

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DOUTORADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

Caracterização *in vivo* do destino das células-tronco da polpa dentária

Linha de pesquisa

Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

CAROLINA CUCCO

Orientador

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Porto Alegre, Maio de 2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

Caracterização *in vivo* do destino das células-tronco da polpa dentária

Linha de pesquisa

Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia na área de Endodontia

CAROLINA CUCCO

Programa de Doutorado no país com estágio no Exterior (PDSE) – CAPES

Processo: BEX 490513-1

Convênio PUCRS-UMICH

Orientador no país

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Orientador no Exterior

Prof. Dr. Jacques Eduardo Nör

Porto Alegre, Julho 2015.

“In the infinity of life where I am, all is perfect, whole, and complete, and yet life is ever changing. There is no beginning and no end, only a constant cycling and recycling of substance and experiences. Life is never stuck or static or stale, for each moment is ever new and fresh. I am one with the very Power that created me, and this Power has given me the power to create my own circumstances. I rejoice in the knowledge that I have the power of my own mind to use in any way I choose. Every moment of life is a new beginning point as we move from the old. This moment is a new point of beginning for me right here and right now.”

Louise L. Hay

Dedico esse trabalho,

Àqueles que nunca medem esforços para realizarem meus sonhos, que sempre estão ao meu lado, que são meus melhores amigos e razão da minha existência:

Minha mãe Dorotéia, meu porto seguro, obrigada por estar sempre comigo, pelo colo, pelo carinho e pelo amor incondicional...

Meu pai Arci, minha força, meu exemplo, obrigada pelo incentivo, pelo carinho e por sempre acreditar em mim...

Queridos pais, meus exemplos diários de amor e dedicação à vida e à Odontologia, obrigada por encherem minha vida de alegria!

Amo muito vocês!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

Agradecimentos

Agradeço pela ajuda na realização deste trabalho:

Ao **Gregory Ewing**, meu amor, meu companheiro, meu amigo. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por me apoiar e incentivar. Obrigada pelas revisões de inglês deste trabalho, pela sua pronta disponibilidade em me ajudar e pela paciência em entender, sem questionar, os momentos que eu precisava silêncio e isolamento para trabalhar. Obrigada por trazer equilíbrio e vida a minha vida, e por todos os momentos especiais vividos em Michigan. Esta conquista também é tua.

Ao meu irmão, **Marcelo Cucco**, meu amigo do coração e grande parceiro de aventuras. Obrigada por me trazer alegrias e por sempre me apoiar e acreditar em mim.

Às famílias **Ahn e Ewing**, por terem me acolhido com tanto carinho, e me confortado em todos os momentos que precisei enquanto estava em Ann Arbor.

À **Judy Anh-Ewing**, obrigada pela comida caseira, carinho e momentos especiais compartilhados comigo.

À **James Ewing**, agradeço do fundo do coração todos os prudentes e sábios conselhos, e principalmente por me confortar nos momentos difíceis de trabalho, sempre me lembrando que “**Learning is an error driven process**”. Vou levar isso comigo para sempre!

Às minhas queridas amigas e colegas de mestrado e doutorado, **Cauana Oliva Tavares e Magda Souza Reis**, pelo carinho e pela amizade que construímos durante estes anos. Obrigada pelo apoio de sempre.

Às minhas queridas amigas e colegas de profissão, **Catiane Rizzatto, Francine Konrath e Litiane Paludo de Conto**, pelo apoio e amizade incondicional. Vocês moram no meu coração.

À minha amiga **Gleyce Oliveira Silva**, pelo ano que moramos juntas em Ann Arbor, e pelo apoio e ajuda nos primeiros dias de laboratório. Obrigada pelos ensinamentos em

cultura celular e também pela amizade e aventuras inesquecíveis na Upper Penninsula –
MI.

Ao meu querido amigo **Gerson Acasigua**, pela disponibilidade em ajudar no laboratório com os ratinhos e também na construção de gráficos. Obrigada pela amizade e aventuras no inverno gelado de Ann Arbor. Sou muito grata por ter te conhecido e te desejo toda a felicidade e sucesso!

Aos meus queridos colegas e amigos do Angiogenesis lab: **Min Oh, Kristy Warner, April Adams, Sunny, Daiky, Alex, Tatiana Botero**, pelos ensinamentos, pela amizade e apoio durante meu período no lab. Obrigada por me receberem com tanto carinho e por estarem sempre dispostos a me ajudar. Em especial ao **Zhaocheng Zhang**, pela paciência em me ensinar todos os protocolos, e incentivo, nunca me deixando desanimar.

Às funcionárias da Universidade de Michigan **Renita e Courtney**, pela ajuda tanto antes quanto durante o estágio sanduíche.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)** pela minha formação.

À comissão coordenadora, professores e funcionários do **Programa de Pós Graduação da FO-PUCRS**.

À **CAPES** pela bolsa de estudos durante o curso de doutorado.

E a todos que, de alguma forma, me auxiliaram na realização dessa tese.

Agradecimentos Especiais

Ao querido **Prof. Jacques Eduardo Nör**, minha eterna gratidão pelos preciosos ensinamentos, e pela grande oportunidade de trabalhar em seu laboratório. Foi um ano muito inesquecível, de muito crescimento e aprendizado incalculável. És para mim um exemplo de ser humano, professor, pesquisador e profissional.

Ao querido **Prof. José Antônio Poli de Figueiredo**, jamais conseguirei agradecer todas as oportunidades que me proporcionaste! Obrigada pelo convívio e aprendizado. Obrigada por sempre me incentivar e acreditar em mim! Tu és um exemplo de dedicação e profissionalismo. Minha admiração e carinho por ti são infinitos.

“The number one goal of teachers should be to help students learn how to learn. But another goal as important as that is to help students to judge themselves. Did they recognize their true abilities? Did they have a sense of their own flaws? Were they realistic about how others viewed them? In the end, educators best serve students by helping them be more self-reflective. The only way any of us can improve is if we develop a real ability to assess ourselves.”

Randy Pausch

SUMÁRIO

RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO.....	17
1- Células Tronco.....	18
1.1- Células-tronco mesenquimais e células-tronco da polpa dentária (DPSC).....	21
1.2- Matrizes Condutivas	23
1.3- Sinalização Celular	26
1.3.1- Angiogênese e vasculogênese: a formação dos vasos sanguíneos.....	26
1.3.2- Receptores para VEGF	29
1.4- Via de Sinalização do sistema receptor Ang-1/Tie2.....	30
1.4.1- Papel da via Ang-1/Tie2 na queiscência vascular.....	32
1.4.2- Papel da via Ang-1/Tie2 na angiogênese.....	33
1.4.3- Distinta via de sinalização induzida pela molécula Tie2 tras-associada ou pela ligação da molécula Tie2 com a matriz extracelular (ECM).....	35
1.5- Diferenciação de Células-Tronco em Células Endoteliais	37
1.5.1- Marcadores de células endoteliais.....	38
PROPOSIÇÃO.....	40
ARTIGO 1: Characterization of DPSC fate in immunodeficient mice.....	42
ARTIGO 2: How tooth configuration evolves towards signaling pathways.....	66
DISCUSSÃO.....	85
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
FIGURAS COMPLEMENTARES.....	60
ANEXOS.....	113

Lista de Abreviaturas e Símbolos

% = por cento

°C = graus Celsius

µg = micrograma

µm = micrometro

AA = ácido ascórbico

AKT = proteína quinase

BMP = proteína morfogenética óssea

Caderina-VE = caderina vascular endotelial

CD31 = grupamento de diferenciação 31

CD54 = grupamento de diferenciação 54

cDNA = DNA complementar

CO₂ = dióxido de carbono

DAB = 3-3'-diaminobenzidina

DEX = dexametasona

DMP-1 = proteína 1 da matriz dentinária

DMP-2 = proteína 2 da matriz dentinária

DMP-3 = proteína 3 da matriz dentinária

DNA = ácido desoxirribonucléico

DNase = desoxirribonuclease

DPP = fosfoproteína dentinária

DPSC = células-tronco da polpa dentária

DSP = sialoproteína dentinária

DSPP = sialofosfoproteína da dentina

DTT = ditioneitol

ECM: matrix extracelular

EDTA = ácido etilendiamino tetra-acético

EGM2-MV = meio de célula endotelial microvascular 2

ELISA = ensaio imunoenzimático

ERK = quinase reguladora de sinal extracelular

et al = e colaboradores

FBS = soro bovino fetal

Flk-1 = receptor 1 da quinase fetal de fígado

Flt-1 = receptor 1 da tirosina quinase do tipo fms

Flt-4 = receptor 4 da tirosina quinase do tipo fms

G418 = geneticina

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

H₂O = água

HBS = HEPES-salina tamponada

HDMEC = células endoteliais de microvasos da derme de humanos

HE = hematoxilina e eosina

IgG = imunoglobulina

GK₃Fe(CN)₆ = hexacianeto de ferro tripotássico

K₄Fe(CN)₆ = hexacianeto de ferro tetrapotássico

kDa = kilodalton

K-DR = receptor de domínio para inserção da quinase

LB = Luria-Bertani

MDPC-23 = células odontoblásticas de camundongo

MEM α = meio essencial mínimo alfa

mL = mililitro

mM = milimolar

mW = miliwatt

ng = nanograma

nm = nanômetro

nM = nanomolar

NP 40 = nonil fenoxi polietoxietanol

NP-1 = neuropilina 1

p-AKT = fosfo-AKT

pb = pares de base

PBS = solução salina tamponada com fosfato

PECAM-1 = molécula-1 de adesão celular endotelial a plaquetas

p-ERK = fosfo-ERK

pH = potencial hidrogeniônico

PIGF = fator de crescimento placentário

PLLA = ácido poli-L-lático

p-STAT3 = fosfo-STAT3

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

RNase = ribonuclease

rpm = rotação por minute

RT-PCR = transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase

SCID = imunodeficiência combinada grave

SDS = dodecil sulfato de sódio

SHED = células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos

shRNA = *short hairpin* ácido ribonucleic

SRB = sulforrodamina

STAT3 = transdutor do sinal e ativador da transcrição 3

TBST = solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20

TGF β = fator de crescimento transformador beta

V = volt

VCAM = molécula 1 de adesão celular vascular

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-1 = receptor 1 para VEGF

VEGFR-2 = receptor 2 para VEGF

VEGFR-3 = receptor 3 para VEGF

x-gal = 5-bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

RESUMO

As células-tronco provenientes da polpa de dentes adultos (DPSC) são uma fonte promissora de células-tronco para a terapia regenerativa. Já foi demonstrado que elas podem se diferenciar em células endoteliais, mas os relatos histológicos temporais do seu destino ainda não foram demonstrados. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo elucidar o destino das DPSC-LacZ, bem como avaliar o efeito de algumas moléculas envolvidas na diferenciação endotelial destas células. Para isso, DPSC Lac-Z foram semeadas em scaffolds de fatias dentárias e implantadas no subcutâneo de camundongos imunodeficientes. 14 dias após a recuperação dos tecidos, observou-se células beta-galactosidase positivas alinhadas ao longo das paredes internas das fatias de dente, sugerindo a diferenciação destas em células semelhantes á odontoblastos. Ainda neste período, células beta-galactosidase positivas foram localizadas próximas aos vasos sanguíneos do roedor, algumas formaram estruturas tubulares e continham elementos celulares dentro do seu lúmen. Aos 21 dias, um tecido muito semelhante a polpa dental foi encontrado dentro das fatias dentais, e no dia 28 o número de células beta-galactosidade postivas era maior do que todos os periodos anteriores. Ainda, avaliou-se o papel da molécula VEGF e Ang-1 na diferenciação endotelial destas células bem como na fosforilação de algumas vias de sinalização. Para isso, um meio de cultura alpha-MEM suplementado com 50 ng/mL rhVEGF + 200 ng/mL rhAng-1, foi utilizado como estímulo para as DPSC se diferenciarem em células endoteliais. Durante um período de 28 dias as células expressaram marcadores endoteliais como VEGFR2, CD31, Ang-1 e Ang-2. Quando utilizamos células DPSC shRNA VEGFR-1 estimuladas pelas mesmas moléculas, a fosforilação de ERK e AKT foi aumentada, o que não ocorreu no grupo

controle.

ABSTRACT

Teeth exhibit limited repair in response to damage, and studies have shown that dental pulp stem cells (DPSCs) probably provide a source of cells to replace those damaged and to facilitate repair. Additionally, *in vivo* transplantation into immunocompromised mice demonstrated the ability of DPSCs to generate functional dental tissue in the form of dentine/pulp-like complexes. Therefore, the purpose of this study was to characterize the endothelial fate of DPSCs *in vivo* and to start to understand the role of Tie2/Ang-1 signaling pathway on the regulation of the endothelial differentiation of DPSCs. DPSCs stably transduced with LacZ were seeded into tooth slices and implanted into immunodeficient mice for 7, 14, 21 and 28 days. A combination of *in vitro* and *in vivo* assays were performed to determine the role of Ang-1 in the vasculogenic fate of DPSCs. Histologic analysis and immunohistochemistry from the retrieved tooth slices were performed. Dental pulp stem cells seeded in tooth slice/scaffolds and transplanted into SCID mice showed a continuous increase in number of beta-galactosidase-positive odontoblastic and endothelial cells along the 7, 14, 21 and 28 days of the study. At 21 days beta-galactosidase-positive capillaries located close to murine blood vessels were detected, confirming our previous report (Cordeiro et al, 2008; Sakai et al, 2010). DPSCs exposed to Ang-1 differentiated into cells expressing VEGFR2, CD31 and Tie2. Exposure of VEGFR1-silenced DPSC to Ang-1 and VEGF induced the activation of STAT3, Erk and Akt, while VEGF alone inhibited the phosphorylation of STAT3. This is consistent with the role of Akt and STAT3 in the regulation of cell survival and cell-cell interaction of DPSC through Tie2/Ang-1 signaling pathway. This study demonstrates that Angiopoietin-1 is involved in the vasculogenic differentiation of DPSCs.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento dentário ocorre por meio de sinalização indutiva mútua resultante da interação entre células do epitélio bucal e do ectomesênquima (Thesleff, Sharpe, 1997), ambas originárias de células da crista neural (Lumsden, 1988). Essas interações resultam na formação de uma camada externa de esmalte devido à atividade de células derivadas do epitélio bucal, chamadas ameloblastos, e uma camada interna de dentina mineralizada, produzida por odontoblastos, os quais são derivados da papila dentária. A polpa dos dentes é composta por um tecido conjuntivo frouxo, também derivado da papila dentária, infiltrado por uma rede de vasos sanguíneos e fibras nervosas provenientes do forame apical. A estrutura dentária completa é circundada por osso e mantida em seu local por meio do ligamento periodontal, derivado do folículo dentário, o qual também é de origem ectomesenquimal. O ligamento periodontal é firmemente mantido por fibras de tecido conjuntivo (fibras de Sharpey) embebidas entre a fina camada externa mineralizada do cimento e a parede interna do osso alveolar (Shi et al., 2005).

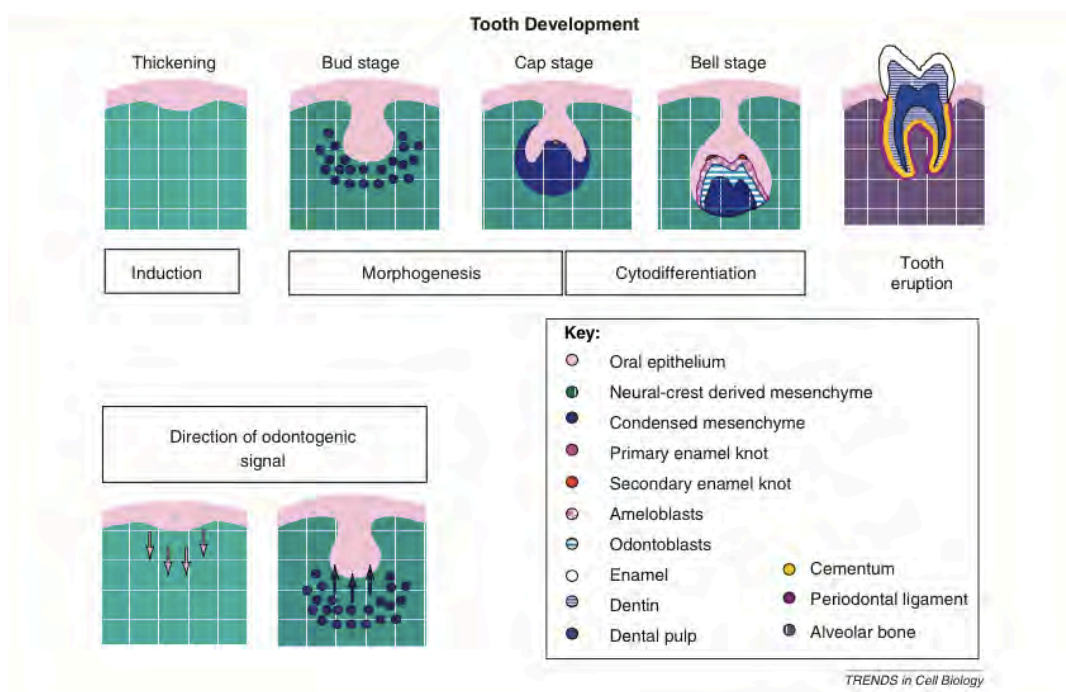


Fig1: Diagrama representando o desenvolvimento dentário (Volponi et al., 2010).

Embora a composição estrutural complexa dos dentes garanta a sua dureza e

durabilidade, essas estruturas rígidas são vulneráveis a muitos danos, como os causados por trauma mecânico, agentes químicos, defeitos congênitos, infecções bacterianas e câncer. Diferente de outros tecidos, tais como o ósseo, o qual tem a capacidade de reparação e remodelamento ao longo da vida pós-natal, os componentes relativamente estáticos dos dentes não sofrem regeneração imediata e completa após as injúrias. Contudo, dentes adultos demonstram alguns processos reparadores, ainda que limitados, tais como a formação de dentina reparadora (terciária), uma matriz mineralizada pobremente organizada, e de dentina secundária, que serve como uma barreira protetora para a polpa dentária (Tziafas, 2004). Uma vez que a dentina/camada de odontoblastos é rompida, acredita-se que os pré-odontoblastos são recrutados do tecido pulpar (Carlile et al., 2000) para o local lesado antes de se desenvolverem em odontoblastos funcionais (Avery et al., 2002).

O objetivo da Odontologia restauradora moderna é restabelecer funcional e esteticamente a estrutura dentária perdida (Edwards, Mason, 2006). Apesar do extenso conhecimento das patologias dentárias, a restauração ou substituição de tecidos doentes ou danificados limita-se basicamente ao uso de materiais sintéticos, tais como o amálgama, as resinas compostas e as coroas metálicas ou de porcelana (Mooney et al., 1996; Shi et al., 2005; Edwards, Mason, 2006; Zhang et al., 2006). Entretanto, os materiais sintéticos não são substitutos estruturais e funcionais adequados do tecido perdido, pois são incapazes de se remodelar frente a um insulto ou estímulo contínuo (Mooney et al., 1996). Embora esses materiais restauradores convencionais tenham se mostrado altamente efetivos na preservação dos dentes, eles apresentam uma vida útil limitada e, a longo prazo, normalmente necessitam substituição. Além disso, uma porcentagem significativa dos dentes restaurados acabam apresentando inflamação e necrose pulpar, o que requer na maioria das vezes tratamento endodôntico e reconstrução protética ou mesmo extração dentária.

Um dos tratamentos que mais trazem desafios aos endodontistas, é o tratamento de dentes permanentes imaturos com necrose pulpar. Dentre as principais etiologias que levam esses dentes à necrose pulpar, estão o trauma dentário e lesões de cárie não tratadas (Cvek, 1992). Tais condições são complicadas não somente pelas dificuldades técnicas de

limpeza e selamento do canal radicular, mas principalmente por estes dentes apresentarem paredes radiculares laterais muito finas, o que aumenta significativamente o risco de ocorrerem fraturas, limitando assim o prognóstico a longo prazo do tratamento (Deutsch et al., 1985; Cvek, 1992; Desai, Rafter, 2005; Chandler, 2009).

Historicamente, o tratamento de escolha para esse tipo de situação era a apicificação induzida pelo hidróxido de cálcio. Este tratamento implica na colocação de hidróxido de cálcio no interior do canal radicular para induzir a formação de uma barreira apical de tecido duro (Kerekes et al., 1980; Sheeby, Roberts, 1997; Abbott, 1998).

Mais tarde, a colocação de plugs de MTA foi a alternativa de tratamento de escolha, mas ainda não melhorou o tratamento no que diz respeito da fragilidade das paredes laterais do canal radicular e prognóstico a longo prazo (Simon et al., 2007; Holden et al., 2008; Witherspoon et al., 2008).

Neste contexto, estudos mais recentes têm proposto novas terapias para os casos de dentes permanentes com rotação incompleta e necrose pulpar. Dentre elas, a revascularização pulpar, que baseia-se principalmente nos estudos em dentes traumatizados (Banchs, Trope, 2004; Trope 2010; Lovelace et al., 2011). Esta abordagem tem se mostrado promissora, entretanto, ainda não muito definida no que diz respeito aos resultados clínicos, tanto pelo pouco tempo de acompanhamento dos casos (Miller et al., 2012) quanto pela heterogeneidade dos resultados clínicos obtidos (Chen et al., 2012). Isso porque, as avaliações histológicas dos tecidos formados apresentadas nestes estudos, mostraram a presença de um tecido mineralizado semelhante ao cimento, mas diferente do que se considera um tecido pulpar saudável (Wang et al., 2010; Yamauchi et al., 2011). Essa possível calcificação pulpar pode vir a inviabilizar um tratamento convencional no futuro, o que não é desejável.

Diante dessa perspectiva, atualmente, os conhecimentos dos aspectos celulares e moleculares envolvidos nas patologias e terapias odontológicas têm sido cada vez mais estudados (Nör, 2006), e com isso, o surgimento de novos conceitos e possibilidades de tratamento para situações onde até agora não havia alternativa (Slavkin, 1999). De acordo com esses novos conceitos, a terapia ideal para os casos de dentes permanentes com

rizogênese incompleta e necrose pulpar, constituiria na substituição da polpa comprometida por um novo tecido pulpar, capaz de regenerar o dente, ou seja, proporcionar o seu término do desenvolvimento radicular, tanto no sentido apical quanto lateral. Essa polpa, por sua vez, ao produzir dentina, proporciona além do fechamento apical, o reforço das paredes radiculares laterais e o retorno da capacidade sensorial do mesmo.

Esse conceito vem de encontro com o que chamamos de bioengenharia tecidual. A Bioengenharia tecidual é um campo em crescente expansão, e reúne conceitos multidisciplinares com o objetivo de regenerar tecidos lesados ou perdidos (Langer, Vacanti, 1993). Esta nova ciência está alicerçada sobre 3 fatores principais: (1) identificação de células progenitoras, capazes de se diferenciar nos tecidos de interesse quando semeadas em (2) matrizes biocompatíveis e (*scaffolds*), que irão sustentar as células, substituindo, temporariamente, a matriz extracelular e (3) moléculas sinalizadoras, responsáveis pelo desencadeamento do processo de sinalização, proliferação, migração e diferenciação celular em linhagens celulares mais especializadas (Langer Vacanti, 1993; Yang et al., 2001; Lavik, Langer, 2004).

1. Células-Tronco

As células-tronco são geralmente definidas como células originadas de clones capazes de auto-renovação e de diferenciação em várias linhagens celulares (Gronthos et al., 2002; Polak, Bishop, 2006). Elas podem se dividir tanto simétrica quanto assimetricamente. A divisão simétrica aumenta o número de células-tronco no nicho, enquanto a divisão assimétrica mantém o número de células-tronco inalteradas e gera células com diferentes propriedades. Estas células também são auto-renováveis, e podem manter o tecido por toda a vida (Bluteau et al., 2008). Além disso, as células-tronco podem ser de origem embrionária, proveniente de tecidos adultos, ou células somáticas induzidas à serem pluripotentes (iPC)(Anderson et al., 2001; Reya et al., 2001; Rao, 2004; Bluteau et al., 2008).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e são pluripotentes, ou seja, são capazes de gerar todos os tipos celulares diferenciados do

organismo, com exceção dos anexos embrionários.

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPC), foram originadas da necessidade de se transpor as barreiras éticas e legais do uso de embriões humanos. Alguns experimentos renomados (Wilmut et al., 1997), mostraram que células somáticas poderiam ser reprogramadas pela transferência do seu conteúdo nuclear em oócitos, ou por fusão com células-tronco embrionárias (Tada et al., 2001; Cowan et al., 2005). A partir desse conhecimento, verificou-se que existem fatores comuns entre óvulos e células-tronco embrionárias, o que lhes confere características como pluripotência ou totipotência (capacidade de gerar todas as células do organismo e os anexos embrionários). A partir de então, foi criada a hipótese de que, se esses fatores fossem identificados, poderiam ser utilizados para induzir pluripotência em células somáticas (Takahashi, Yamanaka, 2006).

1.1. Células Tronco Mesenquimais e células-tronco da polpa dentária (DPSCs)

As células-tronco provenientes de tecidos adultos, também conhecidas como células-tronco pós-natais, ou células tronco mesenquimais (MSC), são células que apresentam características únicas: existem como células indiferenciadas e mantêm esse fenótipo em função do ambiente e/ou de populações celulares adjacentes até que sejam expostas e respondam a sinais apropriados. Têm habilidade de auto-replicação por longo período de tempo e mantêm seu potencial de diferenciação múltipla por toda a vida do organismo (Nakashima, Akamine, 2005).

As primeiras células-tronco mesenquimais isoladas e caracterizadas foram as células-tronco da medula óssea (BMMSC) (Friedenstein et al., 1970; Prockop, 1997). Essas células demonstraram ter potencial de se diferenciarem em diferentes tecidos de origem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e estroma fibroso mielosuportivo (Prockop, 1997; Huang et al., 2009). Posteriormente, células-tronco mesenquimais foram isoladas de diferentes tecidos, dentre eles a pele, a retina, o tecido neural, o epitélio dentário, entre outros. (Harada et al., 1999; Fuchs, Segre, 2000; Bianco et al., 2001; Blau et al., 2001; Morscheck et al., 2008; Volponi et al., 2010).

Recentemente, Gronthos et al. (2000, 2002) identificaram populações de células-tronco

pós-natais na polpa de dentes permanentes humanos (DPSCs), dando início à utilização de um novo modelo para o estudo da diferenciação de células-tronco adultas *in vitro* e regeneração tecidual *in vivo*. Da mesma forma, Miura et al. (2003) observou que o remanescente pulpar derivado de dentes decíduos também contém uma população de células-tronco pós-natais capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial, as quais foram denominadas de células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED).

DPSC e SHED demonstraram a habilidade de gerar um complexo semelhante ao dentino-pulpar quando co-implantadas com partículas de hidroxiapatita e fosfato tricálcio no tecido subcutâneo de camundongos imunodeprimidos. Implantes de DPSC e SHED desenvolveram áreas de tecido pulpar vascularizado, circundado por uma camada bem definida de células semelhante a odontoblastos, alinhadas ao redor de dentina mineralizada, com seus processos estendendo-se dentro de estruturas tubulares. O material semelhante à dentina formado nos implantes tinha um aspecto globular mineralizado, compatível com a estrutura de dentina em dentes humanos. Além disso, as células semelhantes aos odontoblastos e às demais células pulpares originaram-se dos tecidos do doador (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003).

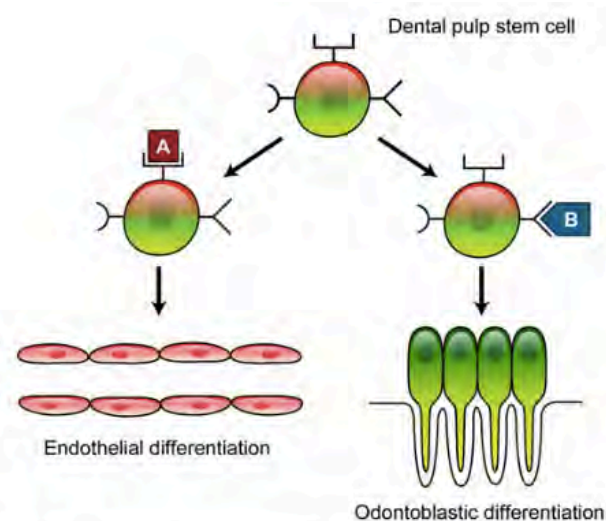


Fig2: Representação esquemática da multipotência das DPSCs. Neste exemplo hipotético, o fator A induz diferenciação vasculogênica, enquanto que o fator B induz

diferenciação odontoblástica (Casagrande et al., 2011).

A descoberta desse nicho de células-tronco nos tecidos dentais e a possibilidade de isolar as mesmas, proporcionou aplicar os conceitos da bioengenharia tecidual para a regeneração do tecido pulpar (Gronthos et al, 2000; Miura et al, 2003; Sharpe et al, 2005; Zhang et al, 2005; Volponi et al, 2012). Esta perspectiva é de importante benefício para a Endodontia, pois a possibilidade de recuperação de um tecido pulpar funcional, principalmente para o tratamento de casos de dentes permanentes não-vitais e com formação radicular incompleta, possibilitará uma nova alternativa e possível melhora do prognóstico dos mesmos (Nör, 2006).

