacientă de 34 ani. Am folosit următorii anticorpi primari:  $\alpha$ -SMA, CD34, Ki67, nestină, GFAP.

În miezul pulpar al PD de la molarul 3 mandibular inclus extras am găsit un DPS fals, deci o structură calcificată degenerativă, tapetat de osteoblaști. În stroma PD care conținea DPS celulele endoteliale microvasculare au fost marcate cu CD34, care nu a marcat însă celule stromale. Celulele stromale ale PD au prezentat, ca și osteoblaștii care tapetau DPS, expresia consistentă a nestinei. Am pus în evidență rețele stromale construite de celule multipolare și celule fibroblastoide care au prezentat expresia nestinei; acestea se conectau prin prelungiri lungi și dihotomice.

Rezultatele prezentate susțin ipoteza unei origini posibile a DPS din osteoclaști derivați din DPSC dedicate liniei osteogenice, după cum se demonstrează prin expresia nestinei, conform și discuției următoare. Această ipoteză ar putea explica formarea de calculi pulpari. Mai mult, orice situație care crește hipoxia pulpară (inflamația pulpară, deplasări ortodontice, traumatisme) poate conduce la expresia nestinei, dedicând astfel DPSC către linia osteogenică. Celulele pluripotente

nediferențiate pot fi stimulate să evolueze către linia celulară osteogenică prin osteoinducție <sup>97</sup>. Osteoblaștii, ca și odontoblaștii, sunt celule rezidente ale PD, care pot crea dentină și os sub influența unor factori patologici precum replantarea sau transplantarea <sup>98</sup>. În condiții fiziologice celulele PD nu mineralizează <sup>99</sup>. În condiții patologice mecanisme protective precum formarea de dentină reparatorie sunt induse de stimuli inflamatori sau de stimuli mecanici <sup>99</sup>. În cursul acestor evenimente din celulele progenitoare ale PD se diferențiază odontoblaști-like care secretă matrice dentinară, inclusiv proteine matriceale (*Bone SialoProtein*, BSP, *Dentin SialoPhosphoProtein*, DSPP, osteocalcină, OCN) care au roluri în diferențierea odontoblaștilor <sup>99</sup>. În legătură cu diferențierea odontoblastică este exprimată și nestina <sup>99</sup>. Răspunsul protectiv al PD este mediat de molecule inflamatorii, precum TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) <sup>99</sup>. TNF- $\alpha$  poate induce diferențierea odontoblastică a celulelor PD <sup>100</sup>. Aceste detalii nu pot însă explica direct diferențierea osteoblastică, și nu odontoblastică, a celulelor PD. Căutând în bazele de date împreună termenii-cheie „calculi pulpari” și „nestină” nu am obținut niciun studiu specific. Astfel, se pare că o evoluție spre diferențiere osteogenică a DPSC nu a fost luată în considerare anterior, atunci când s-a analizat etiologia DPS. Acest lucru este intrigant, deoarece dacă se observă atent studiul realizat de Gronthos și colab. în 2000 unde au fost descrise, după studii *in vitro*, pentru prima dată DPSC, se poate găsi faptul că DPSC pot produce noduli calcificați denși <sup>101</sup>, așa cum de altfel sunt și DPS. Studii ulterioare, *in vitro*, au demonstrat faptul că diferite clase de celule stem dentare se pot diferenția în osteoblaști <sup>4,102,103</sup>. Aceste detalii susțin ipoteza indusă de studiul meu, aceea care indică un rol direct al DPSC în formarea DPS.

## 5 Cercetări imunohistochimice ale anatomiei moleculare a papilei apicale

Sonoyama și colab. (2006) au raportat o nouă populație de celule stem dentare, din papila apicală, denumite SCAP (*Stem Cells from the Apical Papilla*), după un studiu pe material biologic de la suine <sup>104</sup>. SCAP sunt celule fibroblastoide clonogenice, care au o rată de proliferare mai mare ca cea a DPSC <sup>105</sup>. SCAP exprimă markerii mezenchimali de suprafață CD146 și STRO-1, precum și CD24, care ar putea să fie un marker unic pentru această subpopulație de celule stem dentare <sup>105</sup>. Sunt puține studii identificate în PubMed după termenii-cheie „nestin” și „apical papilla” <sup>106-112</sup>.

