

CIMARA FORTES FERREIRA

ORIGENS DA VASCULARIZAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA – ESTUDO *IN VIVO*

Florianópolis-SC
Novembro, 2006

CIMARA FORTES FERREIRA

ORIGENS DA VASCULARIZAÇÃO DA POLPA DENTÁRIA – ESTUDO *IN VIVO*

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutora em Odontologia - Área de Concentração em Implantodontia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Co-orientador: Prof. Dr. Paul T. Sharpe

Florianópolis - SC
Novembro, 2006

CIMARA FORTES FERREIRA

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de “Doutor em Odontologia”, área de concentração Implantodontia, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 9 de Novembro de 2006.

Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador

Profa. Dra. Maria José de Carvalho Rocha
Membro

Prof. Dra. Andrea Gonçalves Trentin
Membro

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Membro

Profa. Dra. Lourdes Maria de Araújo Quaresma
Membro

Dedico este trabalho:

À minha mãe, quem me guiou na busca constante da sabedoria, ensinando-me o valor da persistência, integridade e justiça.

Ao meu pai que mesmo distante sempre esteve presente no coração.

À minha irmã Cláudia, por ser um exemplo constante de dedicação.

Aos meus mestres que abriram as portas para a minha carreira acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao professor co-orientador **Dr. Paul T. Sharpe**, pela sabedoria e prontidão em me guiar com paciência e dedicação. A ele agradeço essa grande oportunidade e experiência obtida durante o intenso trabalho realizado no curto mas memorável estágio de doutorado.

Ao professor **Ricardo de Souza Magini**, pela oportunidade de poder ingressar no curso de mestrado e doutorado e pelo constante incentivo e apoio.

Ao professor **Antônio Carlos Cardoso**, pelo exemplo de autenticidade, didática e sabedoria que transcende os horizontes convencionais, mostrando como ser professor.

Ao assistente científico **Christopher Healey**, a quem sou extremamente grata pela atenção e prontidão em me guiar durante minha adaptação aos laboratórios do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial da *King's College London*.

À grande amiga, pesquisadora visitante, **Fernanda de Lucca**, pelos ensinamentos obtidos e enorme atenção dada durante a padronização da metodologia da parte experimental deste trabalho.

À **Rachel Sartaj**, pelo coleguismo, amizade e bom humor que transcenderam as portas do laboratório.

Aos colegas de trabalho, **Amanda Yen, Andréa Mantesso, Atsushi Ohazama, Isabelle Miletich, Ivan Diakonov, Kim Haworth, Jim Blackburn, John Yu, Jo-Maree Courtney, Sabrina Pacheco, Sonie Modino e Umbreen Rana**, pela convivência e coleguismo durante o estágio de doutorado.

Ao **Mathew Bradmann**, veterinário do Departamento de Desenvolvimento Craniofacial da *King's College London*, pela realização das cirurgias de transplante.

Aos colegas de curso **Wilson Andriani Junior, Dircilene Colares de Souza, Gustavo dos Santos Coura e Hiron Andreazza da Cunha**, pela amizade e coleguismo durante o curso de doutorado.

Aos colegas da pós-graduação, **Aline Franco Siqueira, César Augusto Magalhães Benfatti, Cleide Gisele Ribeiro, Edival Barreto de Magalhães, Maria Angélica Rehd Araújo, Raul Gomes Junior, Leonardo Vieira Bez e Izabelle Schneider Goulart** pela amizade e coleguismo durante o curso de doutorado.

Ao **Kenneth Faulkner Weaver**, pelo constante incentivo, pela companhia, pelos ensinamentos, pela paciência, pela compreensão e pelo carinho cedidos durante estes anos.