1.2- Matrizes Condutivas (*scaffolds*)

Além das células, outro componente essencial na regeneração tecidual é o uso de matrizes apropriadas. A função da estrutura tridimensional da matriz é fornecer local para adesão das células, dar suporte à proliferação, migração e diferenciação celulares (Nakashima, Akamine, 2005; Zhang et al., 2006; Zhang et al., 2007), guiar o processo de crescimento e organização tecidual (Nör et al., 2001; Zhang et al., 2007) e servir como veículo para levar as células ao local onde se deseja regenerar o tecido (Mooney et al., 1996; Nakashima, Akamine, 2005). Matrizes utilizadas em engenharia de tecidos são normalmente tridimensionais e desenhadas para imitar as características da matriz extracelular natural (Zhang et al., 2006), devendo ser biocompatíveis, atóxicas e com resistência física e mecânica apropriada (Nakashima, Akamine, 2005). Além disso, podem funcionar como propulsores de condições para adesão celular e sobrevivência, fornecendo sinais morfogenéticos que suplementam aqueles vindos do hospedeiro, possibilitando diferenciação e direcionamento das células-tronco (Piva et al., 2014).

Amplamente falando, *scaffolds* podem ser divididos em 2 grupos: (1) fundidos (i.e relativamente rígidos) ou (2) injetáveis (i.e gels de baixa viscosidade que podem ser aplicados e ‘modelados’ no local onde se necessita regeneração tecidual). Ainda, podem ser fabricados a partir de materiais naturais, ou sintéticos (Mooney et al., 1996; Zhang et al., 2007).

Matrizes fabricadas a partir de polímeros sintéticos e biodegradáveis parecem ser especialmente atrativas, pois o tempo de degradação das mesmas pode ser determinado para coincidir com a formação do novo tecido originado a partir da cultura de células. Isso pode levar à formação de um tecido totalmente natural, sem a presença de qualquer corpo estranho permanente (Mooney et al., 1996).

Diversas matrizes têm sido desenvolvidas e testadas para a semeadura de células pulpares, tais como: polifosfato de cálcio, esponja de colágeno, cerâmica à base de hidroxiapatita e fosfato tricálcio, fibras de titânio, esponja de ácido poliglicólico, esponja de ácido poli-L-lático (PLLA), entre outras (Mooney et al., 1996; Nör et al., 2001; Wang et al., 2006; Zhang et al., 2006).

Apesar dos avanços nesse campo, a engenharia de tecido ainda enfrenta limitações importantes. Para a sobrevivência e proliferação celulares em tecidos originados a partir da engenharia tecidual e implantados *in vivo* é necessário um suprimento adequado de nutrientes e oxigênio (Brey et al., 2005; Hoeben et al., 2004; Wenger et al., 2005).

Sabe-se que tecidos implantados com um volume maior do que 2 a 3 mm³ não permitem o recebimento de nutrientes, trocas gasosas e eliminação de toxinas, já que todos esses mecanismos são limitados pela distância de difusão (Melero-Martin et al., 2007). Além disso, a difusão de oxigênio através dos tecidos, por exemplo, está limitada a uma distância de 100 a 200 µm. Portanto, o desenvolvimento de um sistema vascular é imprescindível para garantir que todas as células estejam dentro dessa distância (Hoeben et al., 2004) e recebam todos os nutrientes e oxigênio de que necessitam.

Neste contexto, cada vez mais estudos para o desenvolvimento de *scaffolds* ideais têm sido realizados. Atualmente, sabe-se que os sinais morfogenéticos indispensáveis para a regeneração tecidual são provenientes, principalmente, de proteínas de meia-vida curta. Assim, o desenvolvimento de uma estratégia que possibilite uma liberação mais controlada dessas proteínas é essencial, uma vez que o objetivo é maximizar os seus efeitos por determinados períodos de tempo. As proteínas morfogenéticas podem ser incorporadas em ambos os tipos de *scaffolds*, através de copolímeros como o poli-L-

lático-glicólico ácido, ou através da injeção de espumas por gás (Sheridan et al., 2000; Golub et al., 2010). Ainda, elas também podem ser misturadas a *scaffolds* injetáveis, como colágeno ou o hidrogel auto-polimerizável Puramatrix (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), mas nestes casos, parece ser muito difícil controlar e diminuir a taxa de degradação das proteínas. Na tentativa de resolver esse problema, tem sido sugerido que polímeros naturais derivados da alga marrom (i.e alginatos), que são biocompatíveis e apresentam baixa imunogenicidade, sejam usados em combinação aos *scaffolds* injetáveis, servindo assim como um mecanismo de liberação lenta de sinais morfogenéticos (Cavalcanti et al., 2012).

Para superar os problemas relacionados à vascularização do novo tecido, algumas estratégias têm sido propostas. O uso de matrizes poliméricas biodegradáveis em camundongos imunodeprimidos tornou possível implantar células endoteliais humanas no hospedeiro roedor para estudar o desenvolvimento de capilares. Células endoteliais de microvasos da derme de humanos (HDMEC), implantadas em camundongos por meio de esponjas de PLLA, organizam-se e se diferenciam em capilares que se anastomosam com o sistema vascular do camundongo e se tornam microvasos humanos funcionais contendo células sanguíneas do camundongo (Nör et al., 1999; Nör et al., 2000). Assim, os capilares no implante são delimitados por células endoteliais humanas e revestidos por células musculares lisas de camundongo, expressam marcadores específicos da angiogênese e transportam células sanguíneas do roedor (Nör et al., 2001). O desenvolvimento desse modelo de angiongênese humana em camundongos imunodeprimidos pode, portanto, ser usado para examinar condições fisiológicas e patológicas da formação de novos capilares sanguíneos (Nör et al., 2001).

Especialmente falando sobre bioengenharia da polpa dental, o padrão biológico para a liberação controlada desses fatores morfogenéticos tem sido buscado na observação dos eventos que ocorrem no microambiente durante o desenvolvimento dentário (Smith, Lesot, 2001; Keller et al., 2012). Pesquisadores tem procurado entender com mais clareza esses eventos, na tentativa de desenvolver e criar condições ideais para migração guiada das células-tronco, objetivando regeneração dos tecidos dentais. Muitos estudos já identificaram sinais morfogenéticos específicos que participam do desenvolvimento

dentário e que podem potencialmente ser utilizados na terapia de regeneração dental (Thesleff, Sharpe, 1997; Chai, Slavkin, 2003; Sharpe, Young, 2005; Nait et al., 2011).

1.3- Sinalização Celular

Um dos maiores desafios das terapias de engenharia tecidual atuais incluem o controle espacial e temporal da liberação de fatores de crescimento, na tentativa de manter uma resposta de neovascularização persistente e estimulando a formação de fenótipos de vasos para função tecidual adequada (Brey et al., 2005). O sucesso dessas terapias, portanto, irá requerer mais do que apenas um número maior de vasos sanguíneos; maior fluxo sanguíneo, níveis de oxigênio normais e fenótipos vasculares adequados devem ser obtidos nos novos tecidos (Brey et al., 2005).

Particularmente, um dos maiores desafios da engenharia da polpa dental, é a geração de uma rede vascular funcional, considerando-se as restrições anatômicas impostas pelo fato de que toda a vascularização deste tecido é feita através do forame apical. Sendo assim, mais pesquisas relacionadas a indução da vasculogênese se fazem necessárias para no campo da engenharia tecidual da polpa. Claramente, o uso de uma única fonte de células-tronco que se diferencia em vasos sanguíneos e um tecido pulpar funcional é muito atrativo do ponto de vista da pesquisa translacional.

1.3.1 Angiogênese e vasculogênese: a formação dos vasos sanguíneos

A formação de vasos sanguíneos está diretamente relacionada com a formação de células sanguíneas. Na verdade, as células e vasos sanguíneos compartilham um precursor comum, o hemangioblasto. Os hemangioblastos são derivados a partir de células mesodérmicas que são expostas a concentrações relativamente altas de proteínas ósseas no início do desenvolvimento. Eles dão origem ao angioblasto, que é o precursor das células endoteliais e das células-tronco pluripotentes hematopoiéticas, que geram as células sanguíneas e os linfócitos (Risau, Flamme, 1995; Gilbert, 2000).

Os vasos sanguíneos são formados por dois processos: Vasculogênese e Angiogênese. Durante a vasculogênese, os vasos sanguíneos são criados a partir da placa lateral do mesoderma. A vasculogênese inicia apenas quando o embrião atinge um tamanho no qual

a difusão simples não é mais suficiente para a nutrição. Então, durante a terceira semana de desenvolvimento, o embrião é transformado de um organismo avascular para um organismo em que praticamente todos os tecidos estão povoados por vasos sanguíneos (Polverini, 1995).

Na primeira fase da vasculogênese, grupos de células mesodérmicas são direcionadas a tornarem-se hemangioblastos (Shalaby et al., 1997). Essas células se posicionam em agregados chamados ilhotas sanguíneas. As células mais internas dessas ilhotas tornam-se células tronco hematopoiéticas (as precursoras de todas as células do sangue), enquanto que as células externas se tornam angioblastos, os precursores dos vasos sanguíneos. Na segunda fase da vasculogênese, os angioblastos se multiplicam e se diferenciam em células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos. Na terceira fase, as células endoteliais formam tubos e se conectam para formar o plexo capilar primário (Polverini, 1995; Risau, Flamme, 1995; Gilbert, 2000; Ferrara et al., 2003).

Três fatores de crescimento parecem estar mais intimamente relacionados com o início da vasculogênese. Um deles, o FGF-2, ou fator de crescimento fibroblástico básico, é necessário para a geração de hemangioblastos a partir do mesoderma (Flamme, Risau, 1992).

A segunda proteína envolvida na vasculogênese é o VEGF. Dentre suas diversas funções, ele parece permitir a diferenciação do angioblasto e sua proliferação para formar tubos endoteliais. É considerado o mais importante regulador da vasculogênese e angiogênese, tanto em condições normais quanto em patológicas (Carmeliet, 1997; Ferrara, 2009). O VEGF é secretado pelas células mesenquimais próximas às ilhotas sanguíneas (Millauer et al., 1993; Ferrara et al., 2003). Importante estudo demonstrou que o VEGF, quando semeado em matrizes colágenas tridimensionais, foi capaz de formar estruturas capilares (Nör et al., 1999). Ainda, estudos *in vivo* mostraram que ele parece aumentar a permeabilidade vascular, potencializando respostas pró-angiogênicas (Ferrara, 1999). Ademais, tem importante papel na regulação da angiogênese devido ao aumento da sobrevivência das células endoteliais (Ferrara et al., 2003).

Uma terceira proteína, a Angiopietina-1 (Ang-1) media as interações entre as células

endoteliais e os pericitos (células semelhantes a células musculares que recobrem as células endoteliais). Mutações tanto na angiopoietina quanto no seu receptor, levam à má formação de vasos sanguíneos devido a deficiências nas células que os recobrem (Gilbert, 2000).

Após a fase inicial da vasculogênese, a rede capilar primária é remodelada, e esse processo é o que chamamos de angiogênese. Angiogênese é, portanto, o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente. Enquanto que a vasculogênese é criticamente importante durante os estágios iniciais do desenvolvimento embriônico, a angiogênese permite uma remodelação da rede vascular nos estágios mais tardios do desenvolvimento embrionário, e participa ativamente nas respostas fisiológicas pós-natais (i.e reparo tecidual).

No contexto da polpa dental, sabe-se que tratamentos pulpares conservadores, como capeamento pulpar direto, iniciam o processo de reparo através de uma resposta angiogênica altamente especializada e organizada. Durante o processo de reparo fisiológico, células presentes na área afetada liberam fatores quimiotáticos que contribuem para a organização de um processo antiinflamatório transiente. Isto ocorre porque células locais liberam fatores angiogênicos que rapidamente organizam uma resposta pró-angiogênica, que permite o influxo de células inflamatórias e o fornecimento de oxigênio e nutrientes requeridos para a manutenção de alta demanda metabólica da qual as células ativamente relacionadas com o reparo tecidual necessitam (Guo, 2010). Por fim, pode-se dizer que a angiogênese está sujeita a um controle complexo entre sinais estimulatórios (fatores pró-angiogênicos) e inibitórios (fatores anti-angiogênicos) para o crescimento dos vasos sanguíneos (Costa et al., 2004; Hoeben et al., 2004; Pandya et al., 2006; Grando Mattuella et al., 2007).

Células progenitoras endoteliais podem se diferenciar em células endoteliais maduras e substituir células endoteliais danificadas ou em senescência no intuito de reestabelecer a integridade do endotélio. Ainda, células endoteliais progenitoras podem contribuir para a vasculogênese pós-natal, uma vez que foi demonstrado que elas podem ser recrutadas para locais de neovascularização. A mobilização e o recrutamento dessas células endoteliais

derivadas da medula óssea para locais de vasculogênese envolve mecanismos similares àqueles associados com a angiogênese (fatores de crescimento, metaloproteínas, moléculas de adesão e citocinas). Contudo, permanece incerto em que medida e sob quais condições precisas as células endoteliais progenitoras contribuem para o crescimento vascular. Além de células endoteliais progenitoras derivadas da medula, células progenitoras multipotentes adultas, também derivadas da medula óssea, com potencial angioblástico, células-tronco de tecidos específicos, um subconjunto de células endoteliais circulantes e células endoteliais formadoras de colônia de alto potencial proliferativo, podem possuir um papel vasculogênico semelhante (Féletou, 2011).

1.3.2- Receptores para VEGF

A especificidade do sinal desencadeado por meio de receptores do VEGF é decorrente da ativação combinada de múltiplas vias de sinalização celular (Cébe-Suarez et al., 2006). Assim, a ativação preferencial das diferentes vias de sinalização pelo VEGF contribui para funções biológicas especializadas distintas nos diversos tipos celulares.

VEGF tem seus efeitos biológicos determinados pela ligação com dois receptores tirosina quinase de alta afinidade: VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (KDR em humanos ou Flk-1 em camundongos) (Matsushita et al., 2000; Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Hirashima et al., 2003; Costa et al., 2004; Ferrara, 2004; Tammela et al., 2005; Rahimi, 2006). VEGFR-3 (Flt-4) também é um membro da mesma família, mas não é um receptor para VEGF, ligando-se a VEGF-C e VEGF-D (Veikkola et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Rahimi, 2006).

VEGFR-1 codifica o domínio extracelular secretado como uma proteína solúvel, que é um potente antagonista do VEGF em função de sua ligação de alta afinidade, reduzindo a interação deste fator de crescimento com VEGFR-2 (Bicknell, Harris, 2004; Ferrara, 2004). Diversos estudos indicam que a função principal do VEGFR-1 durante a embriogênese é regular negativamente o sinal de VEGFR-2 por meio do seqüestro de VEGF (regular a acessibilidade do VEGF ao VEGFR-2 no desenvolvimento de vasos sanguíneos), ao invés da própria transdução do sinal de VEGFR-1 (Hirashima et al., 2003; Ferrara, 2004; Dutta et al., 2008). Apesar das funções altamente complexas e

aparentemente contraditórias, VEGFR-1 possui atividades importantes na hematopoiese e no recrutamento de células monucleares (Ferrara, 2004).

VEGFR-2 é o maior mediador dos efeitos mitogênicos, angiogênicos e de maior permeabilidade do VEGF (Matsushita et al., 2000; Ferrara et al., 2003; Ferrara, 2004; Hoeben et al., 2004; Rahimi, 2006). A ativação desse receptor durante a angiogênese induz à produção do fator de ativação plaquetário pelas células endoteliais, estimula a mitose e migração destas células e aumenta a permeabilidade vascular (Hoeben et al., 2004). Além disso, o VEGFR-2 está envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (Shalaby et al., 1995; Shalaby et al., 1997), quimiotaxia e sobrevivência celular (Matsushita et al., 2000; Ferrara et al., 2003). VEGFR-2 é expresso principalmente em células endoteliais em proliferação, sendo pobremente expresso em vasos sanguíneos maduros (Ferrara et al., 2003; Song et al., 2005).

A sinalização promovida pelo VEGF é complicada pelo fato de que os ligantes e seus receptores interagem com proteínas celulares adicionais, tais como as neuropilinas, proteoglicanas de heparan sulfato, integrinas e caderinas. Essas interações permitem a coordenação da intensidade do sinal, do tempo e da especificidade com vias extracelulares desencadeadas por ligantes solúveis e interações célula-célula e célula-substrato (Cébe-Suarez et al., 2006).

1.4 Via de sinalização do sistema receptor Ang-1/Tie2

Como comentado acima, durante a embriogênese, os vasos sanguíneos se formam a partir da vasculogênese e/ou angiogênese. Após o nascimento, a maioria dos vasos sanguíneos torna-se queiscente. Entretanto, a angiogênese ocorre fisiologicamente em alguns momentos e tecidos específicos, como nos ovários durante os ciclos ovarianos, e no útero durante a gravidez. Ainda, ela é promovida durante a cicatrização e reparo (Peters et al., 2004; Adams, Atilalo, 2007), por esse motivo, a angiogênese está relacionada com a patogenia de várias doenças, como câncer, artrite, retinopatia diabética e degeneração macular (Folkman et al., 2001; Peters et al., 2004).

Em vasos queiescentes, as células endoteliais que se alinham no endotélio dos vasos

(pericitos) mantêm contatos firmemente amarrados umas com as outras, por isso não sofrem proliferação ou migração (Dejana et al., 2004; Dejana et al., 2009). Por outro lado, durante a angiogênese, algumas dessas células rompem esses contatos intercelulares, e acabam migrando e proliferando, resultando no brotamento e ramificação de novos capilares a partir de vasos pré-existentes (Shibuya, Claesson-Welsh, 2006; Wallez et al., 2006; Adams and Alitalo, 2007; Lamalice et al., 2007).

O processo de as células endoteliais permanecerem quiescentes ou sofrerem angiogênese é determinado pelo equilíbrio entre sinais angiostáticos ou angiogênicos. Os sinais angiogênicos, na sua maioria, são induzidos por receptores endoteliais específicos tirosino quinases (RTKs) e seus ligantes, VEGF e seus receptores, e FGF e receptores (Yancopoulos et al., 2000; Jones et al., 2001; Shibuya, Claesson-Welsh, 2006; Adams and Alitalo, 2007; Kuijper et al., 2007). Já os sinais angiostáticos, que regulam negativamente a angiogênese, são liberados por outras moléculas, como a trombospontina, angiostatina e endostatina (Dawson et al., 1999; Rege et al., 2005; Sato, Sonoda, 2007; Tabruyn, Griffioen, 2007).

Os receptores Tie1 e Tie2 pertencem à família de receptores RTKs, e são expressos naturalmente por células endoteliais. A família de angiopoietinas consiste na Ang-1, Ang-2, Ang-3 e Ang-4. Dentre elas, Ang-1 e Ang-2 são as mais caracterizadas até o momento. Ang-1 se liga ao receptor Tie2 e estimula a sua atividade quinase, enquanto que a Ang-2 é conhecida por agir de forma contexto-dependente, sendo agonista ou antagonista de Tie2 (Augustin et al., 1999).

O que parece estar claro na literatura é que os processos de remodelação e maturação dos vasos dependem da via de sinalização das angiopoietinas e seus receptores Tie1 e Tie2. A Ang-1, uma proteína expressa em células mesenquimais localizadas nas vizinhanças dos vasos e também no miocárdio, desempenha papel importante na manutenção da integridade vascular e angiogênese. A Ang-2 se comporta como antagonista de Tie2, e compete com Ang-1. Além disso, a Ang-2 também é conhecida por ser um regulador tardio da função vascular, e tem efeito de desestabilizar os vasos, facilitando os processos de remodelamento.

Dessa forma, a via de sinalização Ang-1/Tie2 é conhecida por regular ambos os processos de queiscência vascular e angiogênese (Jones et al., 2001; Peters et al., 2004; Brindle et al., 2006; Eklund et al., 2006; Fiedler, Augustin, 2006; Augustin et al., 2009; Fukuhara et al., 2009), e inúmeros são os estudos que procuram entender mais sobre como esse sistema regula essas duas atividades tão distintas.

Estudo demonstrou que camundongos geneticamente modificados com a falta tanto de Ang-1 quanto de Tie2, apresentaram letalidade embrionária devido ao desenvolvimento vascular deficiente (Dumond et al., 1994; Sato et al., 1995; Suri et al., 1996); os vasos de ambos os tipos de animais mostraram menores números de células endoteliais e defeitos nas ligações entre as células endoteliais e os pericitos. Por esse motivo, acredita-se que o sistema de sinal Ang-1/Tie2 desempenha importante papel na maturação e estabilização da vasculatura embriogênica.

1.4.1 Papel da via Ang-1/Tie2 na queiscência vascular

O receptor Tie2 é expresso e fosforilado no endotélio da maioria dos tecidos adultos (Schlaeger et al., 1997; Wong et al., 1997). A proteína Ang-1 é produzida principalmente pelos pericitos e células da musculatura lisa dos vasos (Davis et al., 1996; Sugimachi et al., 2003), por esse motivo, acredita-se que a ativação de Tie2 pela Ang-1 secretada pelas células peri-endoteliais contribuem para a manutenção da queiscência vascular.

Uma das funções celulares mais importantes do sistema Ang-1/Tie2 é a sua capacidade de promover sobrevivência celular, o que é essencial para a manutenção da queiscência vascular. A Ang-1 estimula a fosforilação da atividade quinase da via de sinalização PI3K, através do recrutamento da sua subunidade regulatória, o p85, que, subsequentemente leva a ativação de outra via de sinalização: a AKT, também conhecida por ser uma das principais vias de sobrevivência celular (Kontos et al., 1998; Jones et al., 1999; Kim et al., 2000b; Papapetropoulos et al., 2000). A ativação da via AKT induzida por Ang-1/Tie2 resulta na ativação e fosforilação de um série de genes, como o Foxo1 (que é conhecido por regular positivamente a desestabilização e remodelamento vascular), bem como a indução de apoptose das células endoteliais (Daly et al., 2004). Dessa forma, a inibição do gene Foxo1 pela Ang-1 pode contribuir para a sobrevivência

celular endotelial e estabilidade vascular. Ademais, sabe-se que a Ang-1 potencializa a função de barreira endotelial, através do fortalecimento das ligações inter-celulares. Estudo demonstrou que a Ang-1 potencializa a força de ligação inter-celular regulada pela VE-Caderina, levando a diminuição da permeabilidade em células em cultura de monocamada (Gamble et al., 2000).

Ainda, Ang-1/Tie2 parecem exercer importantes atividades anti-inflamatórias. A Ang-1 atenua a ligação de leucócitos induzida pelo VEGF às células endoteliais através da inibição de moléculas de adesão, como a molécula de adesão intercelular -1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) (Kim et al., 2000). Além disso, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a expressão induzida de VEGF também é reduzida pela expressão de Ang-1 em células derivadas do endotélio vascular do cordão umbilical humano (HUVEC) (Kim et al., 2002). Kim et al. (2002) sugerem que os efeitos anti-inflamatórios da Ang-1 seriam mediados pela via PI3K/AKT.

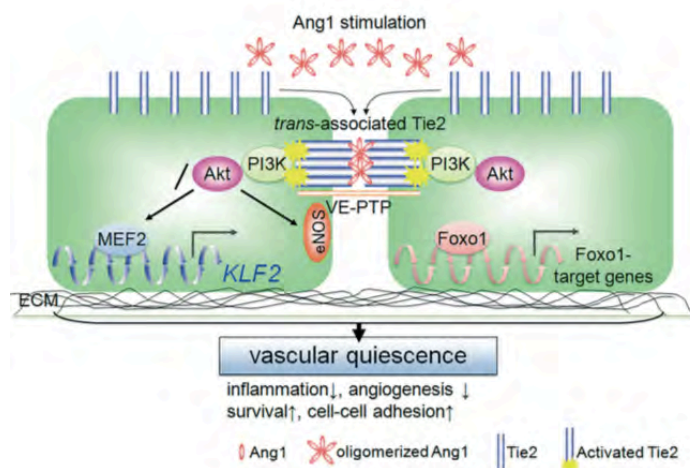


Fig3: Esquema do sistema Ang-1/Tie2 envolvido na manutenção da queiscência vascular (Fukuhara et al., 2010).

1.4.2 Papel de Ang-1/Tie2 na angiogênese

Além da manutenção da queiscência vascular, a via Ang-1/Tie2 está envolvida na angiogênese fisiológica e patológica da vasculatura adulta. O Tie2 é fortemente expresso

no endotélio de muitos tecidos adultos que sofrem angiogênese, como os ovários e o útero, e na regulação positiva da formação de novos vasos sanguíneos durante os processos de cicatrização e reparo (Wong et al., 1997; Peters et al., 2004). Além disso, a expressão de Tie2 é aumentada no endotélio da vasculatura de tumores, sugerindo o papel de Tie2 na angiogênese tumoral (Peters et al., 2004).

Alguns estudos reportam um receptor solúvel de Tie2, que é capaz de bloquear a ativação de Tie2 pela Ang-1, reduziu o crescimento tumoral e metástase através da inibição da angiogênese tumoral *in vivo* (Lin et al., 1997, 1998). Outro estudo demonstrou que a angiogênese induzida por VEGF é potencializada pela Ang-1 *in vivo* (Asahara et al., 1998). Entretanto, Nambu et al. (2004, 2005) demonstraram que o aumento da expressão de Ang-1 na retina de camundongos suprimiu significativamente a isquemia e a neovascularização renal induzida pelo VEGF. Tais resultados sugerem que Ang-1/Tie2 desempenham funções angiostáticas e angiogênicas, de uma forma contexto-dependente.

Sabe-se que a angiogênese requer proliferação e migração de células endoteliais vasculares. Embora Ang-1 induza a ativação da via quinase extracelular ERK, que é um regulador chave de proliferação celular (Harfouche et al., 2003; Brindle et al., 2006), o efeito mitogênico de Ang-1/Tie2 ainda é controverso (Kanda et al., 2005; Brindle et al., 2006). Alguns estudos sugerem que a ativação da via Ang-1/Tie2 possivelmente promove a migração celular endotelial (Witzenbichler et al., 1998; Fukijawa et al., 1999; Cascone et al., 2003; Chen et al., 2004), e a ativação da via PI3K pelo sistema Ang-1/Tie2 parece estar envolvida não somente com a sobrevivência celular, mas também com a mobilidade celular. Sendo assim, possivelmente, a migração de células endoteliais induzida por Ang-1 é mediada pela ativação dependente da via PI3K (Kim et al., 2000; Cascone et al., 2003). Ainda, outros estudos afirmam que a migração celular induzida por Ang-1 é prevenida pela inibição da via ERK (Fukuhara et al., 2008).

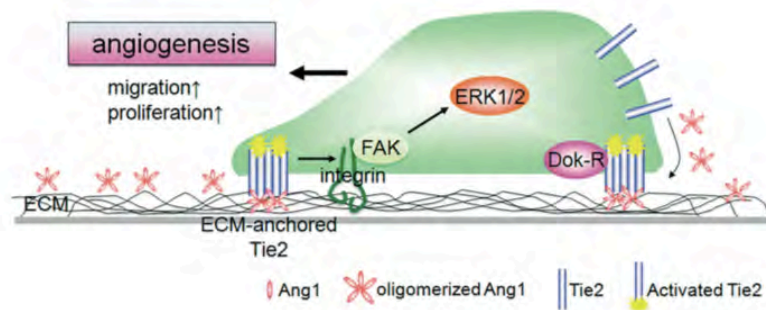


Fig4: Esquema do sistema Ang-1/Tie2 envolvido na angiogênese (Fukuhara et al., 2010).

1.4.3 Distinta via de sinalização induzida pela molécula Tie2 trans-associada e ligação da molécula Tie2 com a matriz extra-celular (ECM)

A ligação inter-celular endotelial é essencial para a manutenção da quiescência vascular. Entretanto, para que as células endoteliais sofram angiogênese, é necessário que estes contatos sejam enfraquecidos ou rompidos completamente. Recentemente, um grupo de pesquisadores demonstrou que a ativação de Tie2 pela Ang-1 forma complexos de sinalização distintos nos contatos inter-celulares e também no contato entre a célula e a matriz extracelular (ECM), na presença ou falta de ligação inter-celular endotelial, respectivamente (Fukuhara et al., 2008; Saharinen et al., 2008). Foi demonstrado que em cultura de células endoteliais, quando confluentes, o Tie2 é recrutado para os contatos inter-celulares em resposta a estímulo da Ang-1. Nestes contatos celulares, a Ang-1 faz pontes de ligação com o Tie2 expresso nas células vizinhas, resultando na formação da molécula trans-associada Tie2. Em contraste, na falta de ligações inter-celulares, o Tie2 é ancorado na interface da ECM da célula, através da Ang-1 que está ligada a ECM.

Segundo Fukuhara et al. (2008), a transição entre o processo de ativação normal da via Ang-1/Tie2 e o processo distinto de ativação de Tie2 se dá da seguinte forma: a Ang-1 mantém a quiescência vascular através da molécula trans-associada Tie2, enquanto que o Tie2 ancorado na interface célula-ECM promove angiogênese através da Ang-1.

