



## ACTUALIZACIONES / Reviews

# FORMACIÓN DE TEJIDO ÓSEO A PARTIR DE CÉLULAS MADRE DE PULPA DENTAL

Lucila Bagú, Mariana Barbich\*

*Instituto de Ciencias Básicas y Medicina Experimental, Instituto Universitario del Hospital Italiano.*

### Resumen

La regeneración ósea ha sido objeto de estudio y desafío permanente para la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos. Se han desarrollado diversos tipos de biomateriales con el objeto de reparar defectos óseos degenerativos o postraumáticos. Hasta ahora, ningún biomaterial ha logrado reemplazar el injerto óseo autólogo. Este último es la mejor alternativa en reparación ósea, pero no siempre se puede utilizar por la necesidad de extraer grandes masas de otra parte del cuerpo. Es por este motivo que la posibilidad de generar hueso *in vitro*, a partir de las células madre del propio paciente, resultaría de gran importancia clínica. La utilización de células madre mesenquimales obtenidas de médula ósea y de otras fuentes adultas ha sido descripta en diversos trabajos de investigación. La pulpa dental de piezas temporarias y permanentes aparece en los últimos años como una nueva fuente, accesible y no invasiva, de células madre mesenquimales adultas, que poseen un alto potencial proliferativo y clonogénico. Ellas son capaces de ser diferenciadas y dar origen a un tejido óseo fibroso, autólogo y vivo, que podría ser utilizado en regeneración ósea y medicina reconstructiva. El objetivo de

esta revisión es describir la pulpa dental como fuente de células madre adultas, sobre las que se desarrollan diversas técnicas que permiten lograr la diferenciación osteogénica y formación de hueso, resaltando la importancia de la accesibilidad y baja morbilidad para el paciente, y su elevado potencial como células formadoras de hueso.

**Palabras clave:** regeneración ósea, células madre de pulpa dental, células mesenquimales, ingeniería de tejidos.

### Summary

#### **BONE FORMATION FROM DENTAL PULP STEM CELLS**

*Bone regeneration has been the subject of many studies and a constant challenge for regenerative medicine and tissue engineering. Different types of biomaterials have been developed in order to repair degenerative or post-traumatic bone defects. However, so far none of them have been able to replace autologous bone grafting. Although this procedure represents the grafting modality of choice, it is not always possible to carry it*

\* Correo electrónico: [mariana.barbich@hospitalitaliano.org.ar](mailto:mariana.barbich@hospitalitaliano.org.ar)

*out, since it might require the extraction of a big amount of tissue from another bone of the patient. Therefore, the possibility of generating bone in vitro from the patient's own stem cells would be of great clinical significance. The use of mesenchymal stem cells from adult bone marrow and from other adult sources has already been described in the literature. In the last years, dental pulp of deciduous and permanent teeth has been considered a new and accessible source of adult mesenchymal stem cells. These cells have a highly proliferative and clonogenic potential and are also able to differentiate into the osteogenic lineage and give rise to an autologous, fibrous, and living bone that could be used in bone regeneration and reconstructive medicine. The aim of this review is to describe dental pulp as a source of adult stem cells and the use of various techniques that allow the osteogenic differentiation of these cells and the formation of bone; highlighting the importance of accessibility to these adult stem cells, the low risk of morbidity for the patient, and their high potential to become bone-forming cells.*

**Key words:** bone regeneration, dental pulp stem cells, mesenchymal cells, tissue engineering.

### **Células madre**

Se sabe que las *células madre* son aquellas que pueden dar origen a diferentes tejidos y tipos celulares durante el desarrollo y crecimiento de un individuo. Pueden permanecer inactivas por largos períodos, pero poseen un potencial ilimitado de división celular. Esta característica les permite repoblar aquellos órganos que requieren reparación debido a un daño y, en determinadas circunstancias, diferenciarse hacia células maduras de distintos linajes, a través de procesos regulados por la interacción de sus genes con señales provenientes del microambiente celular.<sup>1</sup>

Además de estar presentes en la vida embrionaria, también las podemos encontrar en

el individuo adulto. En este último caso podemos citar, entre otras, las células madre hematopoyéticas, neuronales, de bulbo olfatorio, de piel, y las *células madre mesenquimales*. También llamadas células estromales multipotentes (*multipotent stromal cells*) fueron aisladas a partir de la médula ósea de organismos adultos, e inicialmente caracterizadas como células fibroblastoides con capacidad de adhesión al plástico, que tenían la particularidad de diferenciarse hacia células del linaje osteoblástico cuando eran trasplantadas en un animal.<sup>2,3</sup>