FERREIRA, Cimara Fortes. **Origens da vascularização da polpa dentária: estudo *in vivo***. 2006, 126f. Tese (Doutorado em Odontologia, área de concentração Implantodontia) – Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Na tentativa de estudar a formação de vasos sanguíneos durante a formação dentária, examinou-se a expressão de marcadores endoteliais. Objetivando rastrear as origens dos vasos sanguíneos da polpa dentária, modelos de animais transgênicos foram utilizados. Mandíbulas primordiais derivadas de embriões de camundongos selvagens e *Green fluorescent protein*, respectivamente, de 10.5 e 13.5 dias embrionários, foram transplantadas em cápsulas renais de camundongos adultos *Rosa26*. Duas semanas após, análises histológicas, de imunofluorescência e de hibridização radioativa *in situ*, foram conduzidas nos dentes desenvolvidos. O transplante de mandíbulas primordiais de 10.5 dias embrionários resultou na formação de vascularização quimérica, derivada do hospedeiro e do doador. O transplante de mandíbulas primordiais de 13.5 dias embrionários resultou em formação de dentes com vasculatura derivada apenas do doador. Apesar de, adicionalmente, existirem células não-identificadas presentes dentro da polpa dental em proximidade com os vasos sanguíneos e com a camada de odontoblastos. Concluímos que as células derivadas da circulação sanguínea podem contribuir para a angiogênese durante a formação dentária inicial, um fenômeno no qual ocorre em órgãos derivados da somatopleura. Adicionalmente, células circulantes podem contribuir para a formação de outros tipos celulares dentro da polpa dental que ainda não foram identificados.

Palavras-chave: Desenvolvimento dentário, vascularização, Hibridização radioativa *in situ*, imunofluorescência.

FERREIRA, Cimara Fortes. **Origins of the dental pulp vasculature: an *in vivo* study**. 2006, 126p. Thesis (Doctor in Dentistry, option Implant Dentistry) – Graduate program in Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis.

ABSTRACT

The formation of the dental pulp vasculature is not completely understood. To study blood vessel formation during tooth development, we examined the expression of progenitor endothelial markers. In order to trace the origins of the tooth blood vessels, transgenic mice models were used. Mandible primordia, derived from 10.5 and 13.5 day embryos from wild type and green-fluorescent protein mice, respectively, were transplanted into kidney capsules of adult male Rosa26 mice. Two weeks later, histological analysis, immunofluorescence and radioactive *in situ* hybridization were conducted on the resulting teeth. Transplanting 10.5 day embryo mandibles resulted in teeth with chimeric vasculature derived from both, host and donor cells. Transplanting 13.5 day embryo mandibles resulted into teeth with donor-derived vasculature only. Although, in addition, there were unidentified cells present inside the dental pulp in proximity to the blood vessels and close to the odontoblast layer. We conclude that cells derived from the circulatory system can contribute to angiogenesis during early tooth development, a phenomenon which occurs in organs of somatopleural origin. Additionally, circulating cells can contribute to other cell types inside the dental pulp that are yet to be identified.

Key-words: Tooth development, vasculature, radioactive *in situ* hybridization, immunofluorescence.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	9
ARTIGO 1	13
MANUSCRIPT 1	44
ARTIGO 2	72
MANUSCRIPT 2	95
APÊNDICE 1 – Glossário	116
APÊNDICE 2 – Recomendação do fabricante para uso do kit Perkin/Elmer utilizado nos experimentos de imunofluorescência	118
APÊNDICE 3 – Esquema da metodologia aplicada para o experimento realizado	120
APÊNDICE 4 – Controles positivos da imunomarcação	121
APÊNDICE 5 – Relação de trabalhos publicados e enviados para publicação durante o doutorado	123

INTRODUÇÃO

As células tronco de adultos (CTA) têm recebido grande atenção nos últimos anos devido às surpreendentes descobertas referentes à sua capacidade de diferenciação em diversos tipos de tecidos.

Existem duas fontes mais estudadas de células tronco de adultos: o cordão umbilical e a medula óssea. As células do cordão umbilical podem ser coletadas apenas uma vez na vida e é necessário cirurgia para coleta de células da medula óssea. Portanto, existe necessidade de busca de fontes mais acessíveis para coleta de células tronco de adultos que potencialmente possam ser utilizadas na medicina regeneradora. As CTA já foram encontradas em vários órgãos e tecidos. Acredita-se que elas possam alojar em áreas específicas de tecidos e permanecerem quiescentes até serem ativadas por lesões ou doenças. As CTA foram encontradas no cérebro (QUINONES-HINOJOSA et al., 2006; SANAI et al., 2005), no sangue periférico (ROCHEFORT et al., 2006; XING et al., 2006; KASSIS et al., 2006; MANSILLA et al., 2006), nos vasos sanguíneos (DORE-DUFFY et al., 2006; BRACHVOGEL et al. 2005), na musculatura esquelética (MONTARRAS et al., 2005), na pele (McKENZIE et al., 2006; FERNANDES et al., 2004, 2006), no fígado (ROSKAMS et al., 2006; SCHMELZER et al., 2006), na córnea (VASCOTTO & GRIFFITH, 2006), no trato respiratório (BURNHAM & MOSS, 2006; YEN et al., 2006), no coração (URBANEK et al., 2006; LERI et al., 2005; NADAL-GINARD et al, 2005), no ligamento periodontal (SEO et al., 2004) e na polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000; MIURA et al., 2003; LAINO et al., 2006; ALMUSHAYT et al., 2006; NAKASHIMA & AKAMINE, 2005; PIERDOMENICO et al., 2005; HE, TAN, ZHANG, 2005).