Alguns estudos sugerem hipóteses que buscam entender um pouco melhor esse processo de transição entre a ativação de uma via e outra. Acredita-se que a baixa na atividade

sinalizadora de Ang-1/Tie2 é dependente da presença ou ausência de ligações inter-celulares. Dessa forma, o rompimento das ligações inter-celulares das células endoteliais podem ativar a formação da ponte Tie2-ECM, e a subsequente indução da sinais angiogênicos. O VEGF não somente promove a angiogênese, mas também induz hipermeabilidade através da ruptura das ligações inter-celulares. Portanto, é possível que, quando as ligações inter-celulares são rompidas pelo VEGF, a Ang-1 induza a formação da ligação entre Tie2-ECM, e juntamente com o VEGF, acelere o processo angiogênico. Estudo comprovou que a angiogênese induzida por VEGF é potencializada pela ação da Ang-1 *in vivo* (Asahara et al., 1998). Entretanto, como Ang-1 também neutraliza a ruptura das ligações inter-celulares mediadas pelo VEGF, o efeito sinérgico ou neutralizador do VEGF e da Ang-1 é determinado pelo equilíbrio entre os níveis destas moléculas e o momento exato em que essas rupturas ocorrem.

É importante lembrar do papel da Ang-2 nesse processo de transição entre o Tie2 trans-associado e o Tie2 ancorado na ECM. Augustin et al. (2009) relataram que a Ang-2 é produzida pelas células endoteliais sob condições de hipóxia, o que acaba antagonizando a ativação de Tie2 induzida pela Ang-1, e por consequência causa instabilidade vascular. Nestes vasos instáveis, onde as células endoteliais perdem as ligações inter-celulares, a ativação do sistema Tie2-ECM é feita pela Ang-1, o que parece promover a angiogênese em conjunto com o VEGF produzido a partir da hipóxia tecidual.

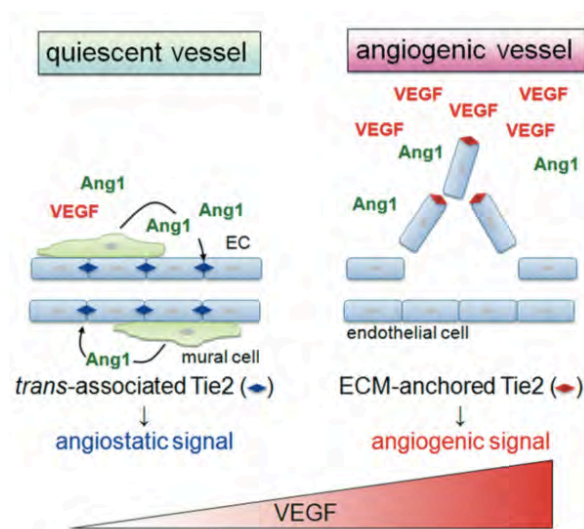


Fig4: Modelo esquemático que propõe o efeito dual do sistema Ang-1/Tie2 na queiscência vascular e angiogênese (Fukuhara et al., 2010).

1.5 Diferenciação de Células-Tronco em Células Endoteliais

Células-tronco podem ser estimuladas a se diferenciar em um determinado fenótipo por meio da manipulação das condições da cultura nas quais são mantidas. Nesse sentido, é possível controlar ou restringir as vias de diferenciação disponíveis e gerar seletivamente culturas enriquecidas com um fenótipo particular. Tais manipulações incluem o estímulo de células com citocinas específicas, fatores de crescimento, aminoácidos, outras proteínas e íons ativos e co-cultura com um tipo celular ou tecido específico (Polak, Bishop, 2006).

Levenberg et al. (2002) mostraram que células-tronco embrionárias humanas puderam se diferenciar em células endoteliais, capazes de formar estruturas tubulares em matrigel, e formaram microvasos quando implantadas em camundongos imunodeprimidos. Também utilizando células-tronco embrionárias, Sone et al. (2007) identificaram o processo de diferenciação destas em componentes vasculares e demonstraram que a expansão e transplante das células vasculares no estágio de diferenciação apropriado pode constituir uma nova estratégia para a medicina regeneradora vascular.

Diversos trabalhos demonstraram que VEGF é um indutor de diferenciação de células-tronco em células endoteliais, sozinho ou em associação com outros fatores de crescimento (Oswald et al., 2004; Kano et al., 2005; Wosnitza et al., 2007; Jazayeri et al., 2008).

Oswald et al. (2004) mostraram a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células com fenótipo (expressão de VEGFR-2, VEGFR-1 e fator de von Willebrand) e características funcionais (capacidade de formação de estruturas semelhantes a capilares) de células endoteliais com a utilização de VEGF na concentração de 50 ng/mL.

Recentemente, DPSC foram utilizadas para estudar diferenciação osteogênica *in vitro* e *in vivo*. Os pesquisadores observaram que 30% das células que apresentavam VEGFR-2 também expressavam antígenos específicos para células endoteliais (CD54, fator de von-

Willebrand, CD31 e enzima conversora de angiotensina), demonstrando a ocorrência de diferenciação sinérgica em osteoblastos e células endoteliais. *In vivo*, demonstraram inclusive a formação de tecido ósseo vascularizado (d'Aquino et al., 2007).

1.5.1- Marcadores de células endoteliais

Células endoteliais normalmente expressam CD31, fator de von Willebrand, VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2, VCAM-1 e caderina-VE (Jazayeri et al, 2008). Os níveis de expressão de marcadores de diferenciação endotelial em nível de RNAm e proteína diferem de acordo com o estágio de diferenciação em que a célula se encontra e as condições de cultura (Vittet et al., 1996; Kim et al., 2008).

VEGFR-2 é um dos marcadores de diferenciação mais precoces de células endoteliais e células sangüíneas (Eichmann et al., 1997; Iida et al., 2005; Kim et al., 2008).

CD31 (PECAM-1) é um membro da superfamília das imunoglobulinas que é expresso por células endoteliais e subclasse de células hematopoiéticas em organismos adultos (Watt et al., 1995; DeLisser et al., 1997; Kim et al., 2008). Portanto, estágios iniciais de diferenciação definidos pela expressão de VEGFR-2 e CD31 poderiam refletir o cometimento em direção à linhagem endotelial (Kim et al., 2008).

A expressão de caderina-VE foi observada nos estágios mais avançados de maturação vascular (Vittet et al., 1996). Nos estágios embrionários avançados, a expressão de caderina-VE é restrita à camada periférica das ilhas sangüíneas que dão origem a células endoteliais e ao endotélio da maioria dos tipos de vasos (Breier et al., 1996).

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Trabalhos prévios com a utilização de células-tronco pós-natais, tais como DSPC e SHED, apontaram para novas possibilidades em terapias celulares visando o desenvolvimento de novos tecidos. Somado a isso, o estabelecimento de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* adequados tem permitido avaliar tanto a formação e crescimento de vasos sanguíneos e a eficiência de moléculas ativas na promoção da angiogênese, bem como a expressão de marcadores de odontoblastos e a produção de tecido mineralizado semelhante à dentina.

Contudo, apesar dos significantes avanços nos modelos de estudo para diferenciação de células-tronco, particularmente de DSPCs, ainda parece faltar relatos na literatura de um estudo que mostre em detalhes cada etapa dos acontecimentos que ocorrem durante o processo de diferenciação dessas células, o que pode estar dificultando o progresso da pesquisa nessa área.

Esperamos que as abordagens utilizadas neste estudo possam possibilitar o desenvolvimento, num futuro não muito distante, de ferramentas moleculares e alternativas terapêuticas viáveis para a regeneração de tecidos danificados ou doentes.

PROPOSIÇÃO

Objetivo geral:

I. Avaliar a diferenciação endotelial das DPSCs e a caracterização do seu destino *in vivo*;

Objetivos específicos:

- a. Examinar o destino das DPSC-LacZ após o implante em camundongos imunodeprimidos.
- b. Estudar o efeito de Ang-1 + VEGF na diferenciação de DSPC em células endoteliais:
- c. Estudar o efeito de Ang-1 + VEGF na fosforilação de algumas vias de sinalização (Tie2, ERK, AKT e STAT3) em DSPC;

ARTIGO 1

(Em processo de submissão ao Journal of Dental Research)

Characterization of DSPC fate in immunodeficient mice

C. Cucco^{1,2}, Z. Zhang¹, G. Oliveira Silva^{1,3}, Min Oh¹, J.A. Poli de Figueiredo², J.E. Nör^{1,4,5}

¹Angiogenesis Research Laboratory, Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, 48109-1078, USA; ²Department of Endodontics, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Brazil; ³Department of Restorative Sciences, Julio Mesquita Filho University (UNESP), Brazil; ⁴Department of Otolaryngology, University of Michigan School of Medicine; ⁵Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering.

Abstract: 211 words

Manuscript: 2,112 words

Figures: 4 figures

Supplemental information:

References: 23 references

Running title: Endothelial differentiation of dental pulp stem cells

Keywords: Angiogenesis; Tissue engineering; Stemness; Dental pulp stem cells; Endodontics

Corresponding author:

Jacques E. Nör DDS, MS, PhD
Professor of Dentistry, Otolaryngology,
Biomedical Engineering
University of Michigan
1011 N. University Rm. 2309
Ann Arbor, MI, 48109-1078
United States
Telephone: (734) 936-9300
E-mail: jenor@umich.edu

ABSTRACT

Teeth exhibit limited repair in response to damage, and studies have shown that dental pulp stem cells (DPSCs) probably provide a source of cells to replace those damaged and to facilitate repair. Additionally, *in vivo* transplantation into immunocompromised mice demonstrated the ability of DPSCs to generate functional dental tissue in the form of dentine/pulp-like complexes. The purpose of this study was to characterize the endothelial fate of DPSCs *in vivo* and to start to understand the role of Tie2/Ang-1 signaling pathway on the regulation of the endothelial differentiation of DPSCs. Dental pulp stem cells seeded in tooth slice/scaffolds and transplanted into SCID mice showed a continuous crescent number of beta-galactosidase-positive odontoblastic and endothelial cells along the 7, 14, 21 and 28 days of the study. At 21 days beta-galactosidase-positive capillaries located close to murine blood vessels were detected, confirming our previous report (Cordeiro et al, 2008; Sakai et al, 2010). DPSCs exposed to Ang-1 differentiated into VEGFR2, CD31 and Tie2 positive cells *in vitro*. Exposure of VEGFR1-silenced DPSC to Ang-1 and VEGF induced the activation of STAT3, Erk and Akt, while VEGF alone inhibited the phosphorylation of STAT3. This is consistent with Akt and STAT3 role in the regulation of cell survival and cell-cell interaction of DPSC through Tie2/Ang-1 signaling pathway.

INTRODUCTION

Although the outcome of conventional root treatment is well known and described in mature permanent teeth, the same is not true for immature permanent teeth with incomplete root formation (Cvek, 1992). Because of its thin and fragile lateral walls, as well as technical challenges to conventional endodontic therapy (e.g. difficult apical seal) immature permanent teeth with pulp necrosis have shown poor long-term outcomes (Cvek, 1992). In recent years, advances in tissue engineering and stem cell biology have led to new strategies for the regeneration of damaged or lost tissues in the oral cavity. It has been proposed that the engineering of a new dental pulp can potentially result in the completion of lateral and vertical root formation in necrotic permanent teeth (Nör, 2006), which could have a positive impact on their long-term outcomes. More specifically, studies have shown that in vivo transplantation of dental pulp stem cells (DPSC) into immunocompromised mice demonstrated the ability of DPSC to generate functional dental tissues in the form of dentin/pulp-like complexes (Gronthos et al., 2000). Further characterization of those cells, demonstrated that they are capable of differentiating into other mesenchymal cell derivatives in vitro, such as adipocytes (Gronthos et al, 2002), osteoblasts and vascular endothelial cells (d'Aquino et al, 2007; Graziano et al, 2008; Konoyama et al, 2009; Yu et al, 2010). DPSCs were also capable of differentiating into functionally active neurons and implanted DPSCs induce endogenous axon guidance, suggesting their potential as cellular therapy for neural disorders (Arthur et al, 2008; Arthur et al, 2009; Yalvac et al, 2009). In addition, it is known that successful tissue engineering requires the quick and effective induction of angiogenesis, so that the vasculature ensures the efficient delivery of nutrients and oxygen to the engineered constructs. To date, during embryogenesis, vascular blood vessels form through both vasculogenesis and angiogenesis. After birth, most blood vessels in the body become quiescent. However, angiogenesis occurs in some specific tissues, and is promoted during wound healing and repair. Whether endothelial cells remain quiescent or undergo angiogenesis is determined by the balance between angiostatic and angiogenic signals. Interestingly, angiopoietin (Ang) 1 and receptor tyrosine-kinase (Tie) 2 signal is known to regulate both vascular quiescence and angiogenesis. Particularly, a better

understanding and characterization of the differentiation potential and fate of the dental pulp stem cells is crucial for the field of regenerative endodontics, hence it is not clear in vivo whether the local stem cell population are capable of forming functional vascular structures. Here, we used a combination of in vitro and in vivo approaches to evaluate whether DPSCs are capable of differentiating into functional endothelial cells and the role of the angiopoietin (Ang) 1 and receptor tyrosine-kinase (Tie) 2 signaling on the regulation of both vascular quiescence and angiogenesis.

MATERIALS & METHODS

Cell Culture: Human Dental Pulp Stem Cells (DPSC) were isolated from adult teeth and fully characterized, as described previously (Gronthos et al, 2000). DPSC were cultured in alpha-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 15% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen) at 37°C and 5% CO₂. We induced endothelial differentiation by culturing DPSC cells with alpha-MEM medium supplemented with 50 ng/mL rhVEGF₁₆₅ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The cell culture medium was changed every 2 days in all experiments included here. We assessed endothelial differentiation of DPSC *in vitro* by determining the expression of some endothelial markers (VEGFR1, VEGFR2, CD31, VE-cadherin, Tie-2) by Western Blots and RT-PCR. Human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) were used as positive control. To quantify the soluble form of Ang-1 and Ang-2 proteins and its possible relation with the expression of endothelial cell markers, we used specific ELISA kits (Quantikine; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). For that, we cultured DPSC in a 6-well plate with alpha-MEM medium supplemented with rhVEGF₁₆₅ or rhWnt1 or both for 24 hours and 6 days.

Western Blots: Proteins (20-50ug) were subjected to 9% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Membranes were incubated at 4°C overnight with primary antibodies. We used Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) to develop the membranes.

Semi-quantitative RT-PCR: Total RNA was extracted with TRIzol reagent (Invitrogen), and PCR reactions were performed with Superscript[™] III Platinum Two-Step QRT-PCR kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA extracted from Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC) was used as positive control. Primers were the following: human Tie-2 (sense 5'-tacacctgcctcatgctcag-3' and anti-sense 5'-gcagagacatccttgaagc-3'; size = 467 bp), Human CD31 (sense 5'-gagtctgctgacccttctg and anti-sense 5'-acagttgacct- cagatcc-3'; size = 416 bp), Human VE-Cadherin (sense 5'-cctggtataacctgactgtg - 3' and anti-sense 5' - tgtgatggtgaggatgcaga - 3'), Human VEGFR1 (sense 5' - cct cactgccactctaattgtc - 3' and

anti-sense 5' - acagtttcaggtcctctccttc - 3'; size = 475 bp), Human VEGFR2 (sense 5-gctgtctcagtgacaaacct-3' and anti-sense 5-ctccacatggattggcagagg-3; size = 373 bp), and Human GAPDH (sense 5-gacccttcattgacctcaact-3' and anti-sense 5-accacettctgatgt catc-3; size = 683 bp).

Lentiviral-mediated gene silencing: Gene silencing was performed with lentiviral vectors encoding shRNA constructs. Briefly, 293T cells were transiently co-transfected with lentivirus packaging vector psPAX2, PMD2 and shRNA-C (control) and shRNA-VEGFR1 (Vector Core, University of Michigan) with calcium phosphate. We used supernatants containing the lentiviruses to infect DSPC overnight, and then cells were selected with 1 μ g/mL puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for at least 1 week. Gene silencing was accessed by western blot.

Tooth slice/scaffold assay: To track and evaluate the endothelial fate of the DPSC *in vivo* we seeded DPSCs stably transduced with LacZ in a human tooth slice/scaffold, as described previously (Cordeiro et al, 2008). Briefly, 1.3 mm-thick tooth slices were obtained from extracted non-carious human third molars collected in the Department of Oral Surgery at the University of Michigan with the donor's informed consent and Institutional Review Board approval. The pulp tissue was removed and the pulp chamber of the tooth slice was filled with sieved NaCl, and a poli-L-lactic-acid solution (PLLA) (Boehringer Ingelheim, Germany)/chloroform solution was dropped, soaking the salt. After 24 hrs, tooth slice/scaffolds were washed with Milli-Q water to remove the salt, and scaffolds were re-hydrated/disinfected with decreasing concentrations of ethanol (100%-70%). Specimens were treated with 10% EDTA for 1 min. Cells (6×10^5) were seeded in a 1:1 mix of culture medium and Matrigel, into each tooth slice/scaffold that was transplanted subcutaneously into the dorsum of severe combined immunodeficient mice (CB.17 SCID; Charles River, Wilmington, MA, USA).

Histological analysis: After 7, 14, 21 and 28 days, specimens were retrieved and fixed in a cold fixative solution (prepared with PBS, 25% gluteraldehyde and 37% formalin) for 1 hour at 4°C. After that, the specimens were stained for LacZ using a β Gal Staining Kit

(Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) at 4°C overnight. The next day specimens were fixed again for 6-8 hours in the fixative solution at 4°C and demineralized with Decalcifier II (Surgipath; Richmond, IL, USA) for 24 hrs at room temperature. Hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry with mouse anti-human Factor VIII (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) was used to evaluate the morphology. Isotype-matched non-specific IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was used as a control for immunohistochemistry. For the cell counting of the beta-galactosidase cells we used an optical microscope at 400x, at 4 random fields located in the center or in the periphery of the tooth/slice scaffold.

RESULTS

Time-course of the differentiation of DPSC

To describe the development and characterization of cell fate of DPSC *in vivo*, we transplanted tooth slice/scaffolds seeded with DPSC stably transduced with LacZ (6×10^5) into the dorsum of immunodeficient mice and retrieved them after 7, 14, 21 and 28 days. At 7 days after implantation, we observed that the DPSC-LacZ cells were spread throughout the scaffold, but we could not see tubular structures suggesting the formation of blood vessels, further immunostaining with human Factor VIII was not detected. Fourteen days after, the majority of beta-galactosidase-positive cells evolve and formed capillaries located close to murine blood vessels, confirming our previous report (Cordeiro et al, 2008; Sakai et al, 2010). Some of these cells formed empty tubular structures, while some contained cellular elements in their lumen, suggesting that these capillaries connected through anastomosis with the host vasculature. Interestingly, 21 days after the implants retrieval, histologic analyses showed that these microvessels were populated by transplanted human cells, not only the host cells at this point. The microvessels present in the surrounding tissue were negative for the immunostaining used in this study. Further evidence for the differentiation of DPSC into endothelial cells was provided by observation that tissues developed within tooth slice/scaffolds seeded with DPSC expressed vascular growth factor receptor-1 and receptor-2 (VEGFR1, VEGFR2), CD31 and vascular endothelial cadherin (VE-Cadherin), all shown to be expressed primarily by endothelial cells (Albelda et al, 1991).

We assessed the *in vivo* results through some mechanistic assays. We cultured DPSC in the presence of VEGF and recombinant human protein Ang1 and evaluated the expression of a series of markers for endothelial differentiation. Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) expression was observed when DPSC were cultured in the tooth/slice scaffolds in the presence of VEGF, especially after 21 days, but not in the control groups. Interestingly, after 28 days in culture, DPSC cultured in the tooth slice/scaffold in the presence of VEGF expressed all markers of endothelial differentiation evaluated here.

Ang-1/Tie2 Signaling Pathway

In order to evaluate if cultured DPSC cells were able to express Tie2, we administrated Ang-1 to induce the phosphorylation of this receptor. We could see that after 1 day of treatment with rhAng-1 only, DPSC cells expressed Tie2, which was not seen in the group treated with the combination of VEGF and Ang-1.

DISCUSSION

The ability of the tooth to provide limited repair by production of new dentine by new odontoblast-like cells, reported by Smith *et al.* and Smith and Lesot (1995; 2001), suggests that the dental pulp may contain mesenchymal stem cells. The isolation and characterization of mesenchymal stem cells from an accessible source such as the teeth has opened up a new field of research with the possibility of finding a source of autologous or allogeneic mesenchymal stem cells that can be used in the treatment of many clinical conditions in dentistry and medicine.

Our group has previously demonstrated that stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) differentiate into functional human blood vessels that anastomize with the host vasculature (Cordeiro et al, 2008; Sakai et al, 2010; Bento et al, 2013). Casagrande et al. (2010) demonstrated that SHED can differentiate into functional odontoblasts that secrete mineralized dentin matrices. Beta-galactosidase positive DPSC cells were observed in the chamber of tooth slice/scaffolds 7 days after they were implanted in immunodeficient mice. At this time, cells were sparse, located primarily in the center of the engineered pulp tissue. Further, the cellular shape was not well defined. At 14 days in the tooth slice/scaffolds, a migration of DPSC beta-galactosidase positive cells was observed. The cells were located not only in the center, but were located also on the periphery of the tooth slice/scaffold. Additionally, at this time point, beta-galactosidase-positive capillaries located close to murine blood vessels were detected, confirming our previous report (Cordeiro et al, 2008; Sakai et al, 2010). Some of these cells formed empty tubular structures, while some contained cellular elements in their lumen. The transition between empty tubular structures to functional blood-carrying microvessels implies that the tubules lined with human cells can anastomose with the existing mouse vasculature.

Interestingly, 21 days after the implants retrieval, histologic analyses showed that these microvessels were populated by transplanted human cells, not only the host cells. The DPSC-LacZ positive blood vessels were found close to non-stained (host) blood vessels. This finding shows that DPSC are capable of differentiating into functional blood vessels that connect to the host vasculature, which is in accordance to previous data shown from

our lab (Bento et al, 2013). Also, we observed a higher number of cells at the periphery than before, showing very clearly the cellular alignment. This suggests that these cells have differentiated into odontoblasts. At 28 days, we observed a higher number of DPSC beta-galactosidase positive cells in the tooth slice/scaffold, suggesting the formation of a pulp like tissue. However, the proportion of microvessels expressing endothelial markers was smaller than the other time points. It can be explained, in part, by the fact that their expression levels seems to be reduced in more mature or quiescent blood vessels (Stromblad, Cheresch, 1996). Particularly, evaluating our histologic findings, the characteristic organization of the pulp tissue and odontoblastic layer (colunar shaped cells, polarized with the distal portion entering the dentinal tubules) was not seen in our specimens. However, even not presenting a colunar shape, a layer of beta-galactosidase positive cells lined up continuously in contact with the internal walls of the tooth/slice scaffold. To further characterize if the cells phenotype was changed, the expression of specific markers is required. Although we did not evaluate odontoblastic differentiation here, we believe that our hypothesis is not unfounded, since Sakai et al. (2010) demonstrated functional odontoblasts using the same model. The fact that the cells migrated towards the dentin, from 14 days on, and that the differentiation was more evident in the areas close to the dentin walls, supports the hypothesis that angiogenic factors sequestered in dentin matrix may be released during repair processes (Roberts-Clark, Smith, 2000).

To further characterize the endothelial differentiation, we demonstrated by RT-PCR, that at 28 days after transplantation of tooth slice/scaffold seeded with DPSC, a panel of endothelial cell markers was strongly expressed. Tie2 is a receptor tyrosine kinase expressed on vascular endothelial cells (EC's). Tie2 has dual roles in promoting angiogenesis and stabilizing blood vessels. Angiopoietin-1 (Ang1) is a ligand for receptor Tie2 and appears to be expressed mainly by perivascular and mural cells (Sundberg et al, 2002), functioning as a paracrine signal to promote vessel stabilization (Asahara et al, 1998; Hawighorst et al, 2002). Ang-2 antagonizes Ang-1 function by inducing loosening of the attachment between endothelial cells and pericytes (Maisonpierre et al, 1997). Because Ang-1 and Ang-2 both bind to Tie2 with equal affinity, increasing the ratio of

Ang-1:Ang-2 favors vascular stability. Here we observed that DPSC cultured in the presence of VEGF presented high levels of Ang-1 and Ang-2, in all experimental periods (Fig3). It is known that in the presence of VEGF, Ang-2 facilitates vessel sprouting (Asahara et al, 1998) and intussusception (the folding of slender tissue pillars or posts into the vessel lumen) (Patan et al, 1992). On the other hand, in the absence of VEGF, Ang-2 induces regression of blood vessels (Sato et al, 1995; Dumont et al, 1994).

VEGFR1 blockage inhibited STAT3 phosphorylation, while slightly induced ERK and Akt phosphorylation. Interestingly, when Ang-1 is added to VEGF in alpha-MEM medium, it promoted a slightly increase in Akt signaling, less than VEGF itself. Ang-1 and VEGF together made VEGFR1 basically irrelevant in STAT3 signaling, however, ERK pathway is only different when adding only VEGF or Ang-1.

Acknowledgments: This work was funded in part by grant DE021410 (JEN) and grant BEX 4905-13-0 from CAPES (CC). This paper is based on a thesis submitted to the graduate faculty, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, in partial fulfillment of the requirements for a Doctoral degree (CC).

REFERENCES

- Arthur, A. et al. (2008). Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 26, 1787–1795
- Arthur, A. et al. (2009). Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* S27, 2229–2237
- Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G. D., and Isner, J. M. (1998). Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* 83, 233–40.
- Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nör JE (2010). Dentin- derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 89:603-608.
- Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 34:962-969.
- Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha (1992). A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*, 8:45-55.
- d’Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. (2007). Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 14:1162-1171.
- Dumont, D.J. et al. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev* 8:1897–1909.
- Graziano, A. et al. (2008) Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 4:21–26
- Gronthos, S. et al. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:13625–13630
- Gronthos, S. et al. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent. Res.* 81:531–535.
- Hawighorst, T., Skobe, M., Streit, M., Hong, Y. K., Velasco, P., Brown, L. F., Riccardi, L., Lange-Asschenfeldt, B., and Detmar, M. (2002). Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *Am J Pathol* 160, 1381–92.
- Konoyama, N. et al. (2009) Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J. Oral*

Maxillofac. Surg. 67:501–506

Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., Daly, T. J., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1997).

Nör JE (2006). Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent* 31: 633-642.

Patan, S. (1998) TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc. Res.* **56**:1–21.

Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, *et al.* (2010). SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 89:791-796.

Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y. (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70–4.

Smith, A.J. et al. (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 39, 273–280

Smith, A.J. and Lesot, H. (2001) Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 12, 425–437

Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, H. F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest* **82**:387– 401.

Yalvac, M.E. et al. (2009). Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia. *Curr. Pharm. Des.* 15:3908– 3916.

Yu, J. et al. (2010). Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol.* 8, 32

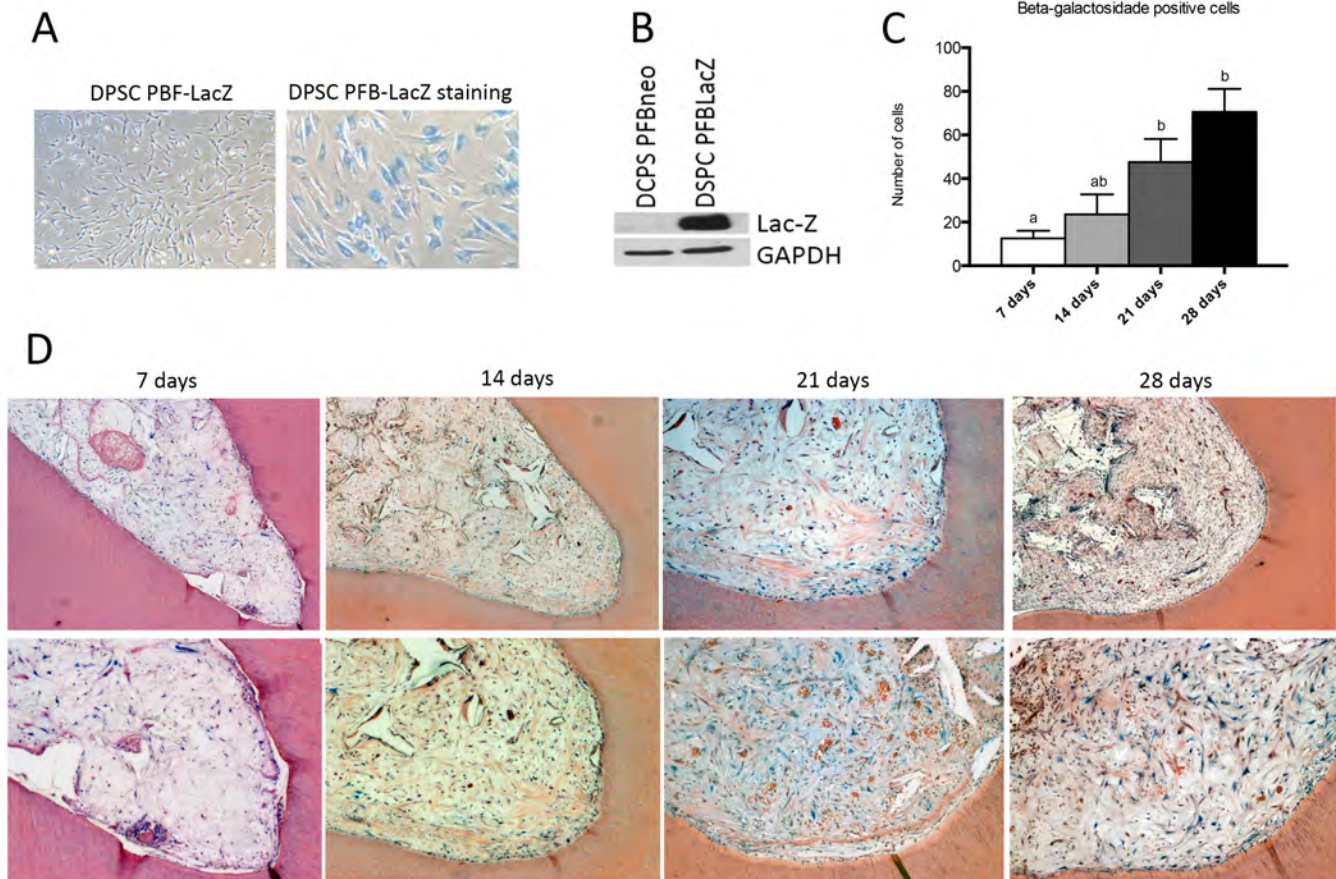


Fig1: Time-course of the differentiation of DPSC cells. **(A)** In vitro detection of beta-galactosidase produced by DSPC stably transduced with LacZ. **(B)** Western Blot to evaluate the effectiveness of LacZ transduced cells. **(C)** Number of beta-galactosidase positive cells in each time-point, located at the center and the periphery of the tooth slice/scaffold. Cells were counted using ImageJ at 400x. **(D)** Tooth slice/scaffolds seeded with DSPC stably transduced with LacZ transplanted into immunodeficient mice. After 7, 14, 21, and 28 days tooth slice/scaffolds were retrieved, fixed, stained for beta-galactosidase and analyzed by hematoxylin-eosin staining.