Sabemos que estas células residen en los tejidos conectivos de casi todos los órganos y se ha descrito que, además de dar origen a músculo, hueso, cartílago y tejido adiposo, podrían diferenciarse en otros tejidos mediante mecanismos de transdiferenciación.<sup>4</sup>

Recientemente se describió una fuente mucho más accesible de células madre mesenquimales adultas, la pulpa dental.<sup>5</sup>

### **Células madre de pulpa dental**

Su presencia ha sido observada en piezas dentales tanto temporarias como permanentes. Diversos autores describieron la presencia de una población de células madre mesenquimales con un altísimo potencial clonogénico y proliferativo, con capacidad de diferenciarse hacia células óseas de tejidos dentales y condrocitos.<sup>6</sup>

Los tejidos dentales son tejidos especializados que no sufren remodelación continua como el hueso una vez terminada su formación. Las piezas dentales contienen en su interior la pulpa dental, vulgarmente llamada "nervio", que está formada por tejido conectivo, un paquete vasculonervioso, con células tales como fibroblastos, macrófagos, odontoblastos y una población de células mesenquimales que se mantiene indiferenciada como reservorio celular de todas las células que forman la pulpa. Por tal motivo, algunos autores han denominado a la pulpa dental "nicho" de células madre.<sup>7</sup>



La pulpa de piezas dentales tanto temporarias (de leche) como permanentes tiene en su interior células madre. Los dientes de leche comienzan a formarse en la 6<sup>o</sup> semana de vida intrauterina. Las células madre de los dientes temporarios, también llamadas SHEDs (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*), derivan de la cresta neural, se caracterizan por tener un gran potencial proliferativo y clonogénico y son capaces de diferenciarse en una gran diversidad de linajes celulares.<sup>8</sup>

El recambio dental es un proceso dinámico y coordinado en el cual se combinan el desarrollo y la erupción de la pieza permanente con la reabsorción radicular de la temporaria. Para el momento de la exfoliación o caída del diente, una pequeña porción de pulpa permanece intacta y vital dentro del diente en la mayoría de los casos.

Las SHEDs provienen, por lo tanto, de una fuente muy accesible y, a pesar de encontrarse en volúmenes muy pequeños, gracias a su altísimo potencial proliferativo y clonogénico, una pulpa dental sería capaz de proveer suficiente cantidad de células madre como para una posible aplicación clínica.<sup>8</sup>

Estas células pueden ser diferenciadas *in vitro*, bajo el estímulo adecuado, en distintos tipos celulares como adipocitos, odontoblastos, células neuronales y osteoblastos.<sup>9</sup> Luego de ser trasplantadas *in vivo* se encontró que son capaces de formar hueso y generar dentina.<sup>8</sup>

Las células madre de las piezas permanentes, también llamadas DPSCs (*Dental Pulp Stem Cells*), son células madre mesenquimales adultas. Ambos tipos celulares son capaces de originar linajes celulares osteogénico, condrogénico, adipogénico y neuronal. Las DPSCs pueden diferenciarse también hacia el linaje celular odontogénico.<sup>10</sup>

### **Aislamiento y caracterización de células madre de pulpa dental**

Los primeros trabajos de aislamiento de pulpa dental vital y sana, sin patologías, apa-

recen en el año 2000 y fueron realizados por el equipo de Gronthos y cols.,<sup>6</sup> quienes aislaron células madre de pulpa dental de piezas permanentes (DPSC). En el año 2003, Miura y cols. aislaron células madre de piezas temporarias (SHEDs).<sup>8</sup> Estas células fueron consideradas células madre mesenquimales ya que resultaron positivas para marcadores como CD90, CD105, CD73 y negativas para marcadores de células diferenciadas, en concordancia con los criterios establecidos para definir una célula mesenquimal.<sup>11</sup> Algunos autores han descrito también que, de la pulpa dental inflamada de piezas temporarias o permanentes, pueden ser aisladas células madre y cultivadas con éxito.<sup>12-14</sup>

### **Diferenciación osteogénica**

Una vez aisladas y caracterizadas, las células madre mesenquimales (MSC) pueden ser diferenciadas, bajo el estímulo adecuado, hacia diferentes tipos celulares como neuronas, condrocitos, adipocitos, hepatocitos y osteoblastos, entre otras,<sup>6,8,11,15</sup> y pueden ser utilizadas para ingeniería de tejidos, medicina regenerativa y reconstructiva.<sup>16,17</sup> Incluso algunos autores encontraron un mayor potencial de diferenciación osteogénica en las DPSC al compararlas con BMSC y células madre de tejido adiposo.<sup>18</sup>