Am utilizat pentru imunohistochimie la parafină anticorpi pentru CD117/c-kit și nestină. Pe lamele preparate pentru imunohistochimie la parafină am găsit expresia stromală atât a CD117/c-kit cât și a nestinei. Rețeaua respectivă era constituită în mare parte din celule fusiforme cu prelungiri lungi și dihotomice. Am găsit deasemenea celule multipolare, având mai degrabă prelungiri scurte și dihotomice. Procesele celulare secundare rezultate după dihotomizări, precum și cele primare, contactau celule și prelungiri celulare din imediata lor vecinătate, configurând rețeaua stromală.

## 6 Concluziile tezei de doctorat

1. Nișa endotelială a foliculului dentar are individualitate distinctă, celulele respective putând fi distribuite prin transdiferențiere, sau ca celule stem/progenitoare, atât în mediul stromal respectiv, cât și în circulație.

2. Se pare astfel că celulele endoteliale *in situ* ca și celulele stromale ale foliculului dentar au în comun antigene monocitar/macrofagice și antigene hematopoietice. Pe de o parte aceasta ar putea indica faptul că celulele stromale rezidente au potențialul de formare de neovase, însă pe de altă parte se sugerează rolul pe care celulele endoteliale l-ar putea juca în fiziologia unei nișe stem hematopoietice locale.

3. Expresia epitelială a CD68 la nivelul mucoasei orale indică potențialul fagocitic profesionist al epiteliului oral. Este posibil ca în timp ce celulele epiteliale acționează ca fagocite profesioniste în epiteliile normale, în epiteliile degenerative să fie importate macrofage din stromă.

4. Expresia CD68 în celule telocit-like fie poate indica faptul că un subset de telocite sunt de fapt macrofage, fie demonstrează faptul că acest marker nu poate fi utilizat pentru a face distincția dintre cele două tipuri celulare, sau între macrofage și celule endotelial-like.

5. Diferite linii celulare de fibroblaști exprimă CD68 la niveluri comparabile cu macrofagele, de aceea discriminarea în microscopia optică între celulele fibroblastoide și macrofage secționate tangențial poate apare speculativă.

6. Folosirea unui anticorp cu specificitate limfendotelială poate distinge cu acuratețe procesele de limfangiogenază de la nivelul mucoasei orale.

7. Identificarea în preparatele microscopice a telopodelor nu este suficientă pentru a distinge telocite deoarece acestea pot fi confundate cu prelungiri celulare similare telopodelor pornite însă din celule endoteliale germinative, din macrofage sau din celule hematopoietice.

8. Markerii demonstrați *in vitro* în celule stem ale pulpei dentare trebuie considerați atent în studii *in situ* ale acestora. Stro-1, un marker de notorietate al acestor celule corespunde unui antigen endotelial, ceea ce poate indica apartenența celulelor stem pulpare la linia celulară endotelială.

9. Studii preexistente au testat fenotipul molecular al celulelor stem dentare prin metode *in vitro*. Studii *in situ* al acestor fenotipuri trebuie să utilizeze paneluri de markeri comparabile cu cele folosite pentru studii în culturi pentru a valida, sau disputa, rezultatele precedente și validitatea acestora pentru regenerarea tisulară utilizând celule stem dentare.

10. Celulele tranzitorii de amplificare din nișele dentare pot prezenta o versatilitate fenotipică suficientă pentru a masca o identificare exactă a tipurilor celulare. Astfel, teste ulterioare sunt necesare pentru a stabili valoarea funcțională a nucleolilor extrudați în nișa dentară, ca și pentru a identifica dacă astfel de substructuri sunt sau nu specifice acestei nișe.