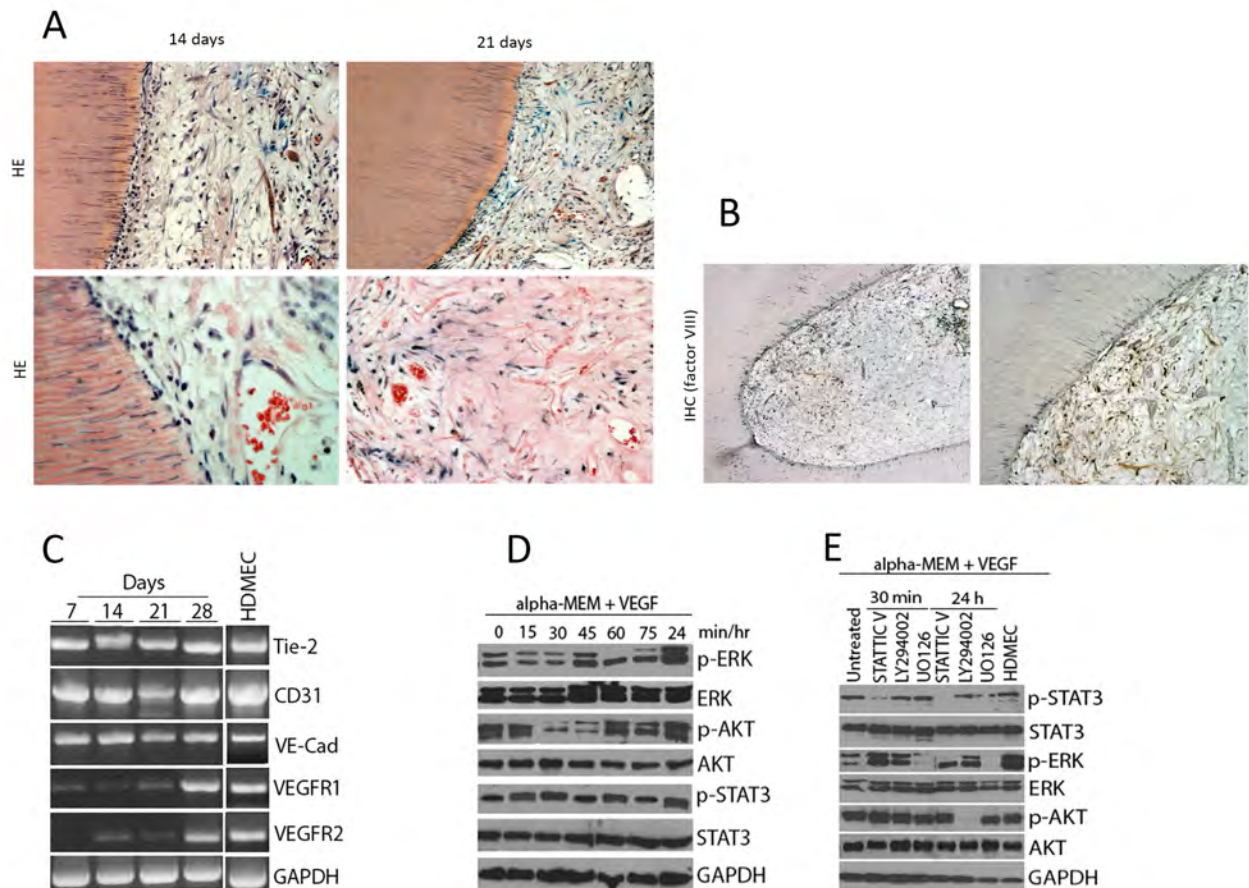


Fig2: DSPC differentiate into functional blood vessels. **(A)** Tooth slice/scaffolds seeded with DSPC stably transduced with LacZ transplanted into immunodeficient mice and retrieved after 7, 14, 21 and 28 days. At 14 days after transplantation, we could see DSPC next to the murine blood vessels (arrows), and at day 21 we can clearly see that beta-galactosidase positive DSPC differentiate into odontoblast-like and endothelial cells (arrows). Some beta-galactosidase positive tubules were empty, and others contained cellular elements in their lumen. **(B)** IHC for Factor VIII. **(C)** RT-PCR analysis of Tie2, CD31, VE-Cadherin, VEGFR1 and VEGFR2 mRNA expression on tissue retrieved from the pulp chamber of tooth slice/scaffold from the experimental groups 7, 14, 21 and 28 days after transplantation into immunodeficient mice.

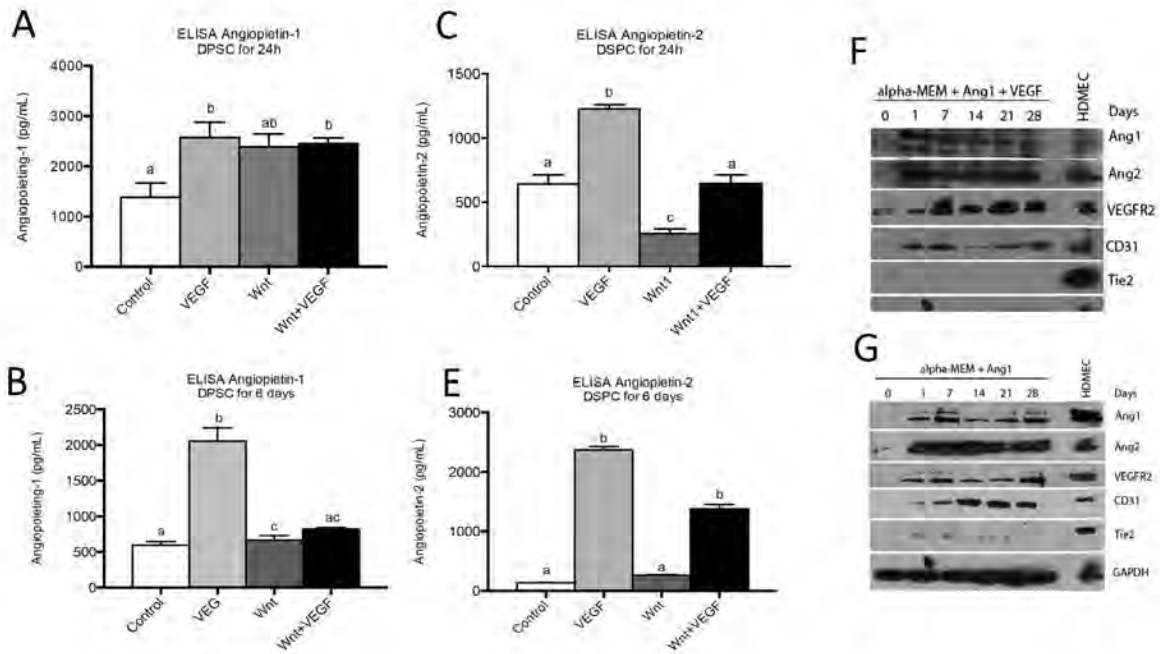


Fig3: **(A-E)** Endocrine release of proteins Ang-1 and Ang-2 in DPSC after treatment with 50 ug/mL rhVEGF₁₆₅, 50 ug/mL Wnt and the combination of both analyzed by specific Elisa assay. Concentrations of VEGF is increased in all experimental time points. **(F-G)** Protein expression of endothelial cell markers Ang-1, Ang-2, VEGFR2, CD31 and Tie2 upon culture of DPSC cells with alpha-MEM + 200 ug/mL rhAng-1 or 50 ug/mL rhVEGF₁₆₅ + 200 ug/mL rhAng-1 for 1-28 days.

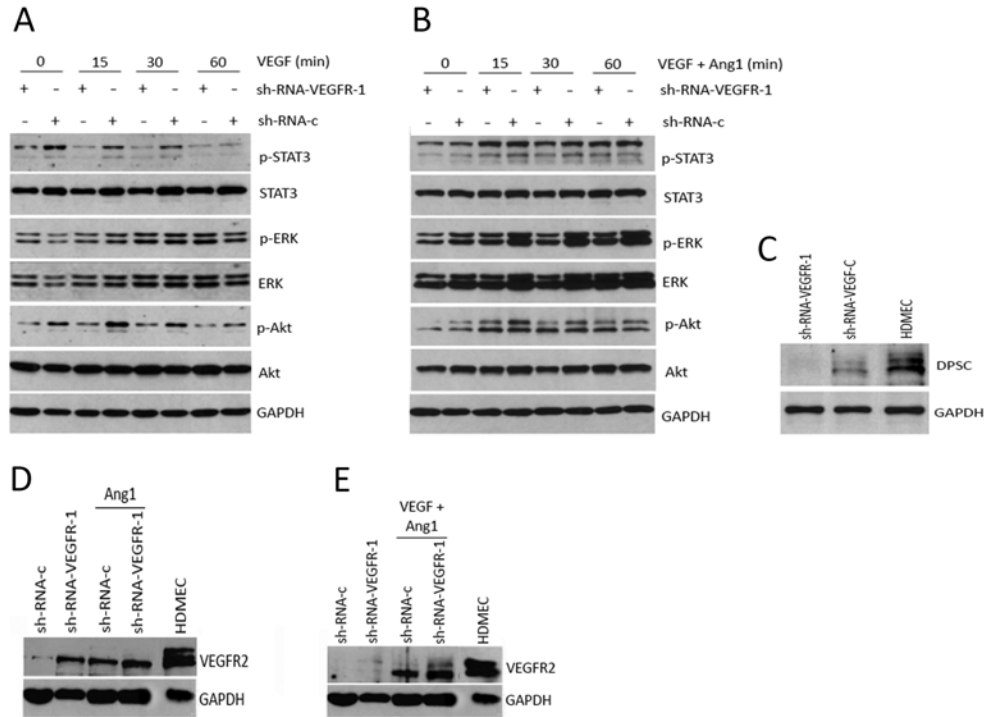
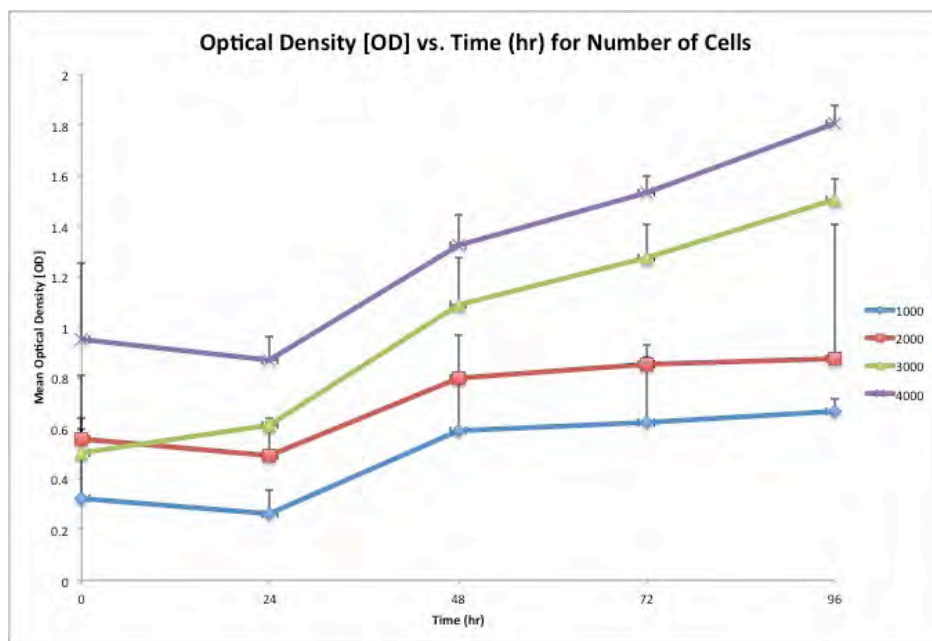


Fig4: Effect of Ang-1 and Ang-1 + VEGF on the regulation of the signaling pathways involved in DPSC differentiation. **(A-B)** Western blots for the evaluation of the the effect of treatment with 50 ug/mL rhVEGF₁₆₅ and 50 ug/mL rhVEGF₁₆₅ + 200 ug/mL rhAng-1 for 0-60 min on the phosphorylation of STAT3, ERK and Akt in DPSC stably transduced with shRNA-VEGFR1. **(C)** Western blot analyzes of effectiveness of VEGFR1 knockdown in DPSC stably transduced with lentivirus encoding shRNA-VEGFR1. **(D-E)** Effect of treatment with 50 ug/mL rhVEGF₁₆₅ + 200 ug/mL rhAng-1 or 200 ug/mL rhAng-1 alone in VEGFR1 silencing on endothelial cell differentiation of DPSC determined by VEGFR2 expression.

FIGURAS SUPLEMENTARES - MATERIAIS E MÉTODOS

FIGURA 1

SRB/DPSC



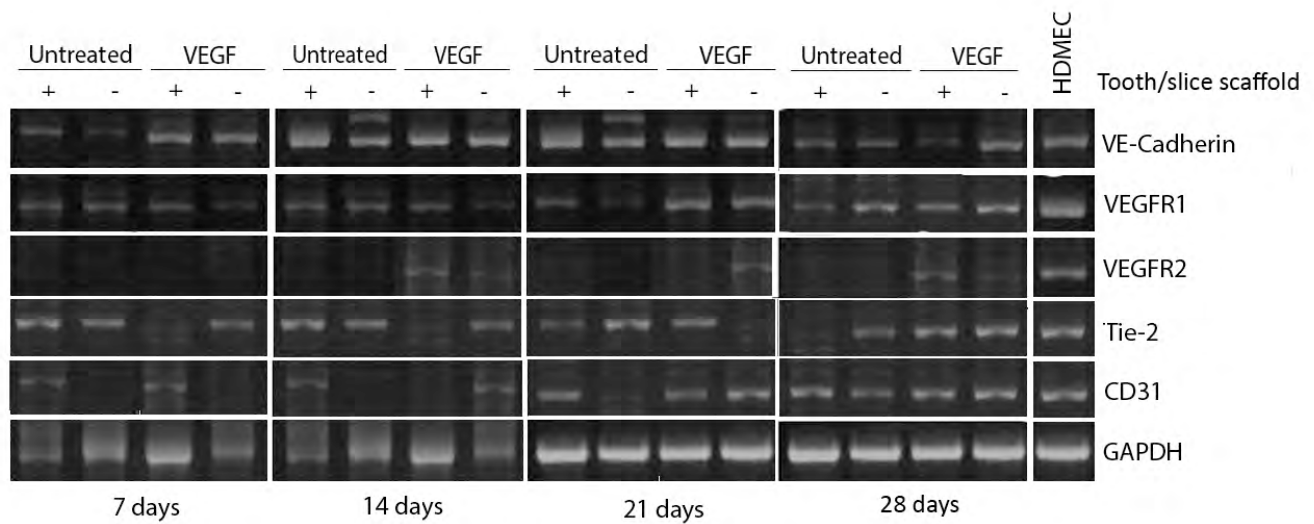


Fig2: VEGF estimula a diferenciação de DPSC em células endoteliais quando cultivadas em fatias de dente + matriz condutiva. DPSC foram cultivadas em fatias de dente ou em meio de cultura, estimuladas com VEGF (50 ng/mL) ou mantidas sem tratamento (controle = untreated) e coletadas após 7, 14, 21 ou 28 dias para a avaliação de marcadores de células endoteliais (VE-Cadherin: 528 pb; VEGFR-1: 374 pb; VEGFR-2: 373 pb; CD31: 1025 pb; Tie2: 467 pb) e de GAPDH (683 pb) por meio de RT-PCR. HDMEC foram utilizadas como controle positivo para os marcadores. Os resultados são representantes de experimentos independentes.

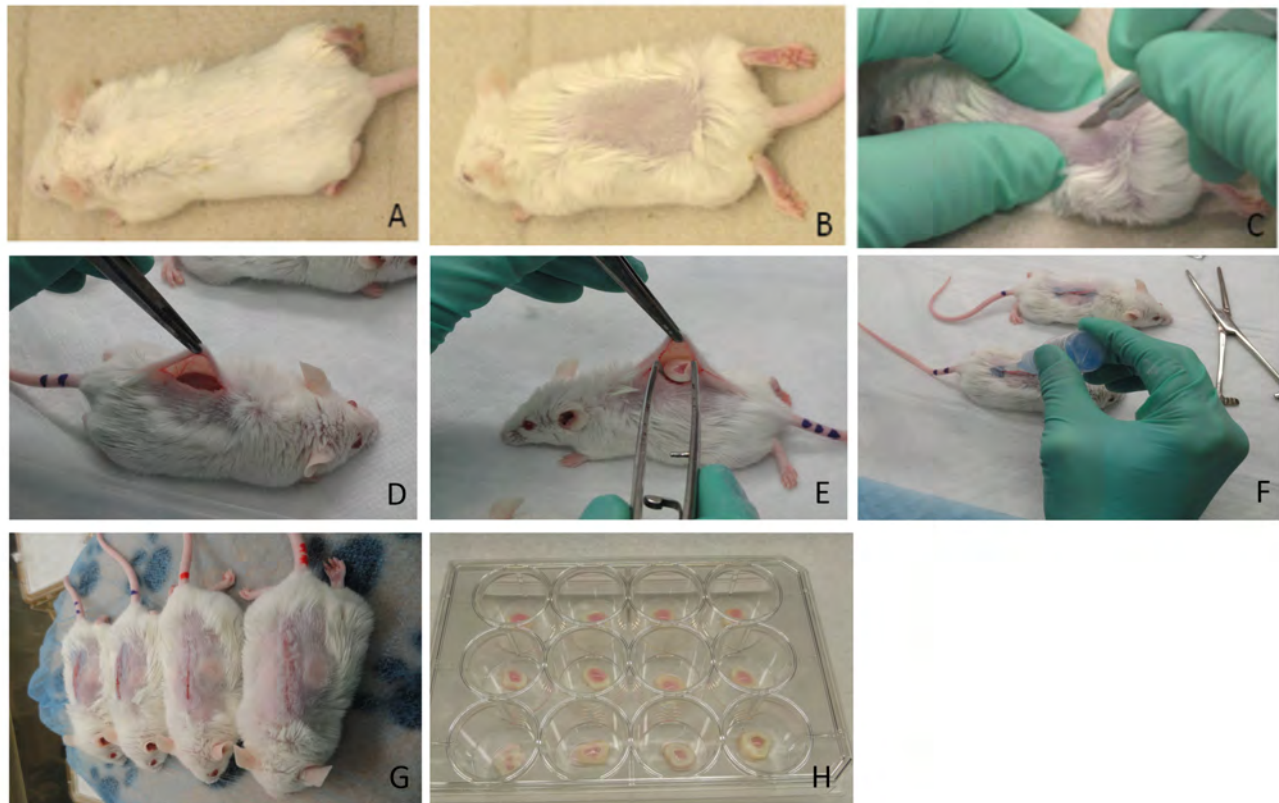


Fig3: Sequência operatória de implantação das amostras na região dorsal de camundongo. Após anestesia com ketamina (**A**), os pêlos da área a ser operada foram removidos (**B**), e uma incisão com lâmina de bisturi número 15C foi realizada (**C**). O tecido foi divulsionado (**D**) e uma amostra foi implantada em cada lado da incisão (**E**). Com a ajuda de uma pinça, os tecidos foram unidos e colados com um adesivo de tecidos (**F**). (**G**) Camundongos na pedra aquecida aguardando para retornar da anestesia. (**H**) Placa de 24 poços onde foram colocadas as fatias de dente + scaffolds + DPSC.

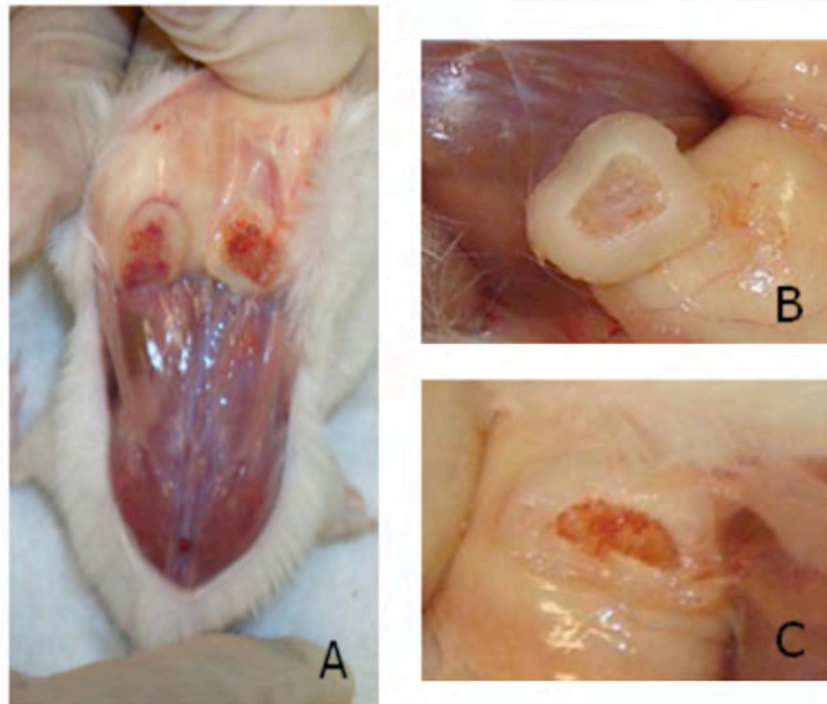


Fig4: Remoção das amostras da região dorsal do camundongo. Após anestesia, a pele da região dorsal foi levantada, expondo as duas amostras (A), fatia de dente + matriz condutiva 7 dias após implantação (B) e após 28 dias de implantação (C).

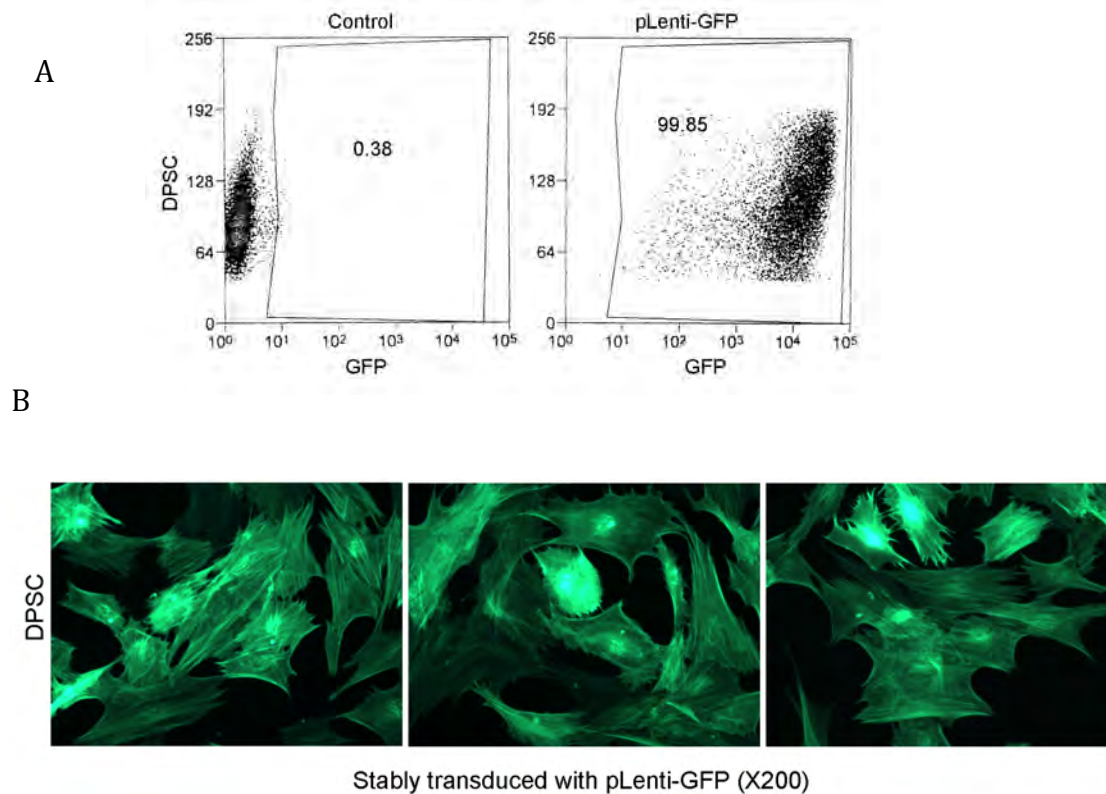


Fig5: DPSC transduzidas estavelmente com o gene GPF. **(A)** Diagrama de citometria de fluxo confirmando a qualidade da infecção das DPSCs, mostrando no painel da direita que 99.85% das células estavam positivas para pLenti-GFP. **(B)** Microscopia de fluorescência confirmando a transfecção estável das células. Os resultados são representantes de experimentos independentes.

Artigo 2

(Em processo de submissão ao Periodontoloy 2000)

How tooth configuration evolves towards signaling pathways

C. Cucco^{1,2}, J.A. Poli de Figueiredo², J.E. Nör^{1,3,4}

¹Angiogenesis Research Laboratory, Department of Restorative Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, Michigan, 48109-1078, USA; ²Department of Endodontics, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), ³Department of Otolaryngology, University of Michigan School of Medicine; ⁴Department of Biomedical Engineering, University of Michigan College of Engineering.

Abstract: 211 words

Manuscript: 2,112 words

Figures: 4 figures

Supplemental information:

References: 23 references

Keywords:

Corresponding author:

José Antônio Poli de Figueiredo, DDS, MSc, PhD
Professor of Dentistry
University of Michigan
1011 N. University Rm. 2309
Ann Arbor, MI, 48109-1078
United States
Telephone: (734) 936-9300
E-mail: jenor@umich.edu

Abstract

Tooth development in Mammalians is broadly dependent on sequential and reciprocal epithelial-mesenchymal interactions. These processes involve a series of inductive and permissive interactions that result in the determination, differentiation, and organization of odontogenic tissues. Multiple signaling molecules, including BMPs, FGFs, Shh, and Wnt proteins, have been implicated in mediating these tissue interactions. Further, transcription factors participate in epithelial-mesenchymal interactions via connecting the signaling loops between tissue layers by responding to inductive signals and regulating the expression of other signaling molecules. Adult stem cells are highly plastic and multipotent. These cells including dental pulp stem cells and bone marrow stromal cells could be reprogrammed into odontogenic fate and participated in tooth formation. Recent research in the studies of molecular basis of tooth development, adult stem cell biology, and regeneration will provide fundamental knowledge for the realization of human tooth regeneration in the near future.

Introduction

The first morphogenetic concept of mammalian dentition was proposed by Butler (1939), in a very important work in dogs. Then, adapted for the human dentition by Dahlberg (1945). Later on, Osborn interpreted these two concepts in the light of recent findings from molecular, cellular, genetic and theoretical and anthropological development (1978). Sharpe (1995) put forward the concept of an odontogenic homeobox code to explain how different tooth classes are initiated in different parts of the oral cavity in response to molecular cues and the expression of specific groups of homeobox genes. More recently, Mitsiadis and Smith (2006) proposed that the field, clone and homeobox code models, could all be incorporated into a single model to explain dental patterning.

Vertebrate organ development, from the initiation to terminal differentiation, depends upon inductive interactions between epithelium and adjacent mesenchyme (Gurdon, 1992; Thesleff et al., 1995). The inductive interactions consist of two main components: a tissue capable of producing the inducing stimulus and a tissue capable of receiving and responding to it. At the molecular level, these interactions involve complex signaling networks composed of various signaling molecules, their receptors, and the transcription control systems. It has been clear that embryonic inductions via cell and tissue interactions are mediated by protein signaling molecules known as growth factors. Distinguished among these are Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Wnt, and Hedgehog (Hh) families. These growth factors function synergistically and/or antagonistically to organize and pattern tissues and organs during embryonic development. Growth factor functions through binding to its specific cell membrane-bound receptor that triggers intracellular signal pathway, leading to signal transduction activating transcription factors, and eventually causing change of gene expression. Mammalian tooth development shares many similarities with other embryonic organs. The developing tooth of the mouse has been widely used as a model system for studying fundamental questions of developmental biology, such as epithelial-mesenchymal inductive interactions, differentiation and pattern formation.