Células da polpa dentária, tipo mesenquimais, foram isoladas dos terceiros molares, expandidas *in vitro*, e re-implantadas em camundongos *nude* (GRONTHOS et al., 2002). Estas células tronco da polpa dentária se diferenciaram em tecido semelhante a polpa dentária, tecido tipo neural e adipócitos. O mesmo grupo de estudos mostrou que dentes decíduos exfoliados são uma fonte exclusiva de células clonogênicas altamente proliferativas capazes de se diferenciar em células neurais, adipócitos e osteoblastos *in vivo*. Estas células derivadas da dentição decídua, quando transplantadas em camundongos *nude* produzem dentina, osso e expressam marcadores neurais (MIURA et al., 2003). Os autores sugeriram que colônias de células unitárias derivadas da polpa dentária de dentes, decíduos e permanentes, apresentam propriedade das células tronco. Adicionalmente, este grupo de pesquisas estudou os potenciais das células tronco do ligamento periodontal humano obtidas de terceiros molares. Estas células foram isoladas e expandidas após cultivo de colônias de células unitárias e transplantadas em camundongos *nude*. Quando transplantadas *in vivo*, formaram estrutura semelhante a cemento e contribuíram para o reparo de tecido periodontal. *In vitro*, as células tronco do ligamento periodontal se diferenciaram em células semelhantes a cementoblastos, adipócitos e células formadoras de colágeno (SEO et al., 2004). Estes estudos mostram que existem células tronco que podem ser coletadas de fontes alternativas e que todos os potenciais das células tronco da polpa dentária ainda estão por serem definidos.

Na infância, até 20 dentes decíduos são exfoliados naturalmente, os quais são possíveis fontes para coleta de células tronco. Durante a vida adulta, existem outras oportunidades de coleta de células tronco: extrações indicadas pelo ortodontista.

As células da polpa dentária são derivadas da crista neural (MILETICH, SHARPE; 2004), desta forma, acredita-se que as células tronco da polpa dentária também possam ser derivadas da crista neural. No entanto, a polpa dentária é altamente vascularizada e as células

tronco da polpa dentária potencialmente poderiam ser uma mistura de células derivadas de diferentes fontes. Células derivadas da crista neural mostram a capacidade de se diferenciar em tipos celulares das três camadas germinativas (Le DOUARIN et al., 2003). Sabendo as origens das células tronco, pode-se saber a sua futura aplicação terapêutica em procedimentos regenerativos.

Com o intuito de estudar o desenvolvimento dentário de mamíferos, camundongos têm sido o principal organismo utilizado devido à sua viabilidade, tanto para a manipulação genética quanto embriológica. Estudos mostram que o desenvolvimento dentário ocorre por interações entre o epitélio e as células mesênquimais subjacentes (THESLEFF *et al.*, 1995; THESLEFF, SHARPE, 1997) presentes no primeiro arco braquial. O epitélio oral fornece sinais que guiam o início da formação dentária em torno do décimo dia de vida embrionária em camundongos (FERGUSON *et al.*, 2000).

A polpa dentária é um tecido metabolicamente ativo apresentando alta capacidade de regeneração (PINZON et al., 1966). Ela se origina do tecido conjuntivo primordial e é quase totalmente circundada por tecido mineralizado. Existem poucos vasos principais, que passam pelo forame apical, e que são responsáveis pela irrigação da mesma. Uma ou duas arteríolas ganham a polpa dentária por meio do forame apical e acessório(s). Quando os vasos alcançam a câmara pulpar, ocorre aumento de seu calibre e redução da espessura da musculatura de sua parede (TEN CATE, 1998). Algumas alças capilares terminais se estendem superiormente entre os odontoblastos para suprir a pré-dentina durante o processo de dentinogênese.