Para lograr la diferenciación osteogénica, algunos autores utilizan métodos de separación celular mediante *cell sorting* con el fin de obtener solamente una población de células que expresen en su superficie marcadores como CD117 (C kit), CD34, flk-1 y STRO-1.<sup>9</sup> De esta manera obtienen una población celular homogénea que, al ser cultivada con un medio suplementado con 20% de suero fetal bovino por 30 días, comienza a diferenciarse en osteoblastos. Otros investigadores prefieren utilizar medios específicos para la diferenciación osteogénica sin realizar ningún tipo de selección inicial. Como ejemplo, luego de aislar y caracterizar las MSC, estas son sembradas en un medio de cultivo suplemen-

tado con ácido ascórbico, dexametasona y  $\beta$ -glicerofosfato, que induce la diferenciación de estas células hacia osteoblastos. Algunos autores han utilizado proteína morfogenética recombinante humana (BMP-4) para estimular la diferenciación osteogénica.<sup>8</sup>

Al cabo de cuatro semanas, las MSC cultivadas con el medio de diferenciación osteogénica comienzan a sufrir cambios tanto morfológicos como de marcadores de superficie. Antes de su diferenciación, las MSC presentan una morfología de aspecto fibroblástico, generalmente formando una monocapa. A medida que avanza la diferenciación, su morfología se torna cuboidal y sus organelas se disponen con características de osteoblastos similares a los que se observan en la osteogénesis *in vivo*.<sup>9</sup>

Por otro lado, al diferenciarse comienzan a expresar diferentes marcadores de superficie. A los 40 días, el análisis con citometría de flujo y *real time-PCR* revela que las células cultivadas expresan flk-1, CD44 y el factor de transcripción RUNX-2, marcadores de células progenitoras osteogénicas. A los 45 días de cultivo, las células comienzan a ser positivas para osteocalcina (OC), fosfatasa alcalina ósea (FAo) y sialoproteína ósea (BSP), marcadores de osteoblastos.<sup>9</sup>

Asimismo, luego de la diferenciación, la actividad de la fosfatasa alcalina aumenta (tinción con rojo alizarina positiva),<sup>8</sup> así como también la calceína, indicando que estas células son osteoblastos involucrados en el proceso de osificación.<sup>19</sup> Otros marcadores de actividad ósea descriptos son CBFA1, MEPE, Osterix y la superfamilia de las BMP.<sup>8,20</sup>

### **Formación de tejido óseo con células madre de pulpa dental *in vivo***

Se han descripto diversas técnicas para trasplantar las células al sitio receptor. En algunos casos se utilizan las células madre diferenciadas y en otros sin diferenciar (SHED o DPSC). Las células pueden ser trasplantadas utilizando como transportadores algunos bio-

materiales como hidroxiapatita (HA)/fosfato tricálcico (FTC), esponjas de colágeno, gels,<sup>16</sup> o bien cultivadas *in vitro* sobre andamiajes o estructuras tridimensionales (*scaffolds*) como para generar un bloque de hueso vivo *in vitro* que luego será trasplantado al sitio receptor.<sup>6,19-22</sup>

En otros casos se utilizaron tanto DPSCs como SHEDs (sin diferenciar) mezcladas con HA/FTC en polvo y fueron trasplantadas de manera subcutánea en ratones inmunosuprimidos.<sup>6,8,23</sup> En estos casos, y ocho semanas postrasplante, se encontró evidencia de diferenciación espontánea hacia osteoblastos y formación de estructuras similares a hueso con médula ósea, a diferencia de los controles donde estos procesos no fueron inducidos por la mera presencia de HA/FTC.

Trabajando en defectos óseos provocados en calota de ratón se obtuvieron los mismos resultados mediante células criopreservadas.<sup>23</sup> Además de osteoblastos, en el sitio regenerado con células madre, se encontraron células similares a osteoclastos, lo cual indicaría que el tejido neoformado tendría la capacidad de remodelarse. Este hallazgo es de suma importancia clínica ya que, si las células madre de pulpa dental son capaces de formar una estructura ósea con la habilidad de remodelarse fisiológicamente, se podrían utilizar para ingeniería de tejidos.