Understanding the underlying molecular mechanisms of tooth formation might be the key for tissue engineers to recreate these processes *in vitro* and create a whole engineered tooth in the future. Currently, tooth allotransplantation, autotransplantation and dental titanium implants have been used clinically as prosthetic procedure for tooth replacement. Whole tooth engineering might be an excellent model system for organ replacement in general, which will pave the way for tissue engineering strategies involving vital organs

(Thesleff, Pispá, 1998).

Stem cell-based tissue engineering approaches to generate organ and tissue for the clinical application appear very promising (Alhadlaq, Mao, 2004). The isolation of postnatal stem cells from a variety of oral tissues marked an essential milestone in regenerative dentistry once they provide a promising tool for future treatment strategies (Miura et al., 2003; Gronthos et al., 2000; Seo et al., 2004; Sonoyama et al., 2008; Morsczeck et al., 2005). Additionally, tissue-engineering scaffolds are transitioning from passive cell delivery systems to bioactive matrices, which allows for the incorporation of biomolecules capable of inducing the desired cellular response (Chan, Mooney, 2008; Langer, Tirrell, 2004; Nicodemus, Bryant, 2008). A better understanding of the molecular mechanisms involved in tooth development and repair, utilizing emerging technologies in tissue engineering and biomaterials, combined to the potential of dental stem cells to form complex dental tissues, are the foundations for regenerative dentistry. In a near future, the replacement of lost oral tissues with biomaterials will be outdated by novel biology-based regenerative therapies.

Embryology of tooth development

In human embryo, tooth development starts as early as 6 weeks after conception. Sequential and reciprocal interactions between the cranial neural crest-derived cells and the epithelium regulate tooth morphogenesis and differentiation. The odontogenic potential to initiate tooth formation resides in the epithelial cells. At this stage, the odontogenic signals are passed from the epithelial layer to the mesenchyme, and so, the first morphological sign of tooth development is seen as a local thickening of the dental epithelium. This happens at the location of the future tooth, and it starts transmitting diffusible signals to the underlying mesenchyme, which responds and initiates the reciprocal signaling cascade: as the thickening grows, the epithelium starts to invaginate into the underlying mesenchyme; this mesenchyme then condenses around the invaginating epithelium to form the tooth bud. The epithelium then starts to extend further into the mesenchyme, folding itself around the condensing mesenchyme, forming a cap. At the cap stage, the epithelial specific folding leads to the formation of the enamel knot, a transient cluster of non-dividing epithelial cells. A unique set of signaling molecules, including sonic hedgehog and bone morphogenetic proteins are expressed in the enamel knot, therefore, it is considered to be a signaling center to control the patterning of the tooth cusps (Thesleff, Mikolla, 2002). During the subsequent bell stage, the epithelially derived ameloblasts line the oral cavity as the outer layer of the oral

mucosa, and mesenchymally derived cells differentiate and form soft and hard connective tissues. As the root formation progresses, the tooth erupts into the oral cavity (Palmer, Lumsden, 1987).

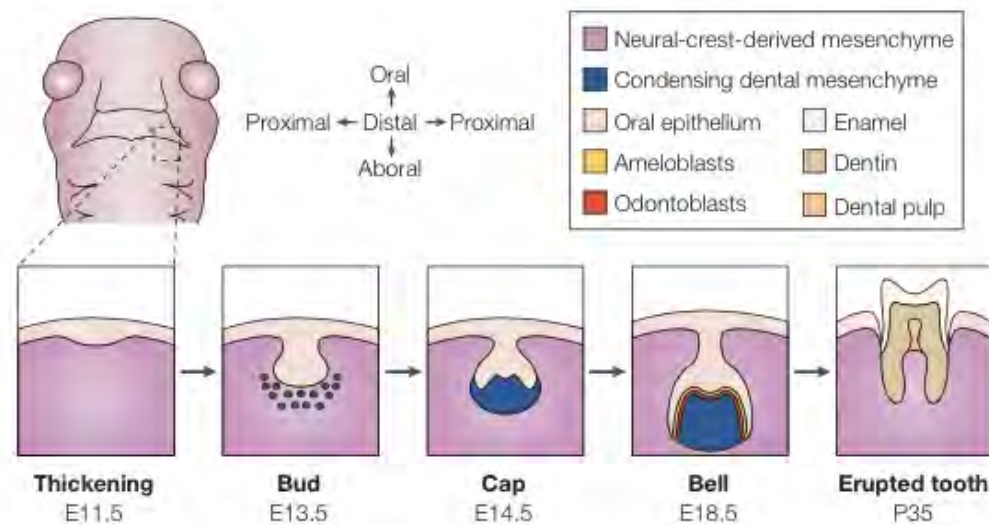


Figure 1: Stages of tooth development. A schematic frontal view of an embryo head at embryonic day (E)11.5 is shown with a dashed box to indicate the site where the lower (mandibular) molars will form. Below, the stages of tooth development are laid out from the first signs of thickening at E11.5 to eruption of the tooth at around 5 weeks after birth. The tooth germ is formed from the oral epithelium and neural-crest-derived mesenchyme. At the bell stage of development, the ameloblasts and odontoblasts form in adjacent layers at the site of interaction between the epithelium and mesenchyme. These layers produce the enamel and dentin of the fully formed tooth (From: Tucker, Sharpe. *The cutting edge of mammalian development; how the embryo makes teeth*. Nature, 2004).

The odontogenic potential represents an instructive induction capability of a tissue to induce gene expression in an adjacent tissue and to initiate tooth development. On the other hand, the odontogenic competence represents the capability of a tissue to respond to odontogenic signals and to support tooth formation. Tissue recombination experiments between isolated mouse dental epithelial and mesenchymal tissues have demonstrated that during early mouse molar tooth development, the odontogenic potential initially resides in the dental epithelium, and then shifts to the mesenchyme (Mina, Kollar, 1987; Lumsden, 1988). However, only the cranial neural crest derived mesenchyme is

odontogenic competent. Teeth failed to form when dental epithelium was recombined with non-neural crest derived mesenchyme, such as limb mesenchyme (Lumsden, 1988). In contrast, at the early bud stage, the odontogenic potential has switched to the mesenchyme, which becomes able to instruct non-dental epithelium to form tooth-specific structures (Mina, Kollar, 1987; Kollar, Baird, 1969). The odontogenic potential then remains in the dental papilla that also controls tooth shape till birth (Kollar, Baird, 1969; Yoshikawa, Kollar, 1981).

Understanding the temporal and spatial patterns of epithelium-mesenchyme interactions might be a key factor in recapitulating the developmental profile of tooth formation to engineer teeth in the future.

Growth factors mediating inductive interactions during odontogenesis

Classical study demonstrated the importance of cross-talk between dental epithelium and mesenchyme during tooth development. The isolated component of embryonic mouse tooth germs, either epithelium or mesenchyme, fails to undergo cytodifferentiation and the epithelium dies when grown in isolation (Koch, 1967). This study indicates that the dialogue between these two layers is required for their normal differentiation or survival, and the communications are mediated by diffusible signaling molecules known as growth factors.

Each growth factor provides specific changes in cells or allows a cascade of events that drive towards tissue development. Below, known molecules that participate in these cascades are shown:

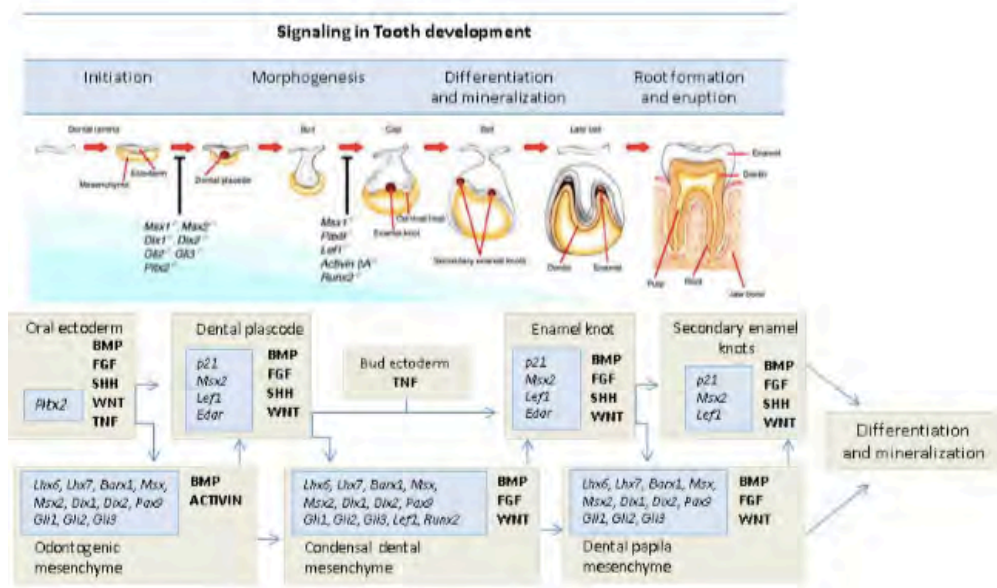


Figure - Timeline of tooth development and the respective molecules involved each stage.

Stem cells and tooth regeneration

Stem cells are generally defined as cells that have the capacity to self-renewal and giving rise to differentiated progeny (Van der Kooy, Weiss, 2000). They are present in small numbers in many vertebrate adult and fetal tissues, including the hematopoietic system, nervous system, gut, gonads, skin, and olfactory epithelium. They renew normal tissue regenerate following damage. It was traditionally thought that only embryonic stem (ES) cells are pluripotent, while adult stem cells are restricted in their differentiative and regenerative potential to the tissues in which they reside (Blau et al, 2001). However, this view of adult stem cell potential has been challenged by discoveries that bone marrow stromal cells (BMSCs), when stimulated by differentiated microenvironment cues, have the capacity to differentiate into a range of cell types of different organs, including chondrocytes, osteoblasts, adipocytes, cardiac and skeletal muscle cells, neurons and astrocytes (Kopen et al., 1999; Pittinger et al., 1999; Liechty et al., 2000; Sanchez-Ramos

et al., 2000; Woodbury et al., 2000; Krause et al., 2001; Orlic et al., 2001). BMSCs share characteristics with other multipotent stem cells, and give rise to differentiated progeny, including both mesenchymal and nonmesenchymal lineages. The properties of rapid expansion *in vitro* and multipotential of differentiation make BMSCs one of the most important adult stem cell sources for potential therapeutic use and tissue engineering.

Dentinal repair in adult animals takes place through the activity of odontoblasts that differentiate from a precursor cell population existing in the dental pulp tissue. Using methodology developed to isolate and characterize BMSCs, clonogenic and highly proliferative dental pulp stem cells (DPSCs) have been isolated from adult human teeth (Gronthos et al., 2000). These DPSCs maintained their high rate of proliferation even after considerable subculturing, and generated a dentin/ pulp-like complex that is composed of mineralized matrix when implanted into the dorsal surface of immunocompromised mice (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Batouli et al., 2003). However, whether the DPSCs are able to support the formation of a functional tooth has yet to be tested. Both DPSCs and BMSCs are associated with mineralized tissue. Despite the different origins and developmental potentials *in vivo*, the human DPSCs and BMSCs share many features with respect to their expression of various proteins commonly present in the extra- cellular matrix of bone and dentin. Both of them are able to form calcified deposits *in vitro* (Gronthos et al., 2000). Furthermore, microarray analyses of gene expression profiles of the human DPSCs and BMSCs indicate that these two distinct precursor populations have similar level of gene expression for more than 4000 known genes, with only a few differentially expressed ones (Shi et al., 2001). In humans, the transition from the deciduous teeth to the permanent teeth is a postnatal development with very unique and dynamic processes. It was found that exfoliated human deciduous tooth contains multipotent stem cells [stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) (Miura et al., 2003). SHED are distinct from DPSCs with respect to their capability to differentiate into odontoblasts and generate only dentin-like structure, instead of reconstituting a complete dentin- pulp-like complex as DPSCs do. In addition, as compared to DPSCs, SHED has higher proliferation rate and are able to differentiate into a variety of cell types including neural cells and adipocytes. SHED thus might represent a more immature population of multipotent stem cells (Miura et al., 2003).

Tissue engineering is considered as one of the most powerful approaches to repair or replace an injured tissue or organ in the future. *In vitro* generation or assembly of an implantable human tooth from stem cells would have extremely significant implications for the dental practice. Animal models of tooth generation *in vitro* will provide the molecular and cellular basis for the future application in humans. In biodegradable scaffold seeded with single cell suspension dissociated from the third molar tooth germ of six-month old pig jaws, tooth structures formed containing dentin, odontoblast, a well-defined pulp chamber, putative Hertwig's rooth sheath epithelia, and enamel organ

(Young et al., 2002). However, the bioengineered teeth are very small and do not conform to the size and shape of the scaffold. It was also shown that a scaffold is not necessary for *ex vivo* development of tooth explants. Re-aggregates of dissociated mouse molar tooth germ are able to form well- differentiated teeth underneath the mouse kidney capsule without the need of a scaffold (Yamamoto et al., 2003); Song et al, unpublished data]. Surprisingly, it was demonstrated recently that mouse stem cells, including ES cells, neural stem cells, and BMSCs, could be induced to reprogram into the odontogenic fate to support tooth formation when proper signals are provided (Ohazama et al., 2004). These cells, when aggregated and recombined with the E10.5 mouse molar epithelium which possesses the odontogenic potential, could all respond to the inductive signal from the dental epithelium, and initiate tooth formation (Ohazama et al., 2003). These studies support the idea that the odontogenic process can be initiated in stem cells with non-dental origin when proper signaling is provided.

Whole tooth engineering

The current method of replacing lost or missing teeth is the insertion of a titanium implant capped with a ceramic crown (ADA, 2003). With the increasing understanding of tooth development and the recent isolation and characterization of dental stem cells, the idea to engineer a 'bio-tooth' was born. However, considering the complexity of the distinct, yet integrated structures of the tooth to form one organ, tooth tissue engineering remains a remarkable challenge. Two major strategies have emerged over recent years: 1) *In vivo* implantation of competent stem cells to recreate embryonic tooth development; 2) *In vitro* culture of stem cells on biodegradable scaffolds and subsequent transplantation *in vivo*.

The first strategy is based on the finding that dissociated tooth germ cells possess the ability to reaggregate and continue to proliferate and develop into a tooth (Yamamoto et al., 2003; Mina, Kollar, 1987; Ten Cate, 1996). Even uncommitted, nondental mesenchyme can be instructed to mimic developmental events upon interaction with inductive dental epithelium (Ohazama et al., 2004; Modino, Sharpe, 2005). Tooth structures can be generated from nondental stem cells, including embryonic stem cells, neural stem cells and adult bone marrow-derived cells placed in direct contact with embryonic oral epithelium (Yen, Sharpe, 2008).

Recently, Ikeda *et al.* succeeded in generating a functional tooth replacement after transplantation of an engineered tooth germ into the maxillar alveolar bone of an adult mouse.

This tooth developed normally, displayed correct architecture and structure of soft and mineralized matrices, erupted into the oral cavity and reached occlusion (Ikeda et al., 2009). These studies emphasize the potential bioengineered organs for future clinical approaches.

Tooth-like structures have also been produced after seeding of dissociated tooth germ cells onto biodegradable polymer scaffolds. After transplantation of these constructs into rat hosts, recognizable tooth structures containing enamel, dentin and pulp tissue developed (Young et al., 2002; Duailibi et al., 2004; Duailibi et al., 2008). The seeded cells were shown to contain a heterogeneous population of both epithelial and mesenchymal cells, producing the various tissues of a tooth. Both polymers appeared to be similar in their ability to support the generation of tooth-like structures (Duailibi et al., 2004).

Although remarkable progress has been made towards whole tooth engineering, this endeavor remains a long-term approach, since several hurdles must be overcome to make this applicable in clinical practice. The combination of competent cell masses from different germ layers leads to the formation of teeth, but the major problem associated with this approach is the source of inductive embryonic cell layers. Other issues, such as controlling the morphology, size and shape of the generated teeth, and the eruption process, which is poorly understood even during normal tooth development, remain to be resolved. If a whole tooth could be entirely generated *in vivo* ('test tube teeth'), there would be problems associated with the host's immune response if it is not made from autologous cell sources. Connection of blood vessels, nerve fibers and dental pulp cells of the implanted tooth to the surrounding bone is an issue, as well as the formation of a functional PDL in order to assure proper anchorage and avoid ankylosis or root resorption. Furthermore, more needs to be done to avoid teratomas, which could become a hurdle if they occur in clinical situations involving humans.

Future perspective

To date, dentistry still relies on biomaterials to replace lost tissues in the oral cavity. However, advances in the field of material science, stem cell biology and dental tissue engineering open new possibilities, and biology-based treatment strategies are expected to be introduced in dental practice in the near future. The generation of test-tube teeth is already possible by reiterating developmental processes in animal models. However, several hurdles must be overcome before whole tooth replacement becomes a viable

option. The regeneration of partial tooth components might therefore be a more feasible short and midterm approach. The delivery of dental stem cells in novel, custom-made and bioactive scaffolding materials might enable us to implement concepts of regeneration rather than replacement for dental tissues. Despite some architectural and structural differences of functional tissue complexes in the oral cavity, such as PDL or dental pulp, common principles can be applied to regenerative strategies. Future dental treatment regimens can combine stem cells, growth factors and antibacterial or key anti-inflammatory molecules. Therefore, multifunctional delivery systems are needed that accommodate cells or assist in the homing of resident stem cells. Also, they must bind and prolong the bioavailability of several different growth factors and bioactive molecules. An important issue is the control of contamination, as the oral cavity harbors millions of microorganisms. Current evidence (Nor et al., 2001) provides clue for angiogenesis which allows for connection of engineered tissues to the vasculature.

The challenge of giving rise to complete teeth is about to be sorted, but it will need interdisciplinary approaches and close communication between material scientists, biologists and clinicians in order to develop systems capable of respecting individual needs and avoiding unpredictability.

References

- Palmer RM, Lumsden AGS. Development of periodontal ligament and alveolar bone in homografted recombinations of enamel organs and papillary, pulpal and follicular mesenchyme in the mouse. *Arch Oral Biol* 1987; **32**:281-9.
- Butler PM. Studies of the mammalian dentition. Differentiation of the post-canine dentition. *Proc Zool Soc Lond B* 1939;109:1–36.
- Dahlberg AA. The changing dentition of man. *J Am Dent Assoc* 1945;32:676–90.
- Dahlberg AA. The dentition of the American Indian. In: Laughlin WS, editor. *The physical anthropology of the American Indian*. New York: Viking Fund Inc.; 1951. p. 138–76.
- Osborn JW. Morphogenetic gradients: fields versus clones. In: Butler PM, Joysey KA, editors. *Development, function and evolution of teeth*. London: Academic Press; 1978. p. 171–201.
- Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 1995;32:17–25.
- Mitsiadis TA, Smith MM. How do genes make teeth to order through development? *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2006;306B:177–82.
- Thesleff I: Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J. Cell Sci.* 116(Pt 9), 1647–1648 (2003).
- Thesleff I, Pispa J. The teeth as models for studies on the molecular basis of the development and evolution of organs. In: C- M Chuong, RG Landes, eds. *Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Austin, TX 1998:157-79.
- Pispa J, Thesleff I: Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev. Biol.* 262(2), 195–205 (2003).
- Gurdon JB. The generation of diversity and pattern in animal development. *Cell* 1992; **68**:185-99.
- Thesleff I, Vaahtokari I, Partanen AM. Regulation of organogenesis: Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* 1995;

39: 35-50.

Chen YP, Maas R. Signaling loops in the reciprocal epithelial- mesenchymal interactions of mammalian tooth development. In: C-M Chuong, RG Landes, eds. *Molecular basis of epithelial appendage morphogenesis*. Austin, TX 1998:265-82. Alhadlaq A, Mao JJ. *Mesenchymal stem cells: Isolation and therapeutics*. *Stem Cells Dev*

2004; **13**:436-48. Miura M, Gronthos S, Zhao Me *t al.*: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(10), 5807–5812 (2003).

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. USA* 97(25), 13625– 13630 (2000).

Seo BM, Miura M, Gronthos S *et al.*: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364(9429), 149–155 (2004).

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. *J. Endod.* 34(2), 166–171 (2008).

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J *et al.*: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 24(2), 155–165 (2005).

Chan G, Mooney DJ: New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol.* 26(7), 382–392 (2008).

Langer R, Tirrell DA: Designing materials for biology and medicine. *Nature* 428(6982), 487–492 (2004).

Nicodemus GD, Bryant SJ: Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B. Rev.* 14(2), 149–165 (2008).

Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 2002; **217**:93-135.

Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non- dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol* 1987; **32**:123-7.

Lumsden AGS. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988; **103 (suppl.):**155-69.

Kollar EJ, Baird GR. Tissue interactions in embryonic mouse tooth germs. II. The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol* 1970; **24:**173-86.

Yoshikawa DK, Kollar EJ. Recombination experiments on the odontogenic roles of mouse dental papilla and dental sac tissues in ocular grafts. *Arch Oral Biol* 1981; **26:**303-7.

Koch WE. In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues. *Exp Zool* 1967; **165:**155-70.

Sharpe PT. Homeobox genes and orofacial development. *Connect Tissue Res* 1995; **32:**17-25.

Thomas BL, Tucker AS, Qui M, ET AL. Role of *Dlx-1* and *Dlx-2* genes in patterning of the murine dentition. *Development* 1997; **124:**4811-8.

Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP4 signaling. *Science* 1998; **282:**1136-8.

Tissier-Seta JP, Mucchielli ML, Mark M, Mattei MG, Goridis C, Brunet JJ. *Barx1*, a new mouse homeodomain transcription factor expressed in cranio-facial ectomesenchyme and the stomach. *Mech Dev* 1995; **51:**3-15.

Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 1999; **401:**276-8.

Satokata I, Maas R. *Msx-1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* 1994; **6:**348-56.

Peters H, Balling R. Teeth: where and how to make them. *Trends Genet* 1999; **15:**59-65.

MacKenzie A, Leeming GL, Jowett AK, Ferguson MWJ, Sharpe PT. The homeobox gene *Hox7.1* has specific regional and temporal patterns during early murine craniofacial embryogenesis, especially tooth development *in vivo* and *in vitro*. *Development* 1991; **111:**269-85.

MacKenzie A, Ferguson MWJ, Sharpe PT. Expression patterns of homeobox gene, *Hox-*

8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development* 1992; **115**: 403-40.

Satokata I, Ma L, Ohshima H, et al. Msx-2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet* 2000; **21**:138-41.

Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 1998; **125**:4325-33.

Zhang YD, Zhao X, Hu Y, et al. Msx1 is required for the induction of Patched by Sonic hedgehog in the mammalian tooth germ. *Dev Dyn* 1999; **215**:45-53.

Chen YP, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 1996; **122**:3035-44.

Bei M, Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. *Development* 1998; **125**:4325-33.

Zhang YD, Zhang ZY, Zhao X, et al. A new function of BMP4: Dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 2000; **127**:1431-43.

Bei M, Kratochwil K, Maas R. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 2000; **127**:4711-8.

Zhao X, Zhang ZY, Song Y, et al. Transgenically ectopic expression of Bmp4 to the Msx1 mutant dental mesenchyme restores downstream gene expression but represses Shh and Bmp2 in the enamel knot of wild type tooth germ. *Mech Dev* 2000; **99**:29-38.

Neubüser A, Peters H, Ballings R, Martin GR. Antagonistic interactions between FGF and BMP4 signaling pathways: A mechanism for positioning the sites of tooth formation. *Cell* 1997; **90**: 147-55.

Peters H, Neubuser A, Kratochwil K, Balling R. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev* 1998; **12**:2735-47.

Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet* 1996;

13:417-21.

Lidral AC, Romitti PA, Basart AM, et al. Association of MSX1 and TGFB3 with nonsyndromic clefting in humans. *Am J Hum Genet* 1998; **63:557-68.**

Van den Boogaard MJ, Dorland M, Beemer FA, van Amestel HK. MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans. *Nat Genet* 2000; **24:242-3.**

Beaty TH, Wang H, Hetmanski JB et al. A case-control study of nonsyndromic oral clefts in Maryland. *Ann Epidemiol* 2001; **11: 434-42.**

Blanco R, Chakraborty R, Barton SA, et al. Evidence of a sex-dependent association between the MSX1 locus and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in the Chilean population. *Hum Biol* 2001; **73:81-9.**

Jumlongras D, Bei M, Stimson JM, et al. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *Am J Hum Genet* 2001; **69: 67-74.**

Lidral AC, Reising BC. The role of MSX1 in human tooth agenesis. *J Dent Res* 2002; **81:274-8.**

Stockton DW, Das P, Goldenberg M, D'Souza RN, Patel PI. Mutation of PAX9 is associated with oligodontia. *Nat Genet* 2002; **24:18-9.**

Semina EV, Reiter RS, Leysens NJ, et al. Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. *Nat Genet* 1996; **14: 392-9.**

Mucchielli M-L, Mitsiadis TA, Raffo S, et al. Mouse *Otlx2/ RIEG* expression in the odontogenic epithelium precedes tooth initiation and requires mesenchyme-derived signals for its maintenance. *Dev Biol* 1997; **189:275-84.**

St Amand TR, Zhang YD, Semina EV, et al. Antagonistic signals between BMP4 and FGF8 define the expression of *Pitx1* and *Pitx2* in mouse tooth forming anlage. *Dev Biol* 2000; **217:323- 32.**

Lin C, Kioussi C, O'Connell S, ET AL. *Pitx2* regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 1999; **401:279-82.**

Lu MF, Pressman C, Dyer R, Johnson RL, Martin JF. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature* 1999; **401**:276-8.

Liu W, Selever J, Lu MF, Martin JF. Genetic dissection of Pitx2 in craniofacial development uncovers new functions in branchial arch morphogenesis, late aspects of tooth morphogenesis and cell migration. *Development* 2003; **130**:6375-85.

Van der Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science* 2000; **287**: 1439-41. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? *Cell* 2001; **105**:829-41.

Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**:10711-6.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143-7.

Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Med* 2000; **6**:1282-6.

Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000; **164**:247-56.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; **61**:364-70.

Krause D, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; **105**:369-77.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Science* 2001; **410**:701-5.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; **276**:71-4.

Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies

than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; **19**:219-25.

Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001; **19**:219-25.

Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.

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.

Harada H, Toyono T, Toyoshima K, et al. FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development* 2002; **129**:1533-41.

Harada H, Kettunen P, Jung H-S, et al. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 1999; **147**:105-20.

Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; **292**:1389-94.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; **81**:695-700.

Yamamoto H, Kim EJ, Cho SW, Jung HS. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electro Microsc* 2003; **52**:559-66.

Ohazama A, Modino SAC, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004; **83**: 518-22.

ADA Council on scientific affairs: titanium applications in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.* 134(3), 347–349 (2003).

Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT: Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J. Dent. Res.* 83(7), 518–522 (2004).

Modino SA, Sharpe PT: Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch. Oral Biol.* 50(2), 255–258 (2005).

Yen AH, Sharpe PT: Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 331(1), 359–372 (2008).

Ikeda E, Morita R, Nakao K *et al.*: Fully 34 functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(32), 13475–13480, 2009

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC: Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable ³⁶ polymer scaffolds. *J. Dent. Res.* 81(10), 695–700 (2002).

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC: Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J. Dent. Res.* 83(7), 523–528 (2004).

Duailibi SE, Duailibi MT, Zhang W, Asrican R, Vacanti JP, Yelick PC: Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *J. Dent. Res.* 87(8), 745–750 (2008).

Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S *et al.*: Bone marrow cells can give rise to ameloblast- like cells. *J. Dent. Res.* 85(5), 416–421 (2006).

Nakagawa E, Itoh T, Yoshie H, Satokata I: Odontogenic potential of post-natal oral mucosal epithelium. *J. Dent. Res.* 88(3), 219–223 (2009).

Gronthos S, Mankani M, Brahim 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.

Gronthos S, Brahim J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; **81**:531-5.

Batouli S, Miura M, Brahim J, et al. Comparison of stem-cell- mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003; **82**: 976-81.

DISCUSSÃO

“Discoveries raise more questions than answers”

Os avanços no conhecimento da biologia das células-tronco, e os conceitos emergentes de engenharia tecidual, proporcionaram à Odontologia uma nova perspectiva terapêutica baseada na reconstrução de tecidos lesados e perdidos (Gronthos et al., 2000). Nesse sentido, muitos pesquisadores tem colocado seus esforços em pesquisas que visam a formação de um dente completo (Young et al., 2002; Zhang et al., 2005), como uma possível alternativa para a substituição de dentes perdidos no futuro (Yen, Sharpe, 2008). Entretanto, considerado-se o tempo que um dente natural leva para se desenvolver, ainda não está definido que o crescimento de um dente completo com o uso de células alogênicas ou xelogênicas tenha significativa aplicabilidade clínica. Ao invés disso, pesquisas que objetivem procedimentos clínicos para regenerar um complexo dentino-pulpar funcional possivelmente tenham maior impacto na Odontologia (Hargreaves et al., 2008).