Durante o desenvolvimento embrionário, uma rede complexa de canais linfo-vasculares é estabelecida por um processo denominado vasculogênese embrionária (KELINMAN et al, 2005). No entanto, trabalhos mostram a possibilidade de ocorrer simultaneamente o processo de angiogênese na polpa dentária (MANZKE et al., 2005). No

entanto, a origem das células responsáveis por este processo de vascularização não são totalmente conhecidas.

As células tronco mostraram poder estar relacionadas com os micro-vasos dos órgãos em formação (LEE et al., 2004; RIEGER et al., 2005). Os pericitos são células que têm ganhado muita atenção por apresentarem certo grau de diferenciação celular. Sabe-se que o recrutamento de pericitos esta envolvido na maturação de vasos sanguíneos (HOFFMANN et al., 2005).

Na tentativa de descobrir as origens da vascularização da polpa dentária, utilizou-se o transplante de germes dentários em cápsulas renais de camundongos transgênicos, permitindo assim o desenvolvimento dos dentes e a verificação da contribuição das células do hospedeiro para o desenvolvimento dentário. Na falta de marcadores para células tronco em camundongos, o uso de animais transgênicos torna-se uma opção para a metodologia deste estudo. Neste estudo mandíbulas primordiais foram dissecadas de camundongos selvagens e GFP em 10.5 e 13.5 dias embrionários (E), respectivamente, e transplantadas em cápsulas renais de camundongos *Rosa26*. Duas semanas após, coloração *LacZ*, imunofluorescência e hibridização radioativa *in situ* foram conduzidos. O objetivo deste estudo foi verificar a contribuição de células da corrente sanguínea no desenvolvimento dentário.

Esta tese contém um artigo intitulado "Origens da vascularização da polpa dentária", um glossário para auxiliar o leitor (Apêndice 1) e uma breve revisão da literatura intitulada "Implantodontia: passado, present e futuro" (Artigo 2).

ARTIGO 1**Origens da vascularização da polpa dentária – estudo *in vivo***

Este artigo está formatado conforme as normas da elaboração de artigos da *Journal of Dental Research*.

RESUMO

Objetivando detectar as origens dos vasos sanguíneos da polpa dentária, modelos de animais transgênicos foram utilizados. Mandíbulas primordiais derivadas de embriões de camundongos selvagens e camundongos *Green fluorescent protein*, respectivamente, de 10.5 e 13.5 dias embrionários, foram transplantadas em cápsulas renais de camundongos *Rosa26* adultos machos. Duas semanas após, análises histológicas, de imunofluorescência e de hibridização radioativa *in situ*, foram conduzidas nos dentes desenvolvidos. O transplante de mandíbulas primordiais de 10.5 dias embrionários resultou na formação de vasos químéricos derivados do hospedeiro e do doador. O transplante de mandíbulas primordiais de 13.5 dias embrionários gerou dentes com vasos sanguíneos derivados apenas do doador. Adicionalmente, houve presença de células dentro da polpa dentária em proximidade com os vasos sanguíneos e com a camada de odontoblastos as quais não foram identificadas. Concluiu-se que as células derivadas da circulação sanguínea podem contribuir para a angiogênese durante o desenvolvimento dentário inicial, fenômeno que ocorre em órgãos derivados da somatopleura. Adicionalmente, células circulantes podem contribuir para a formação de outros tipos celulares dentro da polpa dentária que ainda não foram identificadas.

Palavras-chave: Desenvolvimento dentário, vascularização, coloração *LacZ*, Hibridização radioativa *in situ*, imunofluorescência.

INTRODUÇÃO

Vasos sanguíneos se formam em resposta a estímulos de fatores angiogênicos por meio de dois processos distintos: vasculogênese e angiogênese (Maye et al., 2000; Doetschman et al., 1985). A vasculogênese é o processo pelo qual células endoteliais precursoras formam novos vasos no embrião (Pardanaud et al., 1987; Péault et al., 1988; Houser et al., 1961; Feinberg e Beebe, 1983). A angiogênese é a remodelação de vasos sanguíneos existentes para formar vasos maduros (Risau e Flamme, 1995; Hertig, 1935), sendo este o mecanismo principal da neovascularização durante o reparo de lesões e inflamações pós-natal (Ferrara, 1999).