### **SHEDs o DPSCs diferenciadas *in vitro* para formar tejido mineralizado**

La generación de hueso *in vitro* cuenta con una limitación importante: lograr un tejido tridimensional y no una monocapa de células rodeado de una matriz mineralizada. En tal sentido se han publicado diversos trabajos de investigación en los cuales se diferencian las células madre de pulpa dental *in vitro*, mediante la ayuda de andamiajes o bien de matrices, intentan formar una estructura tridimensional que luego será trasplantada.<sup>9,24,25</sup>

Se han utilizado diversos biomateriales tales como membranas y esponjas de colá-



geno, vidrio bioactivo,<sup>26</sup> geles,<sup>16</sup> microesferas de alginato,<sup>27</sup> matrices de biocoral, o microesferas elaboradas con polímeros biodegradables derivados de los ácidos láctico y glicólico: poliláctico-co-glicólico (PLGA), donde se siembran las células para que colonicen la estructura del andamiaje e ir logrando la tridimensionalidad *in vitro*.<sup>9,24,25,28</sup> El material y su porosidad parecen ser determinantes en su capacidad osteoconductiva. Cuanto más porosa la superficie de la matriz, mejor resultaron la calidad y la cantidad de tejido óseo formado, y las células mostraron una mayor actividad de fosfatasa alcalina y de liberación de BMP-2 y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) al medio, factores indicadores de osteogénesis y angiogénesis.<sup>20</sup> Estos trabajos mostraron que en los bloques injertados en animales inmunosuprimidos, evaluados durante 2 meses, hubo remodelación ósea que culminó en un hueso laminillar con osteocitos atrapados en su estructura, y una matriz extracelular con marcadores óseos, entre ellos colágeno I, osteonectina, fosfatasa alcalina ósea, osteocalcina y sialoproteína ósea.<sup>9,20</sup>

El papel del biomaterial utilizado como *scaffold* también tiene influencia en la adhesión, proliferación y diferenciación celular.<sup>29</sup> La estructura, porosidad y composición influyen directamente sobre el comportamiento celular y el resultado obtenido. En un trabajo, Ling y cols. compararon el efecto de 2 diferentes estructuras de fosfato de calcio en la diferenciación osteogénica de DPSC de conejo: por un lado,  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) y, por el otro, un compuesto de nano-hidroxiapatita, colágeno y L-poliláctico (nHAC/PLA) que imitaba la microestructura y porosidad del hueso. Los resultados obtenidos mostraron que el grupo de DPSC sembradas sobre nHAC/PLA presentó una mayor adhesión y proliferación celular en las primeras semanas, pero, en períodos posteriores, el grupo DPSC con  $\beta$ -TCP presentó mayor mineralización y evidencias de hueso maduro que el primer grupo.<sup>29</sup> En otro trabajo realizado se compararon dos sca-

*ffolds* de colágeno de diferente composición y su influencia sobre la proliferación celular, diferenciación osteogénica y mineralización.<sup>30</sup> Este trabajo demostró que la combinación de DPSC con *scaffolds* de colágeno y silicato intrafibrilar promueve la proliferación celular, la expresión de genes y proteínas asociadas con la diferenciación celular y fue mayor que al utilizar *scaffolds* sin silicato. El resultado final fue la formación de un tejido similar al hueso.<sup>30</sup> Se está estudiando también la influencia del estímulo mecánico sobre la osteogénesis en modelos *in vitro*. La carga mecánica sobre el cultivo celular aumentó el número de células viables al compararlas con el grupo control.<sup>31</sup>

### Obtención de hueso vascularizado

Algunos autores han demostrado que la diferenciación osteogénica se acompaña de la formación de vasos sanguíneos que le aportarán vascularización al bloque y que serán de vital importancia para el trasplante *in vivo*, ya que ocurre una completa integración. Esto se debería a una diferenciación sinérgica de osteoblastos y células endoteliales.<sup>9</sup> En este sentido, d'Aquino y cols. hicieron el seguimiento de la expresión temporal de los marcadores de superficie de las células mientras se diferenciaban y encontraron que un 70% de estas expresaban marcadores del linaje óseo y el 30% restante, de células endoteliales como CD54, Von Willebrand, CD31 (PECAM-1) y enzima convertidora de angiotensina. Esto indicaría que habría una diferenciación tanto hacia osteoblastos como hacia células endoteliales. Estas células fueron capaces de formar *in vitro* chips de hueso medular con vasos sanguíneos (detectables a los 50 días de cultivo), y al ser trasplantados *in vivo* se integraron completamente al suministro sanguíneo del receptor. Los vasos sanguíneos se disponían en sistemas de Havers rodeados por hueso laminillar. Estos resultados son de suma importancia clínica ya que muestran que se puede formar *in vitro* un bloque de hueso autólogo, vascularizado,

vivo, listo para ser utilizado en una aplicación clínica.<sup>9,19</sup>

### Conclusiones

La pulpa dental representa una fuente accesible de células madre mesenquimales adultas, que poseen un alto potencial proliferativo y clonogénico y son capaces de ser diferenciadas y dar origen a un tejido óseo maduro, autólogo y vivo, bajo condiciones específicas de inducción de diferenciación, que

podría ser utilizado en regeneración ósea y medicina reconstructiva.