Assim, pesquisas sobre terapias regenerativas precisam ser conduzidas com o intuito de se estabelecer métodos seguros e confiáveis para os dentes que necessitam tratamento endodôntico (Murray et al., 2007). Dessa forma, os objetivos dos procedimentos regenerativos são: regenerar um tecido semelhante à polpa, idealmente um complexo dentino-pulpar; regenerar a dentina coronária comprometida, como por exemplo, após exposição por cárie; e regenerar raízes reabsorvidas, bem como dentina cervical e apical (Murray et al., 2007). Ademais, a engenharia da polpa pode fornecer um novo sistema para o estudo e possível manipulação dos processos de reparo pulpar e de formação de dentina reparadora após injúria ou manipulação cirúrgica (Mooney et al., 2006).

Nos procedimentos de engenharia do tecido pulpar, para que a regeneração do tecido dentinário utilizando-se células-tronco ocorra, é de fundamental importância que estas células tenham capacidade de diferenciação em odontoblastos. Para isso, a migração de células progenitoras ao local injuriado para diferenciação em uma nova geração de células semelhantes a odontoblastos é um importante evento de recrutamento celular que ocorre durante a regeneração, quando a vitalidade dos odontoblastos primários está comprometida (Sloan, Smith, 2007).

Sabe-se que a superfície de dentina exposta e as moléculas bioativas que estão presentes neste tecido fornecem os sinais que determinam certas funções celulares, como diferenciação e migração (Smith, 2003; Tziafas, 2004). Isso se dá porque os fatores de

crescimento são importantes na sinalização para a diferenciação de odontoblasto e estimulação à secreção de matriz dentinária. Tais fatores de crescimento são secretados por odontoblastos e depositados na dentina, onde permanecem de forma ativa por meio de interação com outros componentes (Murray et al., 2007). Quando ocorre injúria ao tecido dentinário, tanto fatores de crescimento, como as moléculas bioativas são liberados e dão início ao processo de sinalização e regeneração do complexo dentino-pulpar (Tziafas et al., 2000; Smith, Lesot, 2001; Sloan, Smith, 2007).

Baseado neste conhecimento e no fato de que o tratamento da dentina com EDTA pode solubilizar vários componetes não-colágenos na matriz dentinária e fatores de crescimento que têm, conforme previamente demonstrado (Smith, 2002; Huang et al., 2006), um efeito indutor na diferenciação de células progenitoras em odontoblastos, no presente estudo utilizou-se fatias de dentes tratadas com EDTA previamente ao uso em experimentos. Em estudo previo, foi demonstrado que SHED migraram em direção aos estímulos vindos da liberação de fatores acumulados na dentina (Sakai et al., 2010), e que os possíveis fatores responsáveis foram o fator de crescimento transformador beta (TGF) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). Essas são importantes famílias de fatores de crescimento envolvidas na sinalização celular para a diferenciação de odontoblastos, estimulação da secreção de matriz dentinária, desenvolvimento dentário e regeneração (Smith et al., 1998; Roberts-Clark, Smith, 2000; Nakashima, Reddi, 2003; Saito et al., 2004; Iohara et al., 2004).

Sakai et al. (2010) realizaram estudo utilizando o modelo de fatias dentárias e matrizes condutivas implantadas com SHED em camundongos imunoderprimidos a fim de analisar a diferenciação das células-tronco em odontoblastos funcionais. Além disso, utilizaram a tetracilcina para promover a marcação do tecido dentinário secretado pelas células recém diferenciadas e em processo de mineralização, demonstrando que a taxa de crescimento da dentina primária foi similar a de um dente natural. Neste estudo pode-se observar a configuração espacial na apresentação do sinal durante a diferenciação de odontoblastos e a necessidade de se considerar essa característica durante qualquer tentativa de se imitar o reparo pulpar (Goldberg, Smith, 2004).

Em condições normais, após a última mitose e antes da diferenciação dos odontoblastos, os pré-odontoblastos se alinham perpendicularmente à membrana basal, e apenas as células-filhas adjacentes à membrana basal sofrem diferenciação terminal em odontoblastos. Huang et al. (2006) demonstraram que o contato direto das células pulpares com a dentina tratada mecânica e quimicamente pareceu promover a diferenciação das células

pulpaes em odontoblastos, com os processos odontoblásticos se estendendo para dentro dos túbulos dentinários existentes. Assim, o modelo de fatias de dente tratadas com EDTA parece adequado para o estudo da formação de um tecido pulpar.

No contexto clínico futuro, se a regeneração do canal for possível, este canal precisa primeiramente ser limpo com agentes químicos (pelo menos com NaOCl e EDTA) e mecanicamente tratado durante o tratamento endodôntico de rotina. A fim de se produzir nova dentina pelo tecido pulpar regenerado, as células-tronco pulpaes teriam que ser capazes de se aderir às paredes dentinárias tratadas e, subsequentemente, proliferar e diferenciar em odontoblasto para a produção de nova dentina (Huang et al., 2006). Outro fator importante a ser considerado do ponto de vista de translação para a clínica, é o melhor entendimento dos eventos regenerativos que ocorrem durante este processo. Isso porque se a regeneração ocorrer de forma descontrolada, é provável que ocorra obliteração da câmara pulpar e perda da vitalidade do dente (Sloan, Smith, 2007).

Nas análises dos cortes histológicos corados com HE e beta-galactosidade, a organização característica do tecido conjuntivo pulpar e da camada de odontoblastos (células colunares, polarizadas, com a porção mais distal penetrando nos túbulos dentinários) não foi observada em todos os grupos, apenas após 14 dias de implantação foi observada uma camada de células beta-galactosidade positivas, mesmo que não colunares, disposta continuamente em contato com as paredes internas da câmara coronária das fatias de dente implantadas com DSPC. Apesar de a nossa análise se restringir apenas aos aspectos morfológicos das estruturas marcadas, acreditamos que esta não é uma especulação infundada, visto que Cordeiro et al. (2008) e Sakai et al. (2010) observaram a presença de odontoblastos funcionais utilizando a mesma metodologia que a empregada neste trabalho.

Recentemente, foi demonstrada a existência de uma importante ligação entre a formação do leito vascular pulpar com o VEGF secretado pelos odontoblastos (YANG et al., 2012). Essa descoberta levanta outras perspectivas no sentido de se relacionar a odontogênese com a vasculogênese pulpar. Ao passo que as vias de sinalização e as moléculas envolvidas no processo de formação de cada tecido são reveladas, é possível analisar se há uma relação de dependência entre os processos. Dessa forma, o entendimento do mecanismo de certas alterações do desenvolvimento dentário fica mais fácil, bem como pode tornar possível o desenvolvimento de novas terapias baseadas nesse conhecimento.

O reparo de tecidos baseado na utilização de células endotélias tem sido alvo de muitas

aplicações, como para a formação de vasos sanguíneos e válvulas cardíacas e para o tratamento de tecidos isquêmicos. Recentes avanços criaram a possibilidade de se usar células progenitoras endoteliais e células-tronco como fonte para as aplicações terapêuticas, incluindo a vascularização de tecidos criados a partir da engenharia tecidual (Levenberg, 2005).

Um dos principais fatores para o sucesso da engenharia tecidual está na necessidade de se manter uma vascularização suficiente no tecido recém-formado para suportar seu crescimento. Assim, as estratégias de engenharia tecidual dependem criticamente da extensão de infiltração de vasos sanguíneos nas matrizes biodegradáveis condutivas. Esforços para estimular o crescimento vascular em tecidos produzidos a partir da engenharia tecidual têm sido dirigidos para o desenvolvimento de estratégias com a utilização de fatores de crescimento para induzir a migração e proliferação de células endoteliais e/ou a utilização de células-tronco que possam se diferenciar na linhagem endotelial (Jabbarzadeh et al., 2008).

Bento et al. (2013) avaliaram a diferenciação endotelial em monocamada de SHED. Estudos anteriores, (Cordeiro et al., 2010; Sakai et al., 2010) verificaram que esta diferenciação ocorreu quando essas células eram semeadas em scaffolds tridimensionais de PLLA construídos no interior de fatias dentárias. Criaram a hipótese de que o ambiente tridimensional era um fator essencial para essa diferenciação. Entretanto, quando a diferenciação ocorreu em cultura de monocamada, sem a presença de dentina, ficou evidente a importância da associação de fatores de crescimento angiogênicos para que a diferenciação endotelial ocorresse. No caso do estudo de Bento et al. (2013), esses fatores foram fornecidos pelo meio de cultura, e não a partir da matriz dentinária das fatias dentais.

Baseado nesse conhecimento, surgem questionamentos a respeito de quais seriam os outros fatores, que agindo de forma sinérgica com o VEGF, desencadeiam o processo de diferenciação. VEGF é amplamente utilizado para induzir a diferenciação endotelial de células-tronco embrionárias e adultas, tanto sozinho ou em combinação com outros fatores de crescimento (Jazayeri et al., 2008; Kano et al., 2005; Oswald et al., 2004; Wosnitza et al., 2007). Ele age por meio da ligação com os receptores específicos, sendo a molécula sinalizadora mais importante envolvida no desenvolvimento inicial dos vasos sanguíneos. Assim, a regulação apropriada do VEGF é crucial para a formação de capilares normais (Carmeliet et al., 1996; Shalaby et al., 1995).

Cada tipo de receptor é responsável por um conjunto de moléculas sinalizadoras controladas de maneira temporal e espacial, as quais dão origem à transdução específica de sinal na membrana plasmática. Além disso, o desencadeamento do sinal também é determinado pela competição entre os vários receptores pelo VEGF e pela estrutura tridimensional exata formada pelo complexo ligante-receptor-co-receptor, a qual determina a eficácia com que os resíduos de tirosina intracelulares são fosforilados e, subseqüentemente, expostos às moléculas sinalizadoras subjacentes. Todos esses fatores exercem impacto na intensidade e cinética com que vias de sinalização individuais são ativadas e executam suas funções (Cébe-Juarez et al., 2006).

A formação de vasos sanguíneos envolve vias sinalizadoras e regulatórias que não foram completamente elucidadas. Contudo, pesquisas nessa área têm fornecido um melhor entendimento deste processo (Levenberg, 2005).

STAT3 tem um papel essencial na manutenção da capacidade de auto-renovação de células-tronco embrionárias, sendo que a ausência de sua ativação induz à diferenciação celular (Matsuda et al., 1999; Niwa et al., 1998). Em nosso trabalho, a função de STAT3 não foi determinada em DSPC, mas observamos uma diminuição de sua fosforilação sob estímulo do VEGF. Se em DSPC esta molécula tiver função semelhante à observada em células-tronco embrionárias, esta ausência de ativação poderá ser um evento importante para a diferenciação das células.

A ativação de ERK nas células endoteliais intervém eventos proliferativos (Zhang et al., 2008; Takahashi et al., 2001) e promove a sobrevivência celular e a ramificação de capilares (Mavria et al., 2006). Nas DPSCs, a ativação de ERK pelo VEGF provavelmente não está relacionada à proliferação celular, visto que, apesar de aumento da fosforilação de ERK após estímulo por VEGF, ou por VEGF + Ang1, o uso deste fator de crescimento não alterou a taxa de proliferação das células mantidas em cultura (dados não representados) - Sakai et al. (2010) observou o mesmo comportamento em SHED. Esta é uma das importantes diferenças em relação às células já diferenciadas. Contudo, vale ressaltar que células endoteliais apresentam VEGFR-2, e que as vias de sinalização ativadas por VEGFR-1 são pouco caracterizadas, e apenas efeitos proliferativos e migratórios fracos são mediados por este receptor (Cébe-Juarez et al., 2006). Além disso, células-tronco embrionárias de camundongo mostraram alta atividade de ERK quando estimuladas a se diferenciarem, sendo que a supressão desta via promoveu a auto-renovação destas células (Burdon et al., 1999; Liu et al., 2007). Xu et al. (2008) observaram que a ativação sustentada por até 14 dias de ERK é necessária para a

diferenciação de células-tronco da medula óssea em células endoteliais. Nossa análise das vias de sinalização restringiu-se à primeira hora após o estímulo com VEGF, mas, em estudos futuros, seria importante a verificação destas vias por um período maior.

Na nossa análise, a fosforilação de AKT foi estimulada pelo estímulo de VEGF + Ang1. Nas células endoteliais, AKT é ativado por uma variedade de estímulos e regula múltiplas etapas críticas na angiogênese, incluindo a sobrevivência celular, migração e formação de estruturas capilares (Shiojima, Walsh, 2002). Da mesma forma, essa via de sinalização foi relacionada à sobrevivência, mitogênese e migração de células progenitoras endoteliais (Qi et al, 1999). Mukherjee e Rotwein (2009) demonstraram que a ativação de AKT constitui parte do programa molecular necessário para provocar a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos.

Conforme observado em DSPC e em HDMEC, as vias STAT3 e ERK tiveram eventos fosforilativos antagônicos simultâneos, sugerindo-se possível comunicação entre elas. Liu et al. (2007) relataram que o sinal de MAPK-ERK pode ser um mecanismo de regulação negativa para STAT3. Contudo, estas são apenas especulações, visto que apenas por meio de experimentos com a utilização de inibidores específicos dessas vias de sinalização ou pela transdução celular para silenciamento de STAT3, ERK ou AKT, por exemplo, seria possível se especificar as funções celulares relacionadas a elas.

O entendimento das vias de sinalização celular relacionadas ao processo de diferenciação de células-tronco em células endoteliais bem como a possibilidade de manipulação das condições do meio de modo que tais vias sejam ativadas ou bloqueadas serão fundamentais para se poder controlar os mecanismos necessários para se guiar o destino celular. Apesar do nosso conhecimento limitado atual, certamente os mecanismos moleculares que dão origem às propriedades únicas das células-tronco serão desvendados e, então, estes poderão ser explorados como ferramentas poderosas nas descobertas básicas e aplicações clínicas (Liu et al., 2007).

No experimento de diferenciação de DSPC em células endoteliais sob estímulo do VEGF e Ang-1 + VEGF, observou-se que as células adquiriram marcadores específicos ao longo do tempo, o que sugere que os marcadores endoteliais são expressos em etapas sequenciais, conforme já observado por Kim et al. (2008). Assim, VEGFR-2 mostrou-se um marcador de diferenciação inicial, seguido de CD31, caderina-VE e Tie2, os quais podem ser considerados marcadores de células mais maduras, totalmente diferenciadas (Kim et al., 2008). É importante ressaltar que, *in vivo*, as células liberam VEGF no local

em que se localizam de maneira bem controlada, tanto espacial como temporalmente, o que permite a formação de complexos ligante-receptor. Isto difere significativamente dos modelos de cultura de células, onde fatores de crescimento são administrados de uma única vez, o que requer grande cautela na extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para situações *in vivo* (Cébe-Juarez et al., 2006).

Diversos modelos animais têm sido utilizados para se testar o potencial endotelial de prováveis células progenitoras ou células-tronco, tais como a implantação de células de interesse em matrizes poliméricas condutivas no dorso de camundongo. Tais modelos são úteis para se determinar se uma população-alvo específica pode contribuir para neovascularização de um determinado tecido. Para esse propósito, é imperativo que a população-alvo seja facilmente identificada e diferente das células vasculares do hospedeiro, permitindo-se determinar se as prováveis células progenitoras incorporaram-se na vasculatura existente, bem como quantificar a que extensão isso ocorreu. Uma das formas utilizadas é a marcação genética das células progenitoras que serão implantadas no animal (células que expressam LacZ ou GFP, por exemplo). A marcação das células permite a análise microscópica posterior da vasculatura existente no local do implante para se determinar se houve a incorporação das células marcadas na camada do endotélio ou de células murais dos vasos sanguíneos (Hirsch et al., 2008).

Para aplicações de engenharia tecidual, é importante o conhecimento da seqüência de eventos que ocorrem ao longo do tempo e que levam à formação de vasos funcionais. A presença de estruturas semelhantes a vasos marcadas pela coloração x-gal, diferenciadas a partir das DSPC-Lacz, e sem a presença de células sanguíneas no seu interior sugere que estas ainda não se anastomosaram com os vasos sanguíneos do camundongo para reestabelecer o fluxo de oxigênio e nutrientes.

Malero-Martin et al. (2007) observaram em análises ao longo do tempo de implantes contendo uma mistura de células progenitoras endoteliais e de músculo liso da veia safena que as células pareciam dispersas no implante até o dia 2, organizavam-se em estruturas tubulares sem células sanguíneas até o dia 4, e formavam vasos funcionais, contendo glóbulos vermelhos até o dia 7. Em nosso estudo, a ocorrência mais tardia da formação de vasos e a ausência de fluxo sanguíneo até o dia 21 podem estar relacionadas com a presença da matriz de PLLA, a qual deve ser reabsorvida e substituída por um tecido funcional, com a necessidade de diferenciação das células na linhagem endotelial, visto que implantamos células-tronco e não células precursoras endoteliais, e com a disponibilização de fatores de crescimento, como o VEGF, de maneira não controlada.

Apesar de os implantes terem sido deixados por um tempo maior do que 21 dias, não foi possível detectar vasos sanguíneos com fluxo de sangue no seu interior.

É importante salientar que a existência de células marcadas na camada de células endoteliais por si só não é indicativa de diferenciação em células endoteliais funcionais. A fim de se demonstrar que a alteração fenotípica ocorreu *in vivo*, é crítico se avaliar a expressão de genes e/ou proteínas indicativos de células endoteliais maduras e funcionais, tais como caderina-VE, VEGFR-2 e CD31, entre outros (Hirsch et al., 2008). Assim, reconhecemos que um dos pontos fracos deste trabalho foi a ausência de comprovação, por meio de técnica imunohistoquímica, por exemplo, de que as estruturas marcadas em azul (células que expressam β -galactosidase) também apresentariam o marcador de células endoteliais CD31.

Apesar da impossibilidade de se controlar a liberação de fatores de crescimento no local dos implantes, sugere-se que a hipóxia relativa gerada localmente estimulou a expressão de VEGF, presumivelmente através da ativação do fator induzível de hipóxia 1 alfa. Esse fator transcricional é conhecido por estimular a expressão de VEGF e iniciar a cascata angiogênica nos tecidos em hipóxia (Maxwell, Ratcliffe, 2002; Marti, 2005; Bao et al., 2008), resultando na ramificação vascular em direção

Alternativamente, sabe-se que a matriz dentinária contém VEGF e que este fator de crescimento é bioativo quando liberado (Roberts-Clark, Smith, 2000). Portanto, as atividades funcionais potenciais dos fatores de crescimento seqüestrados na matriz dentinária parecem ser extensas. Além da indução da diferenciação de odontoblastos, conforme descrito anteriormente, essas moléculas podem sinalizar a proliferação, a migração e a diferenciação celular na polpa. Assim, a presença de fatores angiogênicos pode ser importante na estimulação da formação de novos capilares nos locais de reparo. Deve ser reconhecido, entretanto, que as células estão sendo expostas a um coquetel de fatores de crescimento, os quais podem levar a interações complexas e respostas celulares diversas. Tais respostas podem não ser facilmente previsíveis com base apenas na somatória de atividades conhecidas de fatores de crescimento individuais (Smith, 2003).

Após observar que DSPC responde ao estímulo do VEGF e/ou Ang-1 + VEGF por meio da diferenciação em células endoteliais *in vitro*, decidimos checar a importância dos receptores presentes nesta célula (VEGFR-1) para o desencadeamento das respostas observadas. Para isto, silenciámos tal receptor em DSPC e as estimulamos com VEGF e com Ang-1 + VEGF. Inicialmente, verificamos as alterações ocorridas nas vias de

sinalização celular nas células silenciadas em comparação àquelas utilizadas como controle. Interessantemente, o padrão de fosforilação de STAT3 e AKT nas células transduzidas com shRNA-VEGFR-1 foi diferente daquele observado nas células com shRNA-controle.

A análise das vias de sinalização celular neste trabalho permitiu obter apenas dados preliminares, os quais merecem um estudo mais aprofundado para se poder determinar a função de tais vias em DSPC e verificar sua importância na diferenciação destas células. Até o presente momento, nenhuma conclusão pode ser tomada com base nestes resultados.

Embora a engenharia de vasos sanguíneos constitua grande promessa para as aplicações terapêuticas em diversas áreas, desde a produção de vasos isolados ou de uma rede vascular até a neovascularização *in vivo* de vários tecidos, ainda existem diversos desafios que precisam ser enfrentados antes que esses métodos possam ser utilizados para o tratamento de doenças e regeneração de tecidos perdidos (Levenberg, 2005).

Em nosso estudo, usamos fatias de dentes com apenas 1.3 mm de espessura para começar a entender o potencial de DSPC nas aplicações de engenharia pulpar. Obviamente, a translação desta estratégia para a clínica irá requer testes animais adicionais, o desenvolvimento de modelos *in situ* e a habilidade de se fabricar um tecido em toda a extensão do canal radicular para as pesquisas clínicas. Contudo, tecnologia igual ou semelhante à empregada neste estudo poderá fornecer ferramentas clínicas para tratamentos endodônticos que visem à regeneração de um tecido pulpar completo e formação de tecido dentinário num futuro não muito distante.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise conjunta dos dados obtidos nos permite sugerir que:

- VEGF auxilia na indução da diferenciação de DSPC em células endoteliais;
- VEGF + Ang-1 estimulam um aumento da fosforilação de ERK e AKT e diminuição da fosforilação de STAT3 em DSPC *in vitro*;
- DSPC-LacZ são capazes de se diferenciar em células endoteliais *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res*. 2000;258(1):33-41.
- Adams R.H. and Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2007;8:464-478.
- Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res*. 2005;321(3):391-400.
- Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006;13(7):611-20.
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. Can stem cells cross lineage boundaries? *Nat Med*, v.7, n.4, Apr, p.393-5. 2001.
- Arana-Chavez VE, Massa LF. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(8):1367-73.
- Asahara, T., Chen, D., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kearney, M., Magner, M., Yancopoulos, G. D., and Isner, J. M. (1998). Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-induced postnatal neovascularization. *Circ Res* **83**, 233–40.
- Augustin H.G., Young K.G., Thurston G. and Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin- Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2009;10:165-177.
- Azari F, Vali H, Guerquin-Kern JL, Wu TD, Croisy A, Sears SK, Tabrizian M, McKee MD. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Struct Biol*. 2008;162(3):468-79.
- Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J Surg Res*. 2008 May 12. [Epub ahead of print]
- Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003;82(12):976-81.
- Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. Phosphate is a specific signal for induction of

osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(15):8352-7.

Beertsen W, van den Bos T. Alkaline phosphatase induces the mineralization of sheets of collagen implanted subcutaneously in the rat. *J Clin Invest*. 1992 Jun;89(6):1974-80.

Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*. 1991;14(1):27-40.

Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod*. 2003;29(5):334-7.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.

Bicknell R, Harris AL. Novel angiogenic signaling pathways and vascular targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004;44:219-38

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-41.

Bluteau G, Luder HU, de Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*. 2008;16:1-9.

Breen EC. VEGF in biological control. *J Cell Biochem*. 2007;102(6):1358-67.

Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnürch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 1996;87(2):630-41.

Brey EM, Uriel S, Greisler HP, McIntire LV. Therapeutic neovascularization: contributions from bioengineering. *Tissue Eng*. 2005;11(3-4):567-84.

Burdon T, Stracey C, Chambers I, Nichols J, Smith A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol*. 1999;210(1):30-43.

Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):169-79.

Brindle N.P., Saharinen P. and Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ. Res*. 2006;98:1014-1023.

Carlisle MJ, Sturrock MG, Chisholm DM, Ogden GR, Schor AM. The presence of pericytes and transitional cells in the vasculature of the human dental pulp: an

ultrastructural study. *Histochem J.* 2000;32(4): 239-45.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380(6573):435-9.

Casagrande L, Cordeiro MM, Nor SA, Nor JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology.* 2011;99:1-7.

Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nor JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater* 2013;29:97–102.

Cébe-Suarez S, Zehnder-Fjällman A, Ballmer-Hofer K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63(5):601-15.

Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc Res Tech* 2003;60:469–79.

Chen J.X., Lawrence M.L., Cunningham G., Christman B.W. and Meyrick B. HSP90 and Akt modulate Ang-1-induced angiogenesis via NO in coronary artery endothelium. *J. Appl. Physiol.* 2004;96:612-620.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA e Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J.* 2012;45(3):294-305.

Conchie JM, Munroe JD, Anderson DO. The incidence of staining of permanent teeth by the tetracyclines. *Can Med Assoc J.* 1970;103(4):351-6.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod.* 2008;34(8):962-9.

Costa C, Soares R, Schmitt F. Angiogenesis: now and then. *APMIS* 2004; 112(7- 8): 402-12.

Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol.* 1992;8(2):45-55.

d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. 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(6):1162-71.

Daly C., Wong V., Burova E., Wei Y., Zabski S., Griffiths J., Lai K.M., Lin H.C., Ioffe E., Yancopoulos G.D. and Rudge J.S. (2004). Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* 18, 1060-1071.

Davis S., Aldrich T.H., Jones P.F., Acheson A., Compton D.L., Jain V., Ryan T.E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P.C. and Yancopoulos G.D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87:1161-1169.

Dawson D.W., Volpert O.V., Gillis P., Crawford S.E., Xu H., Benedict W. and Bouck N.P. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science.* 1999;285: 245-248.

Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:261-270.

Dejana E., Tournier-Lasserre E. and Weinstein B.M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell* 2009;16:209-221.

DeLisser HM, Christofidou-Solomidou M, Strieter RM, Burdick MD, Robinson CS, Wexler RS, Kerr JS, Garlanda C, Merwin JR, Madri JA, Albelda SM. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 1997;151(3):671-7.

Delvos U, Gajdusek C, Sage H, Harker LA, Schwartz SM. Interactions of vascular wall cells with collagen gels. *Lab Invest.* 1982;46(1):61-72.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004;83(7):523- 8.

Dumont D.J., Gradwohl G., Fong G.H., Puri M.C., Gertsenstein M., Auerbach A. and Breitman M.L. (1994). Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev.* 8, 1897-1909.

Dutta D, Ray S, Vivian JL, Paul S. Activation of the VEGFR1 chromatin domain: an angiogenic signal-ETS1/HIF-2 α regulatory axis. *J Biol Chem.* 2008;283(37):25404-13.

Edwards PC, Mason JM. Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration. *Head Face Med.* 2006;2:16.

Eichmann A, Corbel C, Nataf V, Vaigot P, Bréant C, Le Douarin NM. Ligand- dependent development of the endothelial and hemopoietic lineages from embryonic mesodermal

cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(10):5141-6.

Eklund L. and Olsen B.R. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp. Cell Res*. 2006;312:630-641.

Féletou M. Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators. In. *The Endothelium San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences*, 2011. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57148/>

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ e Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003;9(6):669-76.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004;25(4):581-611.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:789–91.

Flamme I, Risau W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992;116(2):435-9.

Fiedler U. and Augustin H.G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol*. 2006;27:552-58.

Folkman J. Angiogenesis-dependent diseases. *Semin. Oncol*. 2001;28:536-542.

Fons P, Herault JP, Delesque N, Tuyaret J, Bono F, Herbert JM. VEGF-R2 and neuropilin-1 are involved in VEGF-A-induced differentiation of human bone marrow progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2004;200(3):351-9.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970;3(4):393-403.

Fuchs E, Segre JA. Stemcells: a new lease on life. *Cell*. 2000;100(1):143-55.

Fuh G, Garcia KC, de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*. 2000;275:26690-5.

Fujikawa K., de Aos Scherpenseel I., Jain S.K., Presman E., Christensen R.A. and

Varticovski L. Role of PI 3-kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachment-dependent survival of endothelial cells. *Exp. Cell Res.* 1999;253:663-672.

Fukuhara S., Sako K., Minami T., Noda K., Kim H.Z., Kodama T., Shibuya M., Takakura N., Koh G.Y. and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:513-526.

Fukuhara S., Sako K., Noda K., Nagao K., Miura K. and Mochizuki N. Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1. *Exp. Mol Med.* 2009;41:133-139.

Gamble J.R., Drew J., Trezise L., Underwood A., Parsons M., Kasminkas L., Rudge J., Yancopoulos G. and Vadas M.A. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ. Res.* 2000;87:603-607.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(1):13-27.

Gonçaves SB, Dong Z, Bramante CM, Holland GR, Smith AJ, Nör JE. Tooth slice-based models for the study of human dental pulp angiogenesis. *J Endod.* 2007;33(7):811-4.

Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bioactive dentine matrix components. *Biomaterials.* 2006;27(14):2865-73.

Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, de Figueiredo JA, Nör JE, de Araujo FB, Fossati AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod.* 2007;33(5):524-30.

Gronthos S, Brahini J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81(8):531-5.

Gronthos S, Mankani M, Brahini 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(25):13625-30.

Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res* 2010;89:219–29.

Harfouche R., Gratton J.P., Yancopoulos G.D., Nosedá M., Karsan A. and Hussain S.N. Angiopoietin-1 activates both anti- and proapoptotic mitogen-activated protein kinases. *FASEB J.* 2003;17:1523- 1525.

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol.* 1999;147(1):105-20.

Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod.* 2008;34(7 Suppl):S51-6.

He G, Dahl T, Veis A, George A. Dentin matrix protein 1 initiates hydroxyapatite formation in vitro. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:240-5.

Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Matsumura K, Kawasaki K, Shibuya M, Nishikawa SI. A chemically defined culture of VEGFR2⁺ cells derived from embryonic stem cells reveals the role of VEGFR1 in tuning the threshold for VEGF in developing endothelial cells. *Blood.* 2003;101(6):2261-7.