11. Pentru a întări rezultatele studiului electronmicroscopic care a identificat nucleoli extrudați în celule ale pulpei dentare este necesar și un studiu molecular care să testeze markeri nucleolari specifici și să identifice expresia lor citoplasmatică.

12. Sunt necesare deasemenea cercetări care să stabilească rolul nucleolilor giganti extrudați în nișa, trecută cu vederea în cercetări, a dinților frontali. Majoritatea studiilor preexistente au utilizat țesut pulpar de la nivelul molarilor iar diferențele specifice ale nișei stem pulpare dentare nu au fost apreciate prin corelație cu topografia dentară.

13. Formarea calculilor pulpari ar putea fi indusă de celulele stem ale pulpei dentare adulte, după cum se susține prin expresia nestinei în astfel de celule stem ale pulpei dentare ce înglobează calcul pulpar. Sunt însă necesare studii ulterioare pe loturi mai mari, cu paneluri de markeri extinse, pentru a valida această ipoteză.

14. Un punct important în care apare confuzia în interpretarea rezultatelor este atunci când nestina este privită precum marker neural/neurogenic în țesuturile dentare, și nu precum un marker mezenchimal stem/progenitor, deși s-a demonstrat *in vitro* că celulele stem ale pulpei dentare nu exprimă markeri corelați cu celule nervoase diferențiate.

15. Am identificat în studiul prezent rețele ale papilei apicale exprimând c-kit și nestină. Este rezonabil de speculat faptul că rețelele stromale c-kit+/nestin- ar putea fi lipsite de capacitatea de transmitere a potențialelor de acțiune (rețele inactive), în timp ce rețelele stromale c-kit+/nestin+ pot reprezenta o formă de rețele active. Sau, dimpotrivă, dacă iau în considerare faptul că nestina este downreglată odată cu diferențierea celulară, rețelele c-kit+/nestin- pot avea un grad mai mare de diferențiere, în timp ce rețelele c-kit+/nestin+ pot indica o clonogenicitate mai bună<sup>113</sup>. Din această ultimă interpretare rezultă că nestina poate fi sau un marker funcțional în nișele dentare, din perspectiva transmiterii în rețelele stromale a potențialelor de acțiune, sau un marker al clonogenității celulelor tranzitorii de amplificare în nișa respectivă.

## Bibliografie selectivă

1. Ferri J, Hunziker E. Preprosthetic and maxillofacial surgery: Biomaterials, bone grafting and tissue engineering: Elsevier; 2011.
2. Rusu MC, Rascu A, Stoenescu MD. Endothelial expression of c-kit and CD68 in dental follicles of human impacted third molars. Folia morphologica 2017.
3. Luan X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. Stem cells and development 2006;15:595-608.
4. Saito MT, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. World journal of stem cells 2015;7:399-407.
5. Laine M, Venta I, Hyrkas T, Ma J, Konttinen YT. Chronic inflammation around painless partially erupted third molars. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics 2003;95:277-82.
6. Schatteman GC, Awad O. Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. The anatomical record Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology 2004;276:13-21.

7. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, et al. Expression of CD68 in non-myeloid cell types. *Scandinavian journal of immunology* 2008;67:453-63.
8. La Rocca G, Anzalone R, Farina F. The expression of CD68 in human umbilical cord mesenchymal stem cells: new evidences of presence in non-myeloid cell types. *Scandinavian journal of immunology* 2009;70:161-2.
9. Broudy VC, Kovach NL, Bennett LG, Lin N, Jacobsen FW, Kidd PG. Human umbilical vein endothelial cells display high-affinity c-kit receptors and produce a soluble form of the c-kit receptor. *Blood* 1994;83:2145-52.
10. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 2012;481:457-62.
11. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 2008;3:625-36.
12. Kissa K, Herbomel P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. *Nature* 2010;464:112-5.
13. Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of clinical investigation* 2000;105:71-7.
14. Zhang C, Cheng XR. [Isolation and characterization of dental follicle cells from adult human dental follicle tissues]. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology* 2013;48:96-101.
15. Kemoun P, Laurencin-Dalieux S, Rue J, et al. Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue & cell* 2007;39:257-66.
16. Rusu MC, Hostiuc S, Dermengiu D, Nicolescu MI, Jianu AM. STRO-1 positive pulmonary valve stem cells: preliminary report. *Rom J Leg Med* 2015;23:1-4.
17. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;413:353-7.
18. Fausone Pellegrini MS, Popescu LM. Telocytes. *Biomolecular concepts* 2011;2:481-9.
19. Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *Journal of cellular and molecular medicine* 2010;14:729-40.
20. Dobra MA, Vrapciu AD, Pop F, Petre N, Rusu MC. The molecular phenotypes of ureteral telocytes are layer-specific. *Acta histochemica* 2017.
21. Rusu MC, Loreto C, Manoiu VS. Network of telocytes in the temporomandibular joint disc of rats. *Acta histochemica* 2014;116:663-8.
22. Rusu MC, Nicolescu MI, Jianu AM, Lighezan R, Manoiu VS, Paduraru D. Esophageal telocytes and hybrid morphologies. *Cell biology international* 2012;36:1079-88.
23. Rusu MC, Folescu R, Manoiu VS, Didilescu AC. Suburothelial interstitial cells. *Cells, tissues, organs* 2014;199:59-72.
24. Butucescu M, Craitoiu S, Mogoanta L, Rusu MC, Iacov-Craitoiu MM, Stoenescu MD. The oral mucosa: Epithelial professional phagocytes, lymphatics, telocytes, and false telocytes. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2020;229:151462.
25. Varga I, Galfiova P, Blankova A, et al. Terminologia Histologica after more than 10 years: disputable terms which need a wide scientific discussion and recent developments. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2019.
26. Varga I, Kyselovič J, Danišovič L, et al. Recently discovered interstitial cells termed telocytes: distinguishing cell-biological and histological facts from fictions. *Biologia* 2018.
27. Rusu MC, Hostiuc S. Critical review: Cardiac telocytes vs cardiac lymphatic endothelial cells. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2019;222:40-54.
28. Iancu CB, Rusu MC, Mogoantă L, Hostiuc S, Toader OD. The telocytes in the subepicardial niche. *Appl Sci* 2019;9:1615.
29. Iancu CB, Rusu MC, Mogoanta L, Hostiuc S, Grigoriu M. Myocardial Telocyte-Like Cells: A Review Including New Evidence. *Cells, tissues, organs* 2019:1-10.