### Conflicto de intereses

Las autoras declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: febrero 2015.  
Aceptado: octubre 2015)

### Referencias

1. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64:278-94.
2. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276:71-4.
3. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-92.
4. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007; 25:2896-902.
5. Di Benedetto A, Carbone C, Mori G. Dental pulp stem cells isolation and osteogenic differentiation: a good promise for tissue engineering. *Methods Mol Biol* 2014; 1210:117-30.
6. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13625-30.
7. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003; 18:696-704.
8. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:5807-12.
9. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007; 14:1162-71.
10. Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81:531-5.
11. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-17.
12. Yu S, Diao S, Wang J, Ding G, Yang D, Fan Z. Comparative analysis of proliferation and differentiation potentials of stem cells from inflamed pulp of deciduous teeth and stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Biomed Res Int* 2014; 2014:930907.
13. Wang Y, Yan M, Wang Z, et al. Dental pulp stem cells from traumatically exposed pulps exhibited an enhanced osteogenic potential and weakened odontogenic capacity. *Arch Oral Biol* 2013; 58:1709-17.





14. Wang Y, Yan M, Fan Z, Ma L, Yu Y, Yu J. Mineral trioxide aggregate enhances the odonto/osteogenic capacity of stem cells from inflammatory dental pulps via NF- $\kappa$ B pathway. *Oral Dis* 2014; 20:650-8.
15. Lee TH, Kim WT, Ryu CJ, Jang YJ. Optimization of treatment with recombinant FGF-2 for proliferation and differentiation of human dental stem cells, mesenchymal stem cells, and osteoblasts. *Biochem Cell Biol* 2015:1-8.
16. Li JH, Liu DY, Zhang FM, Wang F, Zhang WK, Zhang ZT. Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin Med J (Engl)* 2011; 124:4022-8.
17. Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Martínez S, Moraleda JM. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. *J Craniofac Surg* 2012; 23:e571-5.
18. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. A comparison of the in vitro mineralisation and dentinogenic potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue, bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Metab* 2015; 33:371-82.
19. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005; 20:1394-402.
20. Graziano A, d'Aquino R, Cusella-De Angelis MG, et al. Concave pit-containing scaffold surfaces improve stem cell-derived osteoblast performance and lead to significant bone tissue formation. *PLoS One* 2007; 2:e496.
21. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cells Mater* 2009; 18:75-83.
22. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006; 206:693-701.
23. Ma L, Makino Y, Yamaza H, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS One* 2012; 7:e51777.
24. Riccio M, Resca E, Maraldi T, et al. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *Eur J Histochem* 2010; 54:e46.
25. Mangano C, Paino F, d'Aquino R, et al. Human dental pulp stem cells hook into biocoral scaffold forming an engineered biocomplex. *PLoS One*. 2011; 6:e18721.
26. El-Gendy R, Yang XB, Newby PJ, Boccaccini AR, Kirkham J. Osteogenic differentiation of human dental pulp stromal cells on 45S5 Bioglass® based scaffolds in vitro and in vivo. *Tissue Eng Part A* 2013; 19:707-15.
27. Kanafi MM, Ramesh A, Gupta PK, Bhonde RR. Dental pulp stem cells immobilized in alginate microspheres for applications in bone tissue engineering. *Int Endod J* 2014; 47:687-97.
28. Karadzic I, Vucic V, Jokanovic V, et al. Effects of novel hydroxyapatite-based 3D biomaterials on proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103:350-7.
29. Ling LE, Feng L, Liu HC, et al. The effect of calcium phosphate composite scaffolds on the osteogenic differentiation of rabbit dental pulp stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2015; 103:1732-45.
30. Niu L, Sun J, Li Q, et al. Intrafibrillar-silicified collagen scaffolds enhance the osteogenic capacity of human dental pulp stem cells. *J Dent* 2014; 42:839-49.
31. Ji J, Sun W, Wang W, Munyombwe T, Yang XB. The effect of mechanical loading on osteogenesis of human dental pulp stromal cells in a novel in vitro model. *Cell Tissue Res* 2014; 358:123-33.