Inicialmente, a angiogênese no adulto era considerada uma característica da diferenciação terminal das células endoteliais com a capacidade de formar os tubos vasculares e recrutar células da musculatura lisa dos vasos. Estudos mais detalhados sugerem que o processo angiogênico pode envolver células progenitoras vasculares derivadas da medula óssea que possam colonizar sítios e posteriormente se diferenciar em células da musculatura lisa dos vasos (Asahara et al., 1999; Rafii et al., 2002).

A vascularização dos tecidos em desenvolvimento foi estudada em camundongos (Ambler et al., 2001) e em embriões de aves (Yamashita et al., 2000; Pudliskewski e Pardanaud, 2005) após transplante de tecidos embrionários entre diferentes espécies. Quando o tecido transplantado é derivado da esplancnopleura, estudos indicam que a vascularização pode ser completamente originada do doador (Pardanaud et al., 1989; Pudliszewski e Pardanaud, 2005). Alternativamente, quando o tecido transplantado é derivado da somatopleura, a vascularização pode ser quimérica, isto é, derivada do hospedeiro e do doador

(Ambler et al., 2001. Yamashida et al., 2000; Pardanaud et al., 1987). Pesquisadores mostraram que vasos sanguíneos quiméricos também podem ser formados após a infusão intra-cardíaca de células de camundongos em embriões de aves (Yamashita et al., 2000).

Células tronco já foram isoladas da dentição decídua e pesquisadores sugeriram serem derivadas de pericitos (Miura et al., 2003). Acredita-se que os pericitos sejam derivados da crista neural (CN) (Etchevers et al., 2001). Células da CN são células pluripotentes que surgem durante a embriogênese da região dorsal do cérebro e do tubo neural. Durante o processo de desenvolvimento, elas migram da margem lateral do tubo neural para o primeiro arco braquial para auxiliar na formação dentária (Le Douarin et al., 2004). Populações de células progenitoras podem ser encontradas em vasos do coração, quando expressam marcadores para as células da CN. Estas células podem contribuir para a formação da musculatura lisa dos vasos sanguíneo (Schuldiner et al., 2000). Nos órgãos e na circulação sanguínea de humanos, células progenitoras são capazes de originar diferentes tipos celulares (Labat et al., 1991; Bringuier et al., 1992; Labat et al., 1994), incluindo células endoteliais (Boyer et al., 2000; Labat et al., 2000). Quando as células tronco circulam na corrente sanguínea de adultos, elas apresentam conformação semelhante aos monócitos (Bringuier et al., 1992). Pesquisadores classificaram estas células como células progenitoras monocitóides do ectomesênquima (Labat et al., 2000), um sistema que inclui uma sub-população de células semelhantes a monócitos as quais são células progenitoras mesenquimais e células derivados do sistema retículo-endotelial. Não é sabido se as células endoteliais pertencem a este sistema. No entanto, as células semelhantes ao sarcoma de *Kaposi*, as quais acredita-se serem derivadas de células progenitoras monocitóides do ectomesênquima (Labat et al., 2000), expressam marcadores endoteliais (Browning et al., 1994).

Vasos sanguíneos entram na cavidade pulpar dentária por meio do foramen apical. Eles então, reduzem de calibre e se ramificam para dentro da área sub-odontoblástica à medida que entram na polpa coronária. No início da formação da dentina, capilares sanguíneos são encontrados na camada sub-odontoblástica, abaixo da camada odontoblástica neoformada, para auxiliar na mineralização da dentina (Ten Cate, 1998). A polpa dentária é composta por fibroblastos, macrófagos, linfócitos, células dendríticas, vasos sanguíneos e linfáticos, matriz pulpar, pericitos e por células ecto-mesenquimais indiferenciadas. As células tronco da polpa dentária podem, em teoria, ser originado qualquer uma destas células. Uma investigação mostrou que a maior parte das células tronco da polpa dentária expressa marcadores para pericitos (Shi & Gronthos, 2003). Os pericitos são células que circundam os vasos sanguíneos e que apresentam função desconhecida. Os pericitos apresentam capacidade de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (Le Douarin et al., 2004). O extenso suprimento sanguíneo da polpa dentária, e a sugerida origem das células tronco da polpa dentária sendo de pericitos, torna o desenvolvimento dos vasos da polpa dentária um fator importante. Existem evidências suficientes da presença de células progenitoras endoteliais de adulto circulando na corrente sanguínea (Labat et al., 1991; Zhao et al., 2003; Orlic et al., 2001; Lev et al., 2005; Werner et al., 2005), as quais, durante o desenvolvimento têm mostrado se co-localizarem com células tronco (Cleaver & Melton, 2003; Lee et al., 2004; Rieger et al., 2005). No entanto, as origens das células circulantes que contribuem para a formação de vasos sanguíneos da cavidade pulpar do dente não são inteiramente conhecidas.