30. Petrea CE, Rusu MC, Manoiu VS, Vrapciu AD. Telocyte-Like Cells Containing Weibel-Palade Bodies in Rat Lamina Fusca. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:88-94.
31. Petrea CE, Craitoiu S, Vrapciu AD, Manoiu VS, Rusu MC. The telopode- and filopode-projecting heterogeneous stromal cells of the human sclera niche. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:129-40.
32. Manta L, Rusu MC, Pop F. What podoplanin tells us about cells with telopodes. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:124-8.
33. Rusu MC, Hostiuc S, Vrapciu AD, Mogoanta L, Manoiu VS, Grigoriu F. Subsets of telocytes: Myocardial telocytes. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2017;209:37-44.
34. Grigoriu F, Hostiuc S, Vrapciu AD, Rusu MC. Subsets of telocytes: the progenitor cells in the human endocardial niche. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie* 2016;57:767-74.
35. Toader OD, Rusu MC, Mogoanta L, Hostiuc S, Jianu AM, Ilie AC. An Immunohistochemical Study of Gastric Mucosa and Critical Review Indicate that the Subepithelial Telocytes are Prelymphatic Endothelial Cells. *Medicina* 2019;55.
36. Varga I, Polak S, Kyselovic J, Kachlik D, Danisovic L, Klein M. Recently Discovered Interstitial Cell Population of Telocytes: Distinguishing Facts from Fiction Regarding Their Role in the Pathogenesis of Diverse Diseases Called "Telocytopathies". *Medicina (Kaunas)* 2019;55.
37. Hostiuc S, Marinescu M, Costescu M, Aluas M, Negoii I. Cardiac telocytes. From basic science to cardiac diseases. II. Acute myocardial infarction. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:18-27.
38. Hostiuc S, Negoii I, Dogaroiu C, Drima E, Iancu CB. Cardiac telocytes. From basic science to cardiac diseases. I. Atrial fibrillation. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:83-7.
39. Manetti M, Rosa I, Messerini L, Guiducci S, Matucci-Cerinic M, Ibba-Manneschi L. A loss of telocytes accompanies fibrosis of multiple organs in systemic sclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2014;18:253-62.
40. Rusu MC, Manoiu VS, Cretoiu D, Cretoiu SM, Vrapciu AD. Stromal cells/telocytes and endothelial progenitors in the perivascular niches of the trigeminal ganglion. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2018;218:141-55.
41. Rusu MC, Cretoiu D, Vrapciu AD, et al. Telocytes of the human adult trigeminal ganglion. *Cell biology and toxicology* 2016;32:199-207.
42. Petre N, Rusu MC, Pop F, Jianu AM. Telocytes of the mammary gland stroma. *Folia morphologica* 2016;75:224-31.
43. Vannucchi MG, Faussone-Pellegrini MS. The Telocyte Subtypes. *Advances in experimental medicine and biology* 2016;913:115-26.
44. Manetti M, Guiducci S, Ruffo M, et al. Evidence for progressive reduction and loss of telocytes in the dermal cellular network of systemic sclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine* 2013;17:482-96.
45. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, et al. CD34+ stromal cells/fibroblasts/fibrocytes/telocytes as a tissue reserve and a principal source of mesenchymal cells. Location, morphology, function and role in pathology. *Histology and histopathology* 2014;29:831-70.
46. Desai RS, Mamatha GS, Khatri MJ, Shetty SJ. Immunohistochemical expression of CD34 for characterization and quantification of mucosal vasculature and its probable role in malignant transformation of atrophic epithelium in oral submucous fibrosis. *Oral oncology* 2010;46:553-8.
47. Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, et al. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. Differentiation; research in biological diversity 2000;65:287-300.
48. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, Curca GC, Jianu AM, Paduraru D. Telocytes form networks in normal cardiac tissues. *Histology and histopathology* 2012;27:807-16.

49. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, et al. The human trigeminal ganglion: c-kit positive neurons and interstitial cells. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 2011;193:403-11.
50. Xu Y, Tian H, Cheng J, Liang S, Li T, Liu J. Immunohistochemical biomarkers and distribution of telocytes in ApoE(-/-) mice. *Cell biology international* 2019.
51. Iancu CB, Rusu MC, Mogoanta L, Hostiuc S, Grigoriu M. Myocardial Telocyte-Like Cells: A Review Including New Evidence. *Cells, tissues, organs* 2018;206:16-25.
52. Wagener MG, Leonhard-Marek S, Hager JD, Pfarrer C. CD117- and vimentin-positive telocytes in the bovine teat sphincter. *Anatomia, histologia, embryologia* 2018;47:268-70.
53. James AW, Peault B. Perivascular Mesenchymal Progenitors for Bone Regeneration. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2019;37:1221-8.
54. Corselli M, Chin CJ, Parekh C, et al. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. *Blood* 2013;121:2891-901.
55. Caplan AI. New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2017;35:1151-9.
56. Sawa Y. New trends in the study of podoplanin as a cell morphological regulator. *Japanese Dental Science Review* 2010;46:165-72.
57. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, Manta L, Maru N, Grigoriu M. Transdifferentiations and heterogeneity in the stromal niches of uterine leiomyomas. *Rom J Morphol Embryol* 2018;59:663-72.
58. Conrad C, Niess H, Huss R, et al. Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation* 2009;119:281-9.
59. Zheng Y, Zhu T, Lin M, Wu D, Wang X. Telocytes in the urinary system. *Journal of translational medicine* 2012;10:188.
60. Diaz-Flores L, Gutierrez R, Garcia MP, et al. Uptake and intracytoplasmic storage of pigmented particles by human CD34+ stromal cells/telocytes: endocytic property of telocytes. *Journal of cellular and molecular medicine* 2014;18:2478-87.
61. Kunisch E, Fuhrmann R, Roth A, Winter R, Lungershausen W, Kinne RW. Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis* 2004;63:774-84.
62. Hiraoka T, Izumi Y, Sueda T. Immunochemical detection of CD14 on human gingival fibroblasts in vitro. *Oral microbiology and immunology* 1998;13:246-52.
63. Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, et al. [The "classical" macrophage marker CD68 is strongly expressed in primary human fibroblasts]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie* 2003;87:215-23.
64. Fiorentini C, Donelli G, Matarrese P, Fabbri A, Paradisi S, Boquet P. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. *Infection and immunity* 1995;63:3936-44.
65. Fiorentini C, Falzano L, Fabbri A, et al. Activation of rho GTPases by cytotoxic necrotizing factor 1 induces macropinocytosis and scavenging activity in epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 2001;12:2061-73.
66. Travaglione S, Falzano L, Fabbri A, Stringaro A, Fais S, Fiorentini C. Epithelial cells and expression of the phagocytic marker CD68: scavenging of apoptotic bodies following Rho activation. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2002;16:405-11.
67. Yoshimoto RU, Aijima R, Ohyama Y, et al. Impaired Junctions and Invaded Macrophages in Oral Epithelia With Oral Pain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2019;67:245-56.
68. Kumar G. *Orban's oral histology and embryology*: Elsevier India; 2015.
69. Petzelbauer P, Födinger D, Rappersberger K, Volc-Platzer B, Wolff K. CD68 positive epidermal dendritic cells. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* 1993;101:256-61.
70. Nakamura K, Yasaka N, Asahina A, et al. Increased numbers of CD68 antigen positive dendritic epidermal cells and upregulation of CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) expression on these cells in various skin diseases. *Journal of dermatological science* 1998;18:170-80.

71. Rusu MC, Loreto C, Sava A, Manoiu V, Didilescu AC. Human adult dental pulp CD117/c-kit-positive networks of stromal cells. *Folia Morphol (Warsz)* 2014;73:68-72.
72. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, et al. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2009;22:699-706.
73. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 2006;119:2204-13.
74. Lizier NF, Kerkis A, Gomes CM, et al. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. *PLoS one* 2012;7:e39885.
75. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003;18:696-704.
76. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *Journal of endodontics* 2013;39:357-63.
77. Rybak EA, Szymga MJ, Zapantis G, et al. The nucleolar channel system reliably marks the midluteal endometrium regardless of fertility status: a fresh look at an old organelle. *Fertility and sterility* 2011;95:1385-9 e1.
78. Busch H. *The Cell Nucleus*: Elsevier; 2012.
79. Kittur N, Zapantis G, Aubuchon M, Santoro N, Bazett-Jones DP, Meier UT. The nucleolar channel system of human endometrium is related to endoplasmic reticulum and R-rings. *Molecular biology of the cell* 2007;18:2296-304.
80. Terzakis JA. The nucleolar channel system of human endometrium. *The Journal of cell biology* 1965;27:293-304.
81. Holmgren E. Zur Kenntnis der Spinalganglienzellen des Kaninchens und des Frosches. *Anat Anz* 1899;16:161-71.
82. Santolaya RC. Nucleolus-like bodies in the neuronal cytoplasm of the mouse arcuate nucleus. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1973;146:319-28.
83. Körner F. Beobachtungen fiber den Austritt geformter Substanzen aus dem Kernkörperchen bei menschlichen Nervenzellen. *Z mikr-anat Forsch* 1937;42:362-78.
84. Bargmann W. *Die Epiphysis cerebri*. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Berlin: Springer; 1943:308-502.
85. Tewari HB, Bourne GH. The histochemistry of the nucleus and nucleolus with reference to nucleocytoplasmic relations in the spinal ganglion neuron of the rat. *Acta histochemica* 1962;13:323-50.
86. Ehret CF, Powers EL. Macronuclear and nucleolar development in *Paramecium bursaria*. *Experimental cell research* 1955;9:241-57.
87. Shimizu N, Ishii S. Electron-microscopic observations on nucleolar extrusion in nerve cells of the rat hypothalamus. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 1965;67:367-72.
88. Weibel ER, Palade GE. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *The Journal of cell biology* 1964;23:101-12.
89. Kawabata I. Electron microscopy of the rat hypothalamic neuro-secretory system. II. Nucleolus-like inclusion bodies in the cytoplasm of neurosecretory cells. *Archivum histologicum Japonicum = Nihon soshikigaku kiroku* 1965;26:101-13.
90. Biggiogera M, Bottone MG, Martin TE, Uchiumi T, Pellicciari. Still immunodetectable nuclear RNPs are extruded from the cytoplasm of spontaneously apoptotic thymocytes. *Experimental cell research* 1997;234:512-20.
91. Biggiogera M, Bottone MG, Pellicciari C. Nuclear RNA is extruded from apoptotic cells. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1998;46:999-1005.
92. Biggiogera M, Bottone MG, Scovassi AI, Soldani C, Vecchio L, Pellicciari C. Rearrangement of nuclear ribonucleoprotein (RNP)-containing structures during apoptosis and transcriptional arrest. *Biology of the cell* 2004;96:603-15.
93. "The critical role of the nucleolus in cell differentiation and stem cell development - the concept as it applies to the malignant cell.". *Medical hypotheses* 1980;6:1289-98.
94. Deng G, Ju X, Meng Q, Yu ZJ, Ma LB. Emodin inhibits the proliferation of PC3 prostate cancer cells in vitro via the Notch signaling pathway. *Molecular medicine reports* 2015;12:4427-33.

95. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Advances in dental research* 2011;23:275-9.
96. Zhu TS, Costello MA, Talsma CE, et al. Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells. *Cancer research* 2011;71:6061-72.
97. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 2001;10 Suppl 2:S96-101.
98. Takamori Y, Suzuki H, Nakakura-Ohshima K, et al. Capacity of dental pulp differentiation in mouse molars as demonstrated by allogenic tooth transplantation. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2008;56:1075-86.
99. Nozu A, Hamano S, Tomokiyo A, et al. Senescence and odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *Journal of cellular physiology* 2018;234:849-59.
100. Paula-Silva FW, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *Journal of dental research* 2009;88:339-44.
101. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. 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* 2000;97:13625-30.
102. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *Journal of endodontics* 2010;36:781-9.
103. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of oral biology* 2011;56:709-21.
104. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one* 2006;1:e79.
105. Turksen K. *Tissue-Specific Stem Cell Niche*: Springer; 2015.
106. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Archives of oral biology* 2013;58:1556-68.
107. El Ayachi I, Zhang J, Zou XY, et al. Human dental stem cell derived transgene-free iPSCs generate functional neurons via embryoid body-mediated and direct induction methods. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12:e1836-e51.
108. Gosau M, Gotz W, Felthaus O, Ettl T, Jager A, Morsczeck C. Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. *Archives of oral biology* 2013;58:699-706.
109. Wang ZY, Huang X, Liu DH, Lu HL, Kim YC, Xu WX. Involvement of actin microfilament in regulation of pacemaking activity increased by hypotonic stress in cultured ICCs of murine intestine. *Physiological research* 2015;64:397-405.
110. Li D, Zou XY, El-Ayachi I, et al. Human Dental Pulp Stem Cells and Gingival Mesenchymal Stem Cells Display Action Potential Capacity In Vitro after Neuronogenic Differentiation. *Stem cell reviews and reports* 2019;15:67-81.
111. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics* 2008;34:166-71.
112. Zou XY, Yang HY, Yu Z, Tan XB, Yan X, Huang GT. Establishment of transgene-free induced pluripotent stem cells reprogrammed from human stem cells of apical papilla for neural differentiation. *Stem cell research & therapy* 2012;3:43.
113. Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J, et al. Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *The American journal of pathology* 2001;158:817-23.