Hirschi KK, Ingram DA, Yoder MC. Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(9):1584-95.

Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, van Oosteron AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4): 549-80.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005 Jun;68(2):89- 101.

Huang GT, Shagramanova K, Chan SW. Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod.* 2006;32(11):1066- 73.

Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res.* 2006b;324(2):225-36.

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88(9):792-806.

Hui M, Hu M, Tenenbaum HC. Changes in cell adhesion and cell proliferation are associated with expression of tissue non-specific alkaline phosphatase. *Cell Tissue Res.* 1993;274(3):429-37.

Iida M, Heike T, Yoshimoto M, Baba S, Doi H, Nakahata T. Identification of cardiac stem cells with FLK1, CD31, and VE-cadherin expression during embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 2005;19(3):371-8.

Iinuma Y, Suzuki M, Yokoyama M, Tanaka-Nakamura Y, Ohtaishi N. Daily incremental lines in sika deer (*Cervus nippon*) dentine. *J Vet Med Sci.* 2002;64(9):791-5.

Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res.* 2004;83(8):590-5.

Jabbarzadeh E, Starnes T, Khan YM, Jiang T, Wirtel AJ, Deng M, Lv Q, Nair LS, Doty SB, Laurencin CT. Induction of angiogenesis in tissue-engineered scaffolds designed for bone repair: a combined gene therapy-cell transplantation approach. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(32):11099-104.

Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri SH, Piryaei A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int.* 2008;32(10):1183-92.

Jones N., Iljin K., Dumont D.J. and Alitalo K. Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001;2:257-267.

Jones N., Master Z., Jones J., Bouchard D., Gunji Y., Sasaki H., Daly R., Alitalo K. and Dumont D.J. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J. Biol. Chem.* 1999;274:30896-30905.

Kanda S., Miyata Y., Mochizuki Y., Matsuyama T. and Kanetake H. (2005). Angiopoietin 1 is mitogenic for cultured endothelial cells. *Cancer Res.* 65, 6820-6827.

Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T, Ouchi Y, Miyazono K, Miyazawa K. VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 16):3759-68.

Karamysheva AF. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2008;73(7):751-62.

Kasugai S, Shibata S, Suzuki S, Susami T, Ogura H. Characterization of a system of mineralized-tissue formation by rat dental pulp cells in culture. *Arch Oral Biol.* 1993;38(9):769-77.

Kawasaki K, Tanaka S, Ishikawa T. On the incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat.* 1977;123:427-36.

Kawasaki K. On the configuration of incremental lines in human dentine as revealed by tetracycline labeling. *J Anat.* 1975;119(1):61-6.

Kettunen P, Karavanova I, Thesleff I. Responsiveness of developing dental tissues to fibroblast growth factors: expression of splicing alternatives of FGFR1, -2, -3, and of FGFR4; and stimulation of cell proliferation by FGF-2, -4, -8, and -9. *Dev Genet.* 1998;22(4):374-85.

Kim I., Kim H.G., Moon S.O., Chae S.W., So J.N., Koh K.N., Ahn B.C. and Koh G.Y.

Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ. Res.* 2000a;86:952-959.

Kim I., Kim H.G., So J.N., Kim J.H., Kwak H.J. and Koh G.Y. Angiopoietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt signal transduction pathway. *Circ. Res.* 2000b;86:24-29.

Kim GD, Kim GJ, Seok JH, Chung HM, Chee KM, Rhee GS. Differentiation of endothelial cells derived from mouse embryoid bodies: A possible in vitro vasculogenesis model. *Toxicol Lett.* 2008;180(3):166-73.

Kontos C.D., Stauffer T.P., Yang W.P., York J.D., Huang L., Blonar M.A., Meyer T. and Peters K.G. Tyrosine 1101 of Tie2 Is the Major Site of Association of p85 and Is Required for Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 1998;18:4131- 4140.

Kuijper S., Turner C.J. and Adams R.H. Regulation of angiogenesis by Eph-ephrin interactions. *Trends Cardiovasc. Med.* 2007;17:145-151.

Larmas M. Pre-odontoblasts, odontoblasts, or "odontocytes". *J Dent Res.* 2008;87(3):198.

Levenberg S. Engineering blood vessels from stem cells: recent advances and applications. *Curr Opin Biotech.* 2005;16(5):516-23.

Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(7):4391-6.

Lin P., Buxton J.A., Acheson A., Radziejewski C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D., Channon K.M., Hale L.P., Dewhirst M.W., George S.E. and Peters K.G. Antiangiogenic gene therapy targeting the endothelium-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998;95:8829-8834.

Lin P., Polverini P., Dewhirst M., Shan S., Rao P.S. and Peters K. Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J. Clin. Invest.* 1997;100:2072-2078.

Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM e Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod.* 2011;37(2):133-8.

Liu J, Jin T, Ritchie HH, Smith AJ, Clarkson BH. In vitro differentiation and mineralization of human dental pulp cells induced by dentin extract. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2005;41(7):232-8.

Liu N, Lu M, Tian X, Han Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol.* 2007;211(2):279-86.

Lumsden AG. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development.* 1988;103(Suppl): 155-69.

Marti HH. Angiogenesis--a self-adapting principle in hypoxia. *EXS.* 2005;(94):163- 80.

Masatomi Y, Nakagawa Y, Kanamoto Y, Sobue S, Ooshima T. Effects of serum phosphate level on formation of incisor dentine in hypophosphatemic mice. *J Oral Pathol Med.* 1996;25(4):182-7.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* 1999;18(15):4261-9.

Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res.* 2000;79(8):1596-603.

Mavria G, Vercoulen Y, Yeo M, Paterson H, Karasarides M, Marais R, Bird D, Marshall CJ. ERK-MAPK signaling opposes Rho-kinase to promote endothelial cell survival and sprouting during angiogenesis. *Cancer Cell.* 2006;9(1):33-44.

Maxwell PH, Ratcliffe PJ. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2002;13(1):29-37.

Melero-Martin JM, Zhan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff. In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007;109(11):4761-8.

Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell.* 1993;72(6):835-46.

Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, Teixeira FB e Vann WF, JR. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr Dent.* 2012;34:66-9.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.

Monson E, Baumbach WR, Lavelin I, Gertler A, Hurwitz S, Pines M. Generation of

growth hormone binding protein by avian growth plate chondrocytes is dependent on cell differentiation. *Mol Cell Endocrinol.* 1997;135(1):1-10.

Montesano R, Orci L, Vassalli P. In vitro rapid organization of endothelial cells into capillary-like networks is promoted by collagen matrices. *J Cell Biol.* 1983;97(5 Pt 1):1648

Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog.* 1996;12(6):865-8.

83. Mukherjee A, Rotwein P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 5):716-26.

Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood.* 2005;105(5):1992-9.

Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.* 2007;33(4):377-90.

Nait Lechguer A, Couble ML, Labert N, et al. Cell differentiation and matrix organization in engineered teeth. *J Dent Res* 2011;90:583-9.

Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod.* 2005;31(10):711-8.

Nakashima M, Reddi AH. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol.* 2003;21(9):1025-32.

Nambu H., Nambu R., Oshima Y., Hackett S.F., Okoye G., Wiegand S., Yancopoulos G., Zack D.J. and Campochiaro P.A. Angiopoietin 1 inhibits ocular neovascularization and breakdown of the blood-retinal barrier. *Gene Ther.* 2004;11:865-873.

Nambu H., Umeda N., Kachi S., Oshima Y., Akiyama H., Nambu R. and Campochiaro P.A. Angiopoietin 1 prevents retinal detachment in an aggressive model of proliferative retinopathy, but has no effect on established neovascularization. *J. Cell Physiol.* 2005;204:227-235.

Niwa H, Burdon T, Chambers I, Smith A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 1998;12(13):2048-60.

Nör JE, Christensen JB, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol.* 1999;154(2):375-84.

Nör JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle V, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res.* 2000;37(3):209-18.

Nör JE, Peters MC, Christensen JB, Sutorik MM, Linn S, Khan MK, Addison CL, Mooney DJ, Polverini PJ. Engineering and characterization of functional human microvessels in immunodeficient mice. *Lab Invest.* 2001;81(4):453-63.

Nör JE. Tooth regeneration in operative dentistry. *Oper Dent.* 2006;31(6):633-42.

Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(5):359-71.

Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem.* 2008;315(1-2):51-60.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377-84.

Pandya NM, Dhalla NS, Santani DD. Angiogenesis - a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol.* 2006;44(5):265-74.

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M. Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone.* 2002;30(2):377-85.

Papapetropoulos A., Fulton D., Mahboubi K., Kalb R.G., O'Connor D.S., Li F., Altieri D.C. and Sessa W.C. (2000). Angiopoietin-1 Inhibits Endothelial Cell Apoptosis via the Akt/Survivin Pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 9102-9105.

Peters K.G., Kontos C.D., Lin P.C., Wong A.L., Rao P., Huang L., Dewhirst M.W. and Sankar S. (2004). Functional Significance of Tie2 Signaling in the Adult Vasculature. *Recent Prog. Horm. Res.* 59, 51-71.

Piva E, Silva A, Nör JE. Functionalized scaffolds to control dental pulp stem cell fate. *J Endod* 2014;40(4):33-40

Polak JM, Bishop AE. Stem cells and tissue engineering: past, present, and future. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1068:352-66.

Polverini PJ. The pathophysiology of angiogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996;6(3):230-47.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.*

1997;276(5309):71-4.

Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod.* 2008;34(4):421-6.

Priam F, Ronco V, Locker M, Bourd K, Bonnefoix M, Duchêne T, Bitard J, Wurtz T, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A. New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. *Arch Oral Biol.* 2005;50(2):271-7.

Qi JH, Matsumoto T, Huang K, Olausson K, Christofferson R, Claesson-Welsh L. Phosphoinositide 3 kinase is critical for survival, mitogenesis and migration but not for differentiation of endothelial cells. *Angiogenesis.* 1999;3:371-80.

Rao MS. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev.* 2004;13(5):p.452-5.

Rahimi N. VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci* 2006;11:818-29.

Rege T.A., Fears C.Y. and Gladson C.L. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro. Oncol.* 2005;7:106-121.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001; 414(6859):105-11.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.

Roberts-Clarck DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6.

Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002;16(20):2684-98.

Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod.* 2004;30(4):205-8.

Sánchez AR, Rogers RS 3rd, Sheridan PJ. Tetracycline and other tetracycline- derivative staining of the teeth and oral cavity. *Int J Dermatol.* 2004;43(10):709-15.

Santini A, Ivanovic V. The quantification of tertiary dentine formation in response to materials commonly placed in deep cavities in general practice in the UK. *Prim Dent Care.* 1996;3(1):14-22.

Saharinen P., Eklund L., Miettinen J., Wirkkala R., Anisimov A., Winderlich M., Nottebaum A., Vestweber D., Deutsch U., Koh G.Y., Olsen B.R. and Alitalo K. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:527-537.

Sato T.N., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg-Buchholz K., Fujiwara Y., Gendron-Maguire M., Gridley T., Wolburg H., Risau W. and Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature.* 1995; 376:70-74.

Sato Y. and Sonoda H. The vasohibin family: A negative regulatory system of angiogenesis genetically programmed in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2007;27:37-41.

Shalaby F, Ho J, Stanford WL, Fischer KD, Schuh AC, Schwartz L, Bernstein A, Rossant J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell.* 1997;89(6):981-90.

Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995;376(6535):62-6.

Sharpe, P.T. and Young, C.S. Test-tube teeth. *Sci. Am.* 2005;293:34–41

Schlaeger T.M., Bartunkova S., Lawitts J.A., Teichmann G., Risau W., Deutsch U. and Sato T.N. Uniform vascular-endothelial-cell- specific gene expression in both embryonic and adult transgenic mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997;94:3058-3063.

Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8(3):191-9.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18(14):696-704.

Shibuya M. and Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 2006;312:549-560.

Shiojima I, Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res.* 2002;90(12):1243-50.

Slavkin HC. Entering the era of molecular dentistry. *J Am Dent Assoc.* 1999;130(3):413-7.

Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis.* 2007;13(2):151-7.

Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001;12(5):425-37.

Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.* 1998;106 Suppl 1:179-84.

Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 2002;36(4):223-32.

Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.* 2003;67(6):678-89.

Sone M, Itoh H, Yamahara K, Yamashita JK, Yurugi-Kobayashi T, Nonoguchi A, Suzuki Y, Chao TH, Sawada N, Fukunaga Y, Miyashita K, Park K, Oyamada N, Sawada N, Taura D, Tamura N, Kondo Y, Nito S, Suemori H, Nakatsuji N, Nishikawa S, Nakao K. Pathway for differentiation of human embryonic stem cells to vascular cell components and their potential for vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27(10):2127-34.

Song W, Sun Q, Dong Z, Spencer DM, Núñez G, Nör JE. Antiangiogenic gene therapy: disruption of neovascular networks mediated by inducible caspase-9 delivered with a transcriptionally targeted adenoviral vector. *Gene Ther.* 2005;12(4):320-9.

Srisuwan T, Tilkorn DJ, Wilson JL, Morrison WA, Messer HM, Thompson EW, Abberton KM. Molecular aspects of tissue engineering in the dental field. *Periodontol 2000.* 2006;41:88-108.

Sugimachi K., Tanaka S., Taguchi K., Aishima S., Shimada M. and Tsuneyoshi M. Angiopoietin switching regulates angiogenesis and progression of human hepatocellular. 2003

Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N. and Yancopoulos G.D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 2003;87:1171-1180.

Tabruyn S.P, Griffioen A.W. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;355:1-5.

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N e Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001;11(19):1553-8.

Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M. A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 2001;20(11):2768-78.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007;131(5):861-72.

- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):550-63.
- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*. 1997;67(2):111-23.
- Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am*. 2010;54(2):313-24.
- Tsukamoto Y, Fukutani S, Shin-Ike T, Kubota T, Sato S, Suzuki Y, Mori M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 1992;37(12):1045-55.
- Turksen K, Aubin JE. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *J Cell Biol*. 1991;114(2):373-84.
- Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *Dent*. 2000;28(2):77-92.
- Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res*. 2004;38(3):314-20.
- Väkevä L, Mackie E, Kantomaa T, Thesleff I. Comparison of the distribution patterns of tenascin and alkaline phosphatase in developing teeth, cartilage, and bone of rats and mice. *Anat Rec*. 1990; 228(1):69-76.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60(2):203-12.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*. 1996;88(9):3424-31.
- Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol*. 2010;20(12):715-22.
- Wallez Y., Vilgrain I. and Huber P. Angiogenesis: the VE- cadherin switch. *Trends Cardiovasc. Med*. 2006;16:55-59.
- Wang FM, Qiu K, Hu T, Wan CX, Zhou XD, Gutmann JL. Biodegradable porous calcium polyphosphate scaffolds for the three-dimensional culture of dental pulp cells. *Int Endod J*. 2006;39(6):477-83.
- Wang L, Dutta SK, Kojima T, Xu X, Khosravi-Far R, Ekker SC, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS*

ONE. 2007;2(11):e1161.

Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2010;36:56-63.

Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, Liu SY, Chen L, Ding Y, Xuan K. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1231-40.

Watt SM, Gschmeissner SE, Bates PA. PECAM-1: its expression and function as a cell adhesion molecule on hemopoietic and endothelial cells. *Leuk Lymphoma.* 1995;17(3-4):229-44.

Wenger A, Kowalewski N, Stahl A, Mehlhorn AT, Schmal H, Stark GB, Finkenzeller G. Development and characterization of a spheroidal coculture model of endothelial cells and fibroblasts for improving angiogenesis in tissue engineering. *Cells Tissues Organs.* 2005;181(2):80-8.

Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature.* 1997;385(6619):810-3.

Witzenbichler B., Maisonpierre P.C., Jones P., Yancopoulos G.D. and Isner J.M. Chemotactic Properties of Angiopoietin-1 and -2, Ligands for the Endothelial-specific Receptor Tyrosine Kinase Tie2. *J. Biol. Chem.* 1998;273:18514-18521

Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem.* 2001;276(27):25520-31.

Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev.* 1994;15(4):439-61.

Wong A.L., Haroon Z.A., Werner S., Dewhirst M.W., Greenberg C.S. and Peters K.G. Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. *Circ. Res.* 1997;81:567-574.

Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Gräber S, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation.* 2007;75(1):12-23.

Wu X, Rabkin-Aikawa E, Guleserian KJ, Perry TC, Masuda Y, Sutherland WH, Schoen FJ, Mayer JE, Bischoff J. Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287(2):H480-7.

Xu J, Liu X, Jiang Y, Chu L, Hao H, Liua Z, Verfaillie C, Zweier J, Gupta K, Liu Z. MAPK/ERK signalling mediates VEGF-induced bone marrow stem cell differentiation into endothelial cell. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6A):2395-406.

Yamada Y, Oike Y, Ogawa H, Ito Y, Fujisawa H, Suda T, Takakura N. Neuropilin-1 on hematopoietic cells as a source of vascular development. *Blood.* 2003;101(5):1801-9.

Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, Teixeira FB, Yamauchi M. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2011;37(3):390-7.

Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 2000;407:242-248.

Yang W, Harris MA, Cui Y, Mishina Y, Harris SE e Gluhak-Heinrich J. Bmp2 is required for odontoblast differentiation and pulp vasculogenesis. *J Dent Res.* 2012;9:58-64.

Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2008;331(1):359-72.

Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81(10):695-700.

Yu J, Wang Y, Deng Z, Tang L, Li Y, Shi J, Jin Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell.* 2007;99(8):465-74.

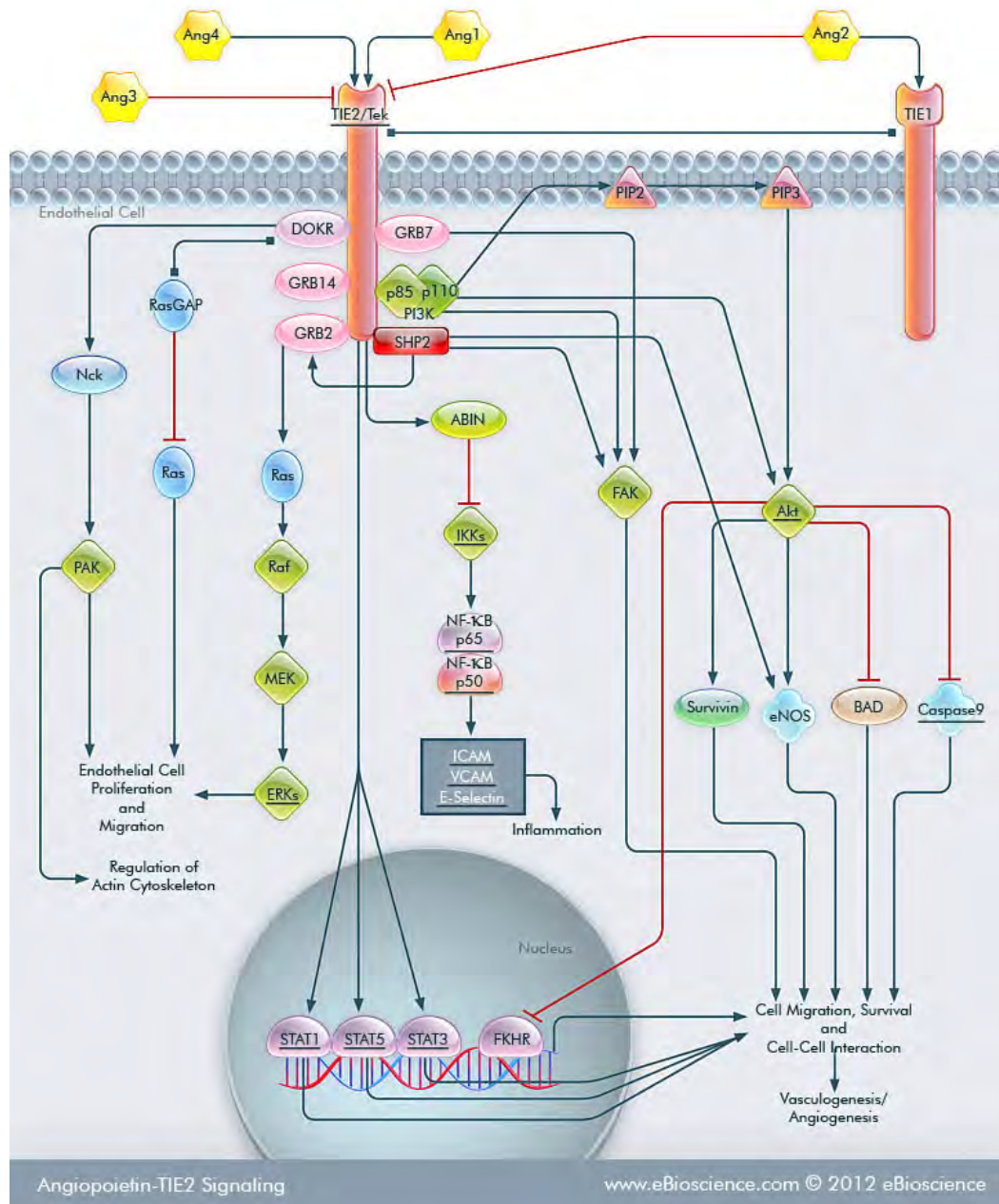
Zhang W, Frank Walboomers X, van Kuppevelt TH, Daamen WF, Bian Z, Jansen JA. The performance of human dental pulp stem cells on different three- dimensional scaffold materials. *Biomaterials.* 2006;27(33):5658-68.

Zhang WJ, Liu W, Cui L, Cao Y. Tissue engineering of blood vessel. *J Cell Mol Med.* 2007;11(5):945-57.

Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005;15(5):301-16.

Zhang Y, Furumura M, Morita E. Distinct signaling pathways confer different vascular responses to VEGF 121 and VEGF 165. *Growth Factors.* 2008;26(3):125-31.

ANEXO 1

Diagrama das rotas de sinalização

O diagrama ilustra a rota de sinalização Ang-1/Tie2 estudada e seus destinos, as rotas AKT, ERK e STAT3.

ANEXO 2
PROTOCOLOS
CELL CULTURE

CULTURE MEDIUM

1) DPSC medium

- FBS 15% - 75ml (special for stem cells)
- Pen Strep 1% - 5,5ml
- α -MEM - 500ML

2) 293T cells culture medium

- 500 mL DMEM (high glucose 1x)
- 75 mL FBS
- 5 mL Pen Strep

3) HDMEC culture medium

- 500 mL EBM-2
- 5% FBS

4) Endothelial differentiation medium

- 500 ml EBM-2
- EGM2-MV bulletkit
- 50ng/ml rhVEGF

5) Freezing medium (use a cryovial):

- 8 mL of growth medium
- 20% of fetal bovine serum (FBS)
- 10% of dimethyl sulfoxide (DMSO)

THAWING CELLS

- Clean the hood with 70% ethanol and warm the medium inside the water bath (37°C)
- Clean the medium bottle with ethanol and keep it inside the hood.
- Remove the cryovial from the liquid nitrogen, put inside the ice box and go back to the cell culture room.
- Inside the hood, open the cryovial to relief pressure and close again.
- Put the cryovial into the water bath for 3-5 minutes.
- Clean the cryovial with 70% ethanol.
- Take a new T75 flask and put 10 mL of the medium.
- Gently take the cells with a pipette and put them in the flask.
- Gently move the flask to spread the cells on the surface.
- Label the flask properly (cell, researcher name, date and passage)
- Check the cells at the microscope
- Put the flask into the incubator 37°C with 5% CO_2
- Check cells every day and change the medium every other day.

CHANGING THE MEDIUM

- Clean the hood with 70% ethanol.
- Remove the medium and PBS (1x) from the fridge and warm it up (37°C) in the water bath.
- Clean the bottle with 70% ethanol.
- Check the flasks at the microscope.
- Inside the hood, remove the medium from the plates with a pipette.
- Put 3 mL of PBS and wash the cells
- Remove the PBS carefully
- Gently put 10 mL of new medium.
- Return the plates to the incubator (37°C and 5% [CO_2]).

SPLITTING CELLS (when 80% confluent) :

- Check cells at microscope
- Clean the hood with 70% ethanol.
- Remove the medium.
- Add 4 mL of PBS 1x into the flask and move gently to wash the cells.
- Discard the PBS.
- Put 3 mL of trypsin and return the flask in the incubator for 5 minutes to detach the cells.
- Add 4 mL of medium to neutralize and stop the reaction.
- With the same pipette, resuspend the cells (up and down).
- Transfer the sample to a falcon tube (15 mL) and centrifuge it (4°C, 800 rpm, 5 min).
- Discard the supernatant and resuspend the pellet with 6 mL of medium (up and down several times).
- Take 3 flasks and put 8 mL of medium in each + 2 mL of the resuspended cells.
- Label the flasks properly (cell type, researcher name, date and passage).
- Put the flasks inside the incubator
- Change the medium after 24 hours.

FREEZING CELLS

- Take a freezing container and fill it with 200ml of isopropanol
- Take the freezing medium out of the freezer and thaw it into the water bath
- Prepare freezing vials and label them accordingly
- Check cells at microscope
- Clean the hood with 70% ethanol.
- Remove the old medium from the flask.
- Add 4 mL of PBS 1x into the flask and move gently to wash the cells.
- Discard the PBS.
- Put 3 mL of trypsin and return the flask in the incubator for 5 minutes to detach

the cells.

- Add 4 mL of medium to neutralize and stop the reaction.
- With the same pipette, resuspend the cells (up and down).
- Transfer the sample to a falcon tube (15 mL) and centrifuge it (4°C, 800 rpm, 5 min).
- Discard the supernatant and resuspend the pellet with 3 mL of freezing medium.
- Put 1mL in each cryovial.
- Put the cryovials into the freezing container Put it in -80⁰C.
- After 24h change the cryovials to liquid nitrogen.

EXPERIMENTS

SULFOHORDAMINE B ASSAY (SRB)

1. PURPOSE: is to measure cytotoxicity of reagents on cells via SRB assay.
2. MATERIALS AND REAGENTS:

NAME	CATALOG NUMBER (STOCK CHEMICALS)	STORAGE LOCATION
50% trichloroacetic acid	Sigma T0699	Stock: 2310G Acid Cabinet 50%: 2310G fridge 2
SRB dye	Sigma S9012	2310G bench (Kelsy's bench)
1% acetic acid	Fisher A491	Stock: bellow fume hood 1%: 2310 bench (Kelsy's bench)
10mM Trizma Base	Fisher BP-152	2310G bench (Kelsy's bench)

3. PROCEDURE

Day 1

3.1 Place cells at a density of 1000-3000 cells/well in 100 μ L of media/well. After plating your cells, briefly set on a gentle shaker at room temperature for 1-2 minutes to evenly disperse cells in well. Set up plates as shown:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		T1.1	T1.2	T1.3	T1.4			C1.1	C1.2	C1.3	C1.4	
C		T2.1	T2.2	T2.3	T2.4			C2.1	C2.2	C2.3	C2.4	
D		T3.1	T3.2	T3.3	T3.4			C3.1	C3.2	C3.3	C3.4	
E		T4.1	T4.2	T4.3	T4.4			C4.1	C4.2	C4.3	C4.4	
F		T5.1	T5.2	T5.3	T5.4			C5.1	C5.2	C5.3	C5.4	
G		T6.1	T6.2	T6.3	T6.4			C6.1	C6.2	C6.3	C6.4	
H												

NOTE: T1-6 and C1-6 denote six separate treatment/control concentrations, respectively, placed in quadruplicate (always). Any number of treatment/control concentrations less than six may be used, Blue-shaded wells should be filled with 200 μ L of PBS, as well as any unused treatment/control wells. In our SRB program, on our microplate reader. rows A-H and column 1 are not read. Bear this in mind when plating cells. Set up 1 plate for each time point of interest (usually 24, 48, 72

and 96 hours), resulting in 4 identical plates. A 0 (zero) time point may be used if interested, adding a fifth plate.

3.2 Place plates in incubator at 37°C/5% CO₂ overnight to allow cell adhesion.

Day 2

3.3 Treat all plates with desired concentration of control/drug. Add treatment volume of 100µL of media on top of yesterday's media.

Note: since the 100µL treatment is being added on top of 100µL media, treatment concentrations must be doubled in calculations to achieve proper final concentrations.

3.4 Place plates in incubator at 37°C/5% CO₂

Days 3-6

3.5 Fix cells with a final concentration of 10% TCA solution

3.5.1 For cells in 200µL medium, add 50µL TCA

3.5.2 For cells in 100µL medium, add 25µL TCA

3.6 Incubate plates at 4°C for 1 hour

3.7 Wash plates 5-6 times under running tap water. Allow water to hit the edge of the plate and gradually fill up wells, rather than hitting the well directly.

3.8 Allow plates to air dry on bench or in heated chamber (37°C)

3.9 Add 100µL of 0.4% SRB solution. Incubate at room temperature for 30 minutes.

Note: plates can dry >24 hours in step 3.8 so that the dyeing of all plates can be performed at the same time.

3.10 Wash plates 4 times with 1% acetic acid to remove unbound excess dye

3.11 Allow plates to air dry on bench or in heated chamber

3.12 Add 200µL of Trizma-base to solubilize the bound dye. Incubate at room temperature for 1 hour. If possible, place the plates on a gentle shaker at this time.