Experimentos utilizando a metodologia de transplante permitem detectar células do hospedeiro dentro do dente na fase de desenvolvimento (Cho et al., 2003; Carlile et al., 1998). O alvo deste estudo foi verificar as origens da vascularização dentária, para isso, mandíbulas primordiais de camundongos selvagens e de camundongos *green fluorescent protein* (GFP)

foram dissecadas de embriões (E) com 10.5 e 13.5 dias de vida, respectivamente, e transplantadas em cápsulas renais de camundongos *Rosa26* onde ficaram por 2 semanas. Este modelo de estudo permite que células derivadas do hospedeiro possam ser distintas daquelas derivadas do doador. Análise histológica, coloração *LacZ*, imunofluorescência e hibridização radioativa *in situ* foram conduzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Procedimento de transplante

Todos os camundongos utilizados neste experimento (n = 12) foram mantidos no *Biological Service Unit* da *King's College London*, onde receberam cuidados por veterinários, água e alimento *ad libitum*. Camundongos *Rosa26* (n = 6) adultos machos (Friedrich and Soriano, 1991) receberam anestesia intra-peritoneal (Fentanyl/fluanisone). A antissepsia foi conduzida no pêlo do camundongo com álcool 70%, o pêlo foi raspado e foi realizada uma incisão central de 1 cm, em seguida, as cápsulas renais foram expostas. Mandíbulas primordiais de camundongos selvagens e GFP (Hadjantonakis et al, 1998) foram dissecadas de E10.5 e E13.5, respectivamente, e transplantadas em cápsulas renais de camundongos *Rosa26* adultos machos (Apêndice 3). Todas as mandíbulas primordiais foram dissecadas sob estereomicroscópio (Leica, MZFLIII, Germany).

Foram realizados 3 procedimentos cirúrgicos de transplante de mandíbulas primordiais aos 10.5 dias de vida embrionária em cápsula renal de camundongos *Rosa26*. Este procedimento resultou no desenvolvimento de 11 amostras, das quais 7 (63.63%) apresentaram desenvolvimento de dentes. No restante (n = 3, 36.37%), não houve evidências de formação dentária. Foram realizados 3 procedimentos cirúrgicos de transplante de mandíbulas primordiais aos 13.5 dias de vida embrionária em cápsula renal de camundongos *Rosa26*. Este procedimento resultou no desenvolvimento de 15 amostras, das quais 14 (93.33%) apresentaram desenvolvimento de dentes. No restante (n = 1, 6.66%), não houve evidências de formação dentária. Duas semanas após transplante, todas as amostras foram coletadas, fixadas, incluídas e crio-seccionadas para análise.

Esta pesquisa foi aprovada no Comitê de ética e as cirurgias de transplante foram conduzidas por um veterinário licenciado (Animals Act 1986) nas dependências do BSU. Todas as cirurgias foram conduzidas conforme *Animals Act 1986*.

Coloração LacZ

Após a dissecação, as células foram fixadas com 1% de paraformaldeído (PFA) e glutaldeído a 4°C por 1 hora. Em seguida as amostras foram descalcificadas com EDTA 0.5M , pH 8, a 4°C, por 3 dias. As amostras foram embebidas em gelatina (*G2500-Sigma* tipo A) por 1 a 4 horas. Depois, foram montadas em recipiente de plástico e deixadas à temperatura ambiente até geleificar. Elas foram, então, crioseccionadas (Cryostat BRIGHT OTF Cryostat, Huntington, UK) em 7 µm e secções seriadas foram colocadas em lâminas *Super Frost* consecutivas. Elas foram enxaguadas em PBS e coradas com solução de *x-gal* (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) por 4 horas conforme protocolo pré-estabelecido (Ma et al., 2002).

Contagem celular

Todas as células *LacZ* positivas foram contadas em cada secção de 7 µm do dente desenvolvido. O dente desenvolvido foi dividido em: camada de odontoblastos (OL) e centro (C). A região OL compreendeu a camada de odontoblastos, a camada sub-odontoblástica e a camada rica em células. A espessura da camada OL foi estipulada numa circunferência de aproximadamente 80 µm, do início da dentina mineralizada até o final da zona livre de células (Fig 1). A região C compreendeu uma área circular iniciando no limite inferior da OL até o centro do dente. O número de vasos sanguíneos presentes em cada lâmina foi contado nas regiões OL e C (Gráfico II)

Imunofluorescência

Os anticorpos de coelhos incluíram o fator *Von Willebrand* (VW) (Abcam plc, Cambridge, UK); e o endoglin (Santa Cruz Biotechnology, CA, Estados Unidos) e GFP (Abcam plc,

Cambridge, UK). O anticorpo de cabra incluiu a β -galactosidase (Abcam plc, Cambridge, UK). Os anticorpos secundários incluíram o cavalo anti-cabra e o galinha anti-coelho biotinizados (Abcam plc, Cambridge, UK). O anticorpo para a proteína GFP foi utilizado para amplificar o sinal emitido pelas células do camundongo GFP. A análise de imunofluorescência foi conduzida conforme as especificações do fabricante para a fluorescência por meio da amplificação do sinal por meio da tiramida (*Perkin/Elmer TSA Plus Fluorescence Systems*, NEL # 780) (Apêndices 2 e 4). Após conduzir a imunomarcção, as lamina foram montadas em *Vectra Shield* (Vector, Burlingame, CA) contendo 0.1 ng/ μ l de DAPI (4 ,6-diamidino-2-fenilindole).

Hibridização radioativa *in situ*

A presença do gene *LacZ* foi detectada pela hibridização radioativa *in situ* utilizando as sondas de RNA marcadas com ^{35}S -UTP conforme descrito previamente (Tucker, Khamis & Sharpe, 1998). Um nucleotídeo de *LacZ* com 700-bp de plasmídeo *pBlueprint* foi digerido com *SacI* e transcrito com a polimerase T7 de RNA para a formação da sonda *antisense* (D'Souza et al., 1997).

Análise das imagens

As imagens foram obtidas pelo *ZEISS Axioskop 2 plus* (Carls Zeiss, Gottingen, Alemanha), conectado a um *AxioCam*. As imagens digitalizadas foram adquiridas por meio do *software AxioVision* (Carls Zeiss, Göttingen, Germany).

RESULTADOS

Análise da mandíbula primordial

Objetivando identificar células endoteliais no mesênquima da mandíbula, imunofluorescência foi conduzida com o anticorpo para endoglin, o qual marca células precursoras endoteliais. Secções de E10.5 mostram presença de células endoglin positivas no mesênquima da mandíbula (Fig. 2A-F). Em E13.5, o epitélio apresenta-se invaginado em direção ao mesênquima, formando a fase de botão (Fig. 3A-I), caracterizando o início da formação dentária. Em E13.5, eritrócitos embrionários são visíveis após a coloração histológica com hematoxilina-eosina (HE) (Fig. 3D e 3G-setas pretas). Secções consecutivas foram submetidas à imunofluorescência e mostraram presença de células endoglin positivas em proximidade com áreas onde eritrócitos nucleados estão presentes (Fig. 3B, C, E e F).

Transplante de mandíbula primordial E10.5 de camundongo selvagem em cápsula renal de camundongos *Rosa26*

Duas semanas após transplante de mandíbula primordial E10.5 de camundongo selvagem em cápsulas renais de camundongos *Rosa26*, conduziu-se coloração *LacZ* para análise da atividade de β -galactosidase, a qual mostrou presença de células *LacZ* positivas, derivadas do hospedeiro, na polpa dentária. As células estavam circundando os vasos sanguíneos e estavam em proximidade com a camada de odontoblastos, outras revestiam vasos sanguíneos e mostravam morfologia semelhante a fibroblastos com pequeno núcleo arredondado (Fig. 4A and B). De todas as células *LacZ* positivas contadas em todas as secções de um dente (n =

465), 75.91% (n= 353) estavam localizadas na região OL (Gráfico I) a qual compreende a camada de odontoblastos, a camada sub-odontoblástica e a zona rica em células, e 24.09% (n= 112) estavam localizadas na região C, a qual é o centro do dente. Na região OL, 30.02% (n = 106) circundava ou revestia os vasos sanguíneos, o remanescente das células *LacZ* positivas (n = 247) não foi identificado. Na região C, 5.35% (n = 6) estavam circundando ou revestindo vasos sanguíneos, o remanescente de células *LacZ* positivas (n= 106) não foi identificado (Gráfico I, Fig. 1). Os dados mostram que 35.37% (n = 112) das células *LacZ* positivas presentes dentro da polpa dentária quimérica estava circundando os vasos sanguíneos.

A camada OL apresentou 58.92% (n =307) dos vasos sanguíneos da polpa do dente quimérico (Gráfico II), e estes vasos sanguíneos apresentavam células semelhantes a fibroblastos com pequenos núcleos, e morfologia semelhante a das células endoteliais *LacZ* positivas e *LacZ* negativas. A maior parte dos vasos sanguíneos estava localizada na região OL do dente (Gráfico II), o número de células revestindo os vasos sanguíneos foi maior na região OL, quando comparado com a região C (Gráfico I).

Imunomarcação foi conduzida nas secções do dente desenvolvido por duas semanas após transplante de mandíbulas primordiais E10.5 de camundongos selvagens em cápsulas renais de camundongos *Rosa26* adultos machos. O anticorpo para o fator *Von Willebrand* (VW) foi utilizado para detectar células endoteliais progenitoras, e o anticorpo para β -galactosidase foi utilizado para detectar células do hospedeiro dentro do dente desenvolvido. Secções feitas através de um dente desenvolvido, mostraram a presença de células positivas para o fator VW, derivadas do hospedeiro e do doador (Fig. 5). A hibridização radioativa *in situ* foi conduzida nas secções consecutivas utilizando a sonda *LacZ* para identificar a presença de células do hospedeiro na polpa dentária. As secções mostraram presença de células *LacZ* positivas nas regiões de vasos sanguíneos (Fig. 6). Sabendo que a β -

galactosidase não é expressa nas células vermelhas do sangue, estes dados sugerem que as células do hospedeiro presentes revestindo ou em proximidade com os vasos sanguíneos são células endoteliais. Estes resultados corroboram com os resultados prévios do ensaio de imunofluorescência.

Transplante de mandíbula primordial E13.5 de camundongo GFP em cápsula renal de camundongos *Rosa26*

Duas semanas após o transplante de mandíbula primordial E13.5 de camundongo GFP em cápsula renal de camundongo *Rosa26* adulto macho, imunomarcagem foi conduzida. O anticorpo para GFP foi utilizado para detectar células do doador e o anticorpo para β -galactosidase foi utilizado para detectar células do hospedeiro na polpa do dente desenvolvido. Secções do dente desenvolvido mostraram presença de células do hospedeiro β -galactosidade positivas em proximidade com a camada de odontoblastos e com os vasos sanguíneos. No entanto, os vasos sanguíneos eram totalmente derivados das células do doador (Fig. 7). Apesar destas células não terem sido identificadas, elas não apresentavam morfologia de hemáceas. Em algumas instâncias, elas estavam presentes na camada de odontoblastos, quando apresentavam morfologia alongada (Fig. 7D - células imunomarcadas em vermelho).

DISCUSSÃO

Sabe-se que, durante o desenvolvimento dentário, vasos sanguíneos são desenvolvidos no folículo dentário e entram na papila dentária durante a fase de campânula (E14.5) (Ten Cate, 1998). O presente estudo verificou os estágios de desenvolvimento dentário antes da fase de campânula, em E10.5 e E13.5. Células progenitoras individuais estavam presentes no mesênquima da mandíbula primordial de camundongos selvagem. Adicionalmente, estas células positivas para endoglin, foram identificadas na região próxima às células eritróides nucleadas.

O transplante de mandíbulas primordiais de camundongos selvagens em camundongos *Rosa26* permite estudar a vascularização da polpa dentária. No presente estudo, utilizou-se o camundongo *Rosa26*, o qual expressa *LacZ* em todas os tecidos presentes na polpa dentária, com exceção das hemáceas. Este experimento corrobora com os resultados da análise de imunofluorescência e