3.13 Read the plates on the microplate reader at 560nm

WESTERN BLOT

1. EXTRACTING PROTEIN (on the bench)

- Label tubes and check the cold centrifuge (must be 4°C)
- Place the dishes on ice
- Aspirate media from the dishes
- Wash cells with 2mL of PBS (no sterile – keep it on ice)
- Aspirate PBS
- Add 1mL of PBS and scrap the dish with a cell scraper
- Transfer the content of the dish to a eppendorff tube (keep it on ice) – use a 1000µL pipette
- Cold spin for 1 minute at 8000 rpm 4°C
- Aspirate supernatant of the tube and keep the pellet (on ice)
- Add 30-100µL (+- 50µL) of the lysis buffer (NP40) – according to the size of the pellet
- Vortex to dilute pellet – can freeze here
- Incubate on ice for 10 minutes
- Cold spin for 10 minutes, 13000 rpm 4°C
- Collect the supernatant and transfer to a new tube (protein lysate)
- Keep in -80°C

2. MEASURING PROTEIN CONCENTRATION

- Put 800µL of DDW in a eppendorf tube
- Add 1µL of protein lysate (with 2 µL pipette)
- Add 200µL of BIORAD dye
- Shake the tube with hands
- Transfer 200µL to a 96 well-plate
- Read the protein concentration in the microplate reader (Tecan Genios filter 595)
- The result is the concentration of the protein in µg/µL

3. WESTERN BLOT

- Turn on the thermostat (95°C) to let it warm up
- Put the samples (proteins) on ice
- Prepare the samples (20-50 µg of protein each well)
- Calculate the protein lysate that will be used (protein []))
- Warm the tubes for 5 minutes (95°C)
- Vortex and centrifuge (room temperature) the tubes (1 minute/12000 rpm)

TO PREPARE THE CASSETS FOR RUNNING

- Cassetts should be inserted in the box with the taper side turned for the outside

- DON'T FORGET TO TAKE OUT THE TAPE
- The cassetts must be adapted and locked
- NEW PROTEIN RUNNING BUFFER will be used to fill the center of the box (with the cassetts placed) and USED RUNNIGN BUFFER should be used on the extern side of the box
- Samples must fill each well of the gel
- Turn on the electrophoresis device and set up to 140 v
- Just turn it off when the red line be in the end of the gel (+- 1:30-2 hours)
- Aspirate the inside buffer and keep the outside as USED BUFFER

4. TRANSFERING TO A NITROCELLULOSE MEMBRANE

- Label the membrane (target/date/gel number)
- Keep sponges, filters and membranes wet in a bowl covered with transfer buffer
- Break the cassette with a spatula and cut the gel, removing the stacking gel and the bottom part (blue lane).

TRANSFER CASSETTE

- For 2 gels: put 1 filter + 1 sponge in the middle
- To put in the cassette the set gel + membrane should be turned upside down after removing form the running cassette

Sandwich:

- 3 sponges
- 2 filters
- 1 gel
- 1 membrane
- 2 filters
- 3 sponges
- Adapt this set in the electrophoresis cube and locked
- Transfer buffer must be placed in contact with the set
- The outside of the set fill with water (DDW)
- Gel keeps in the negative, membrane in the positive
- Run at 40 v for 1 hour

BLOCKING THE MEMBRANES

- Remove the gel and cut the membrane if necessary (different antibodies)
- Put the membrane in a bowl with NON-FAT MILK 5% and incubate it for 20 minutes (shaking)

Non-Fat Milk 5%

- 20 mL TBST
- 1g non-fat milk (powder)

INCUBATING PRIMARY ANTIBODY

- Put the membranes into plastic bags
- Add 2 mL of TBST
- Add the primary antibody (2 μ L) and incubate it overnight at cold room (shaking)

INCUBATING SECOND ANTIBODY

- ON THE SHAKER –
- Remove membranes from the plastic bag
- Put membranes into proper containers with TBST
- Wash the membranes 2 times for 30 minutes each (dependent on the antibody)
- Add second antibody diluted in TBST (2 mL TBST/ 2 μ L antibody)
- Incubate for 2 hours at room temperature
- Wash the membranes 2 times with TBST (30 minutes each)
- Or wash it 3 times of 20 minutes

REVELING THE RESULTS

- Add 2 mL of each chemiluminescent product in a glass container and put the membranes to shake for 5 minutes
- Prepare the plastic film to wrap the membranes
- Put it inside the autoradiography cassette
- In the dark room, expose the film for 5-10 minutes
- Mark the left upper corner of the film
 - Put the film in the processing machine
 - If needed, can do again another film – adjust time according to the results observed in the first film
- Label films properly.

shRNA INFECTION

LB broth medium

- 25g of broth miller medium
- 1L of distilled water

GROWING BACTERIA

1. Prepare 1L of LB broth medium and put it into two 500mL bottles. Autoclave the bottles (liquid cycle). Put an aluminium foil around the lid, which should not be closed tightly.
2. When LB medium is cold, put ampicillin (100µg/mL) in one of the bottles and ampicillin (100 µg/mL) and zeocin (25µg/mL) in the other one. The media with antibiotic should be stored at 4°C.
3. A) Put 7mL of the medium with ampicillin and zeocin in 50mL falcon tubes (for shRNA)
4. Put 7mL of the medium with only ampicillin in 50mL falcon tubes (for helpers)
C) 5 tubes per each helper (pMD2 and psPAX2) and 5 tubes per each shRNA should be enough.
5. Grab the bacteria stock from -80°C or take the agar plates from 4°C
6. Wipe a forceps with ethanol 70%
7. Grab sterile pipette tip, scratch the tip into the frozen bacteria or pick up a colony from the agar plate.
8. Put the tip with the bacteria inside de 50mL falcon tube with the LB medium
9. Put the tubes inside incubator (37°C) and leave the shaking at 240rpm overnight (12-16 hours).

DNA EXTRACTION

(Wizard Plus SV Minipress DNA purification System)

1. Take out the 50mL falcon tubes from the incubator and freeze one vial for each type of bacteria in glycerin by mixing 1000µL of the bacteria from the 50mL tube and 200µL of autoclaved glycerin. Vortex vials and keep them in -80°C.
2. After the freezing step, use the Minipress DNA purification system as follows:
3. Spin down all 50mL tubes for 10 minutes at 3000rpm and 4°C
4. Pour the supernatant from the 50mL tubes to a flask with bleach and keep the pellet. Vortex the pellet.
5. Add 250µL of cell resuspension solution to each 50mL falcon tube – do not touch the bacteria and use one tip for each tube
6. Transfer its content into eppendorf tubes (1.5mL)
7. Add 10µL of alkaline proteases solution to each eppendorf tube

8. Invert the tubes 4 times
9. Add 250 μ L of cell lysis solution to each sample
10. Invert the tubes 4 times
11. Incubate for 5 minutes at room temperature
12. Add 350 μ L of neutralization solution
13. Shake the tubes with hand
14. Centrifuge the bacterial lysate for 10 minutes at 13200 rpm at room temperature
15. Insert the spin column into collection tube
16. Transfer the supernatant into spin column – take just the clearest portion and balance the volumes of each column; you can mix between the tubes from the same bacteria in order to balance
17. Centrifuge at 13200 rpm for 1 minute at room temperature
18. Discard all the content of the collection tube and reinsert the column into it
19. Add 700 μ L of wash solution with ethanol in each column
20. Centrifuge at 13200 rpm for 1 minute at room temperature
21. Discard the content from the column
22. Add 200 μ L of wash solution with ethanol in each column
23. Centrifuge at 13200 rpm for 1 minute at room temperature
24. Transfer the spin column to a sterile eppendorf tube and insert the spin column in it
25. Add 100 μ L of nuclease-free water to the spin column
26. Wait 2 minutes
27. Centrifuge at 13200 rpm for 5 minutes at room temperature
28. Discard spin column
29. Combine the tubes if you used multiples tubes for the same DNA – at the end of this step you are going to have one eppendorf tube for DNA – helper and shRNA

Measure DNA concentration in a spectrophotometer as follows:

- a) add 99 μ L of nuclease-free water in one eppendorf tube for each DNA that should be measured
- b) add 1 μ L of the DNA in the tubes with DDW
- c) add 100 μ L of DDW in a separate tube as control
- d) at the spectrophotometer screen choose NUCLEIC ACID
- e) fill the spots with the contents of the tubes prepared before. The upper spot is the BLANK = control (DDW)
- f) select BLANK and READ SAMPLES
- g) ask to print the results
- h) at the printed sheet look at the 260nm column and multiply every result by 5 to get the concentration of DNA (μ g/ μ L) i.e sh control $abs_{260} = 0.1138$, so

$0.1138 \times 5 = 0,569$. Then, the DNA concentration we have for shRNA control is 0,569 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

- i) store DNA at -20°C

TRANSIENT TRANSFECTION OF LENTIVIRUS

Day before:

- seed 3×10^6 293T cells to 10mL dishes with 10mL of MEM α medium (10% FBS; AA; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of plasmocin)

Day 3

- Put the DNA tubes into ice to allow them to thaw
- Remove medium from the 293T cells and add 6mL of DMEM
- Prepare the transfection cocktail (calcium phosphate method) in a 2mL tube

TRANSFECTION COCKTAIL

- Mix all the reagents at this order:
 - 1) DNase, RNase free water
 - 2) DNA
 - 3) CaCl_2
 - 4) HBSS
 - a. DNase, RNase free water = 876 μL - plasmid DNA (shRNA+psPAX2+pMD2G)
 - b. Plasmid DNA (shRNA+psPAX2+pMD2G)
 - c. 2M CaCl_2 = 124 μL
 - d. 2x HBS = 1mL
 - 5) DNA preparation
 - a. shRNA = 21 μL = 21/[DNA]
 - b. pMD2G = 10.5 μL /[DNA]
 - c. psPAX2 = 21 μL /[DNA]
 - 6) Incubate the transfection cocktail at room temperature for 20 minutes
 - 7) Add the cocktail to cells very carefully (drop by drop, in order to avoid detachment) and incubate the for 6-8 hours)
 - 8) Change medium (add 10-12mL of DMEM with 10% FBS) and leave overnight
 - **DO NOT WASH WITH PBS BEFORE REEFED**
 - **DO NOT APSIRATE OLD MEDIA, TAKE IT OFF WITH PIPPETES AND THEN CLEAN THEM WITH BLEACH BEFORE DISCARD**

Day 4

- Change medium (add 10-12mL of DMEM with 10% FBS) and leave overnight

Day 5

- Use gloves, mask and disposable labcoat
- With a glass pipette collect the lentivirus supernatant and put it in a 15mL falcon tube
- Centrifuge for 5 minutes 3000 rpm 4°C (48 hours after infection)
- Keep the supernatant at -80°C

Day 6

- Use gloves, mask and disposable labcoat
- With a glass pipette collect the slentivirus supernatant and put it in a 15mL falcon tube
- Centrifuge for 5 minutes 3000 rpm 4°C (72 hours after transfection)
- Keep the supernatant at -80°C
- Discard the 293T cells
- Seed T75 flasks with the cells to be infected to get a 70% to 90% confluency in the next day

Day 7**INFECTION CELLS WITH THE LENTIVIRUS SUPERNATANT**

- Put the lentivirus supernatant on ice to thaw
- Prepare the infection cocktail
 - Lentivirus supernatant = 2mL
 - Polybrene 4ng/mL (1μ:1mL)
 - Medium to final volume of 8mL (6mL for 75 flaks or 25mL for 25 flasks)

COCKTAIL (for each flask)

- 6mL medium (MEM α)
- 2mL lentivirus supernatant
- 8μL polybrene

OR

- 3ml medium
- 3ml supernatant
- 6μL polybrene

- Remove medium from the flasks and add the infection cocktail

- After 4-6 hours add another 6 or 8mL of infection cocktail and leave overnight
- Add another round of infection cocktail for 4 hours
- Remove medium, add fresh medium and leave overnight
- Check the gene expression (fluorescence first, western blot when you have enough cells)
- Begin selection cells by using medium with PURAMYCIN (1 μ g/mL) for at least 1 week.

pvPACK VECTOR SYSTEM TRANSDUCTION

Transient infection of retrovirus to 293T cells

1. Split 1×10^6 cells of 293T to 6 cm dishes – overnight culture
2. Just prior to transfection, remove medium and add 3 mL of 10% FBS-DMEM containing 25 $\mu\text{M}/\text{mL}$ chloroquine (13 mL medium + 13 μL chloroquine)
3. Prepare the transfection cocktail (calcium phosphate method)

○ DDW + DNA 219 μL	3 μg pvpack-GP
○ 2M CaCl_2 31 μL	3 μg pvpack-VSV-G
○ 2xHBS 250 μL	3 μg PFB-Neo-LacZ
- a) Incubate for 20 min
- b) Add the mixture to cells – 37°C 6-8 hours
- c) Change medium and add 3 mL of 10% FBS-DMEM – overnight culture
- d) Remove medium; add 3 mL of 10% FBS-DMEM containing 10 mM of sodium butyrate – 12-14 hours culture
- e) Change medium; add 3 mL of 10% FBS-DMEM – overnight culture (14-16 hours) – the transfected cells should be close to 100% confluent
- f) Harvest retroviral supernatant – 48 hours following transfection
-- filter the supernatant through a 0.4 μm filter or centrifuge it 5 min at 1000 rpm 4°C (store at -80°C)

Infection of adherent cells with retroviral supernatant

1. Split 3-5 $\times 10^5$ cells of HDMEC to 10cm dishes – overnight culture
2. Prepare a 3 mL infection cocktail
 - Retroviral supernatant < 1.5mL
 - 4 mg/mL polybrene
 - EGM to final volume of 3mL
3. Remove medium, add the infection cocktail – 3-4 hours
4. Remove medium, add another 3 mL of infection cocktail – 3-4 hours
5. Add 7 mL EGM to the dishes, incubate for 36-48 hours
6. Drug selection: G418 can be used 24 post infection
G418 50 mg/mL – should use 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ = 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$
7. Assay the cells for reporter gene expression

RNA extraction using TRIZOL (from tissues)

- Put 1mL of TRIZOL (-20°C) in an eppendorf
- Remove scaffold from tooth slice and out in trizol
- Vortex
- Add 200µL of chloroform
- Shake with hand
- Incubate at room temperature for 5 minutes
- Vortex
- Spin at 4°C/13000 rmp/15 minutes
- Take the clearest portion of the eppendorf and transfer to a new one (discard the rest of the content)
- Add 500µL of isopropanol
- Mix with hands and incubate at room temperature for 10 minutes
- (STEP - PRECIPITATE)
- Spin at 4°C/13000 rpm/10 minutes
- Aspirate the supernatant and keep the pellet
- Add 500µL of 75% ethanol
- Spin at 4°C/13000 rpm/5 minutes
- Aspirate supernatant very carefully
- Add 20µL of ultra pure destiled water
- Vortex
- Keep in -20°C

TOTAL RNA ISOLATION FROM CULTURED CELLS BY TRIZOL

1. Wash cells with 1x PBS and add 1mL of Trizol to 6 or 10cm dishes. Lyse the cells using a cell scrubber and transfer to an eppendorf tube. Incubate at room temperature for 5 minutes.
2. Add 200 μ L de chloroform to 1mL of trizol. Shake with hand for 15 seconds (store at -80°C – optional).
3. Incubate at room temperature for 2-3 minutes
4. Spin down for 15 minutes at 12.000G, 2-8°C
5. Transfer the aqueous phase to a new tube (using a pipette).
6. Add 500 μ L of Isopropyl alcohol per 1mL of trizol (Zhang's bench). Incubate at room temperature for 10 minutes
7. Spin down for 10 minutes at 12.000G, 2-8°C
8. Remove the supernatant, wash RNA pellet with 75% ethanol
 - 1mL of 75% ethanol per 1mL trizol
9. Cold spin for 5 minutes at 7.500G
10. Dry the RNA pellet at room temperature (let the lip open – don't let it dry completely)
11. Dissolve RNA in DDW
12. Store at -80°C

NOTE: calculation of RNA concentration

- $\mu\text{g}/\mu\text{L (RNA)} = 0.\text{D260} \times 40 \times \text{dilution}/1000$

First strand cDNA synthesis using Oligo(dT)

1. RNA: 50ng to 5 μ g of total RNA or 50-500ng mRNA, Oligo(dT) 0.5 μ g/ μ L
2. RNA primer mixture

Samples	RNA (1 μ g)	10mM dNTP	Oligo(dT)	DDW	Total
Sam-1	1	1	1	7	10
Sam-2	1	1	1	7	10
Sam-3	1	1	1	7	10

3. Water bath: 65°C for 5 minutes – 2-4 minutes on ice
4. 2X reaction MIX

Components	1X Rx MIX (μ L)	10x Rx MIX (μ L)
10x RT Buffer	2	20
25nM Mgl2	4	40
0.1M DTT	2	20
RNase Out (40u/ul)	1	10
Total	9	90

NOTE: Add 1 μ L of DDW (additional) for each reaction to the mixture

5. Add 9 μ L of the 2x reaction MIX to the RNA primer mixture. Brief spin
6. Water bath – 42°C – 2 minutes
7. Add 1 μ L of SUPERSCRIPT II RT to each tube. Water bath – 42°C for 50 minutes
8. Terminate the reaction at 70°C for 15 minutes. Chill on ice.
9. Add 1 μ L of RNase H to each tube – 37°C for 20 minutes
10. Brief spin. Store it in -20°C.

PCR

1. cDNA: 1 to 10 dilution – 20ng to 1 μ g of plasmid DNA
2. PCR mixture

Components	Volume (μ L)
DDW	38.6
cDNA	1
10mM dNTP	1
10nM sense (primer)	1
10uM antisense (primer)	1
10x PCR buffer	5
50mM MgCl ₂	2
Taq DNA polymerase (5unit/ μ l)	0.4
Total	50

NOTE: add 2 μ L to each mixture (additional)

Add the cDNA last.

3. PCR program (35 cycles)
 - 94°C for 2 minutes
 - Denaturation: 94°C for 30 seconds
 - Annealing: 55°C for 30 seconds
 - Extension: 72°C for 45 seconds
4. 72°C for 10 minutes
5. 4°C hold
6. Run 10 μ L of sample on 1.5% agarose gel.
 - Random hexamers: most nonspecific priming method.
 - Oligo(dT): more specific priming method, hybridize to 3'poly(A) RNA tails.
 - Gene-specific primer: most specific priming method for the sequence of interest gene.
 - IN VIVO studies: should do **60 cycles**.

PCR ELETROPHORESIS

AGAROSE GEL

- 80mL OF 1X TAE Buffer
- 1.2g of agarose
- Microwave for 2 minutes (stopping to mix after 1 minute)
- Add 4 μ L of Ethidium Bromide and shake with hand. Put the mixture on a PCR electrophoresis container (can use 15 or 20 well comb)

LOADING THE GEL

Components	Volume (μ L)
6x DNA loading buffer	10
1kb plus DNA ladder 0.1	4
Sample	10
1kb plus DNA ladder 0.1	4

- Run for 50 minutes 80v

NOTE: for GAPDH you can use half cDNA (=5 μ L)

IN VIVO EXPERIMENT

Transport Medium for collecting tooth

- 500mL DMEN (high glucose 1x)
- 5mL Pen Strep
- 1mL amphotericin

TOOTH SLICES PREPARATION

1. Place the teeth, immediately after extraction, in 50mL falcon tubes containing transport medium.
2. Remove the gingival tissue with a periodontal curette or other dental instrument.
3. Disinfect the teeth with 70% ethanol and gauze.
4. Fix the teeth with super glue on the proper wood cubes.
5. Cut the teeth transversally, into 1.3mm thick slices using a diamond saw in the Isomet Low Speed Saw, cooled with PBS or DDW.
6. If the pulp will be used, place the tooth slices in a 12-well plate containing 1mL of culture media per well, prior to culture.
7. If the scaffold will be made inside the slices, remove pulp tissue and place the slices in a 15mL falcon tube containing 1x PBS.
8. Place the slices on a glass surface and allow them to air dry completely.

TOOTH SCAFFOLD

1. Prepare a 5% (w/v) solution of PLLA in chloroform (1g:20mL), leave it overnight to dilute the PLLA.
2. Fill the pulp cavities with seeded NaCl (250 μ m-450 μ m).
3. Drop the PLLA solution on the NaCl and let the chloroform evaporate (24h in the hood).
4. Remove the salt by changing water for 2 days (4 times a day).
5. Keep them in PBS in the fridge or cold room.

In the hood:

- Disinfect the TSS with sequential concentrations of ethanol (100-70%) for 20 minutes each.
- Keep them in sterile PBS overnight at 4°C (or more).

AT THE IMPLANTATION DAY

1. Treat the TSS with cold sterile EDTA 10% (pH 7.2) for 1 minute.

2. Wash them 3 times with sterile PBS (10 minutes each wash).
3. Place them on a 24-well plate.
4. Spin down and resuspend cells in MEMa (10 μ L – 600.000 cells/scaffold).
5. Prepare Matrigel (1:1) using cold pipettes tips
6. Mixture cells and matrigel (10 μ L each)
7. Seed the scaffolds with the mixture
8. Place in incubator for at least 30 minutes
9. Place on ice until surgery.

TOOTH SLICE RETRIVAL

1. Prepare 15mL falcon tubes according to the number of samples
2. Label them properly
3. Put tubes on ice
4. Put 10mL of fixative solution in each tube
5. Retrieve the samples according to procedures for mice handling
6. Put each sample in the proper container and keep fixing for 24 hours in the cold room.
7. Prepare new tubes, labeling them properly, and fill them with 10mL of Decalcifier II
8. Transfer each sample from the fixative solution to the Decalcifier II
9. Place the tubes on the tube rotator
10. Keep them rotating for 24 hours at room temperature.

IMUNOHISTOCHEMISTRY

DAY 1

- Incubate the glass slides in a proper glass container with handles at 60°C for 20 -30 minutes to allow the paraffin to melt

- Wash samples as follows:

- a. xylene I (2 minutes)
- b. xylene II (2 minutes)
- c. ethanol 100% I (just wash)
- d. ethanol 100% II (2 minutes)
- e. ethanol 95% (2 minutes)
- f. ethanol 75% (2 minutes)
- g. wash with D.I water until be clear
 - Put the slides in a vertical glass tube with PBS
 - Dry samples with paper towel
 - Mark samples with a pen (immedge pen)
 - Place the slides back in the glass tube with PBS and dry again
 - Place the slides in a box with wet paper
 - Cover the samples with trypsin and incubate for 30 minutes to 1 hour at 37C

TRYPISINE: 1 pill/1mL PBS)

- Remove trypsin, wash with PBS and dry
- Cover samples with 1xPBS + 0.1% Triton-X100 for 10-20 minutes (Zhang bench)
- Remove the Triton-X100, wash with PBS and dry
- Add 3% Hydrogen Peroxide and incubate for 10 minutes (Zhang's room fridge)
- Remove peroxide and add BACKGROUND SNIPER (MACH 3) and incubate for 10 to 15 minutes

PREPARE PRIMARY ANTIBODY according to the number of samples

- Use DAKO antibody diluent with reducing components (fridge 1) in a microtube

Factor VIII antibody

- 1:100 (n=4): 400uL of antibody diluent and 4uL of factor VIII antibody. Mix very well
- 1:300 (n=2): 120uL of antibody diluent and 60uL of 1:100 factor VIII antibody

IgG antibody

- 1:200 (n=2): 200uL of antibody diluent and 1uL of IgG
- Remove background sniper, wash slides in PBS and dry
- Add primary antibody and incubate overnight at the cold room

DAY 2

- Remove primary antibody
- Insert slides in a vertical glass tube with diluted wash buffer (1:10 dako wash buffer 10x) for 10 minutes/2x/shaker
- Dry samples
- Add second antibody (PROBE MACH 3 – fridge 1) and incubate for 20 minutes at room temperature
- Wash samples with dako wash buffer for 10 min/2x/shaker
- Add MACH 3 HRP-POLYMER and incubate at room temperature for 20 minutes
- Wash samples with dako wash buffer for 10 min/2x/shaker

PREPARE DAB SOLUTION

- 1mL of BETAZOID DAB substrate buffer (fridge 1)
- 1 drop of BETAZOID DAB chromogen
- Cover samples and check on the microscope (3 to 30 minutes)
- Stop reaction in DI water (when you can see brown in the blood vessels)
- Counterstain with hematoxylin Gill n3 (Zhang's bench) for 2 minutes
- Wash in running water until is clear
- Use vermout to glue the cover slide to the glass slides (use glass pipete)

LacZ staining (using β Gal Staining Kit – Invitrogen/Life technologies – cat. no K1405-01)

The following procedure is for staining **one 60mm plate**:

1. Remove the growth medium from the transfected cells and rinse the plate once with 2.5mL 1X PBS.
2. Fix the cells with 3mL 1X Fixative Solution (or 10% cold formalin) for 10 minutes at room temperature.

While the plate is in the Fixative Solution, prepare the Staining Solution. Be sure to use **polypropylene** plastic.

To prepare the Staining Solution, combine:

- 25 μ L solution A
- 25 μ L solution B
- 25 μ L solution C
- 125 μ L 20 mg/mL X-gal in DMF
- 2.3mL 1xPBS

Methods

1. Rinse the plate **twice** with 2.5 mL 1X PBS.
2. Add 2.5mL Staining Solution to the plate. Incubate at 37°C for 0.5–2.0 hours, or longer until the cells stain blue. Rock the plates occasionally to ensure even coverage of the plate.

Note: If cell confluency is high, do not stain cells for longer than 2 hours before counting. This may result in a greater number of cells staining due to diffusion through gap-junctions. Cells may need to be stained overnight if the confluency or expression level is low. If your 37°C incubator is not humidified, seal the plate with parafilm to prevent it from drying out.

3. Check the cells under a microscope (200 \times total magnification) for the development of blue color. Count total cells and blue cells in 5–10 random fields of view and use the average to estimate transfection efficiency.
4. For long-term storage of stained plates, dispose of the Staining Solution and overlay the cells with 70% glycerol. Store at 4°C.

β -galactosidase staining with X-gal (for tissues)

Sections:

1. Remove skin quickly, cut the head in half and fix in cold 4% paraformaldehyde in 1X PBS (pH = 7.2 – 7.4, made fresh!). Fix overnight only. Any longer can compromise LacZ enzymatic activity.
2. Wash the tissues in cold 1X PBS: 3x, 30 mins to 1 hour each at 4°C .
3. Decalcify tissue at 4°C in 4.13% disodium EDTA in dH₂O, pH = 7.2.
 - Tissue is placed in biopsy bags, closed with a floater clip, and put into a beaker of EDTA being stirred in the cold room.
 - i. General rule: 10 half heads per 1 L of solution.
 - ii. Solution should be changed every other day/every few days.
 - Time of decalcification depends on age of tissue. For half heads:
 - i. Day five: 8 to 9 days
 - ii. Day six, seven, and eight: 19 to 21 days
 - iii. Day eleven: 22 to 25 days
 - iv. Day fourteen: 30 days
4. Wash decalcified tissue in cold 1X PBS: 4-5 times with one overnight wash (one of the later washes) at 4°C
5. Cryoprotect tissues: cold 15% sucrose in 1X PBS at 4°C, change to cold 30% sucrose once heads sink. Keep at 4°C, until heads sink again.
6. Embed tissues in OCT and freeze at -80°C. Cut at 8 μ m. Store slides at -80°C.
7. Staining (all steps should be carried out with slides horizontal to prevent tissue peeling):
 - Remove the slide from freezer and fix in glutaraldehyde buffer for 5 mins at RT (this step may not be necessary).
 - Wash the slides in wash buffer: 3x, 5 mins at RT.
 - Stain with X-gal for 5 hrs in the dark (silver slide tray, cover small incubator's glass door with aluminum foil) at 45°C. Make sure to humidify the slide tray and wrap the tray in plastic wrap to avoid evaporation.
 - Wash slides 1X PBS at RT
 - Counterstain with 0.1% nuclear fast red (shake stock, take an aliquot, boil, let cool, then filter with syringe) at RT

SOLUTIONS (make stock)

Glutaraldehyde fix: 0.1M HEPES

1.25 mM EGTA (ethylene glycol-bis, beta-aminoethyl ether)

2 mM MgCl₂

0.5% Glutaraldehyde (add right before using)

pH 7.3

Wash Buffer: 0.1M HEPES

2 mM MgCl₂

pH 7

X-gal Stain: 0.1M HEPES1 mM MgCl₂

5mM potassium ferrocyanide (potassium hexacyanoferrate II)

5 mM potassium ferricyanide (potassium hexacyanoferrate III),

2% Triton X-100

1 mg/ml X-gal powder (add right before using)

Stir until dissolved (can add a little heat, but do not exceed 45°C)

pH 8.0, then filter with syringe***Whole mount:***

Whole mount staining is essentially the same as staining on sections.

1. Sacrifice mice by overdosing them via isoflurane inhalation.
2. Remove all of the skin, including skin from the toes and tail. Be sure to remove the tongue and a lot of the tissue surrounding the mouth. Periodically as you are doing this, make sure to immerse the mouse in the fixative (same fix as above).
3. Remove the internal organs by making a small slit in the peritoneum. Use fine forceps to gently remove organs. Take care in removing the intestines – we do not want these because the floras within them result in a false positive. Put the remaining organs in a separate tube of fixative.
4. Once the above is done, place the entire mouse in a 50 mL tube of fixative and rotate at 4°C overnight.
5. Next morning, wash as described above.
6. After washing, it is ready for staining. Make the solution the same as described above and immerse the mouse in it (incubation conditions are identical to the conditions described above).
7. Wash mouse and organs and image under dissecting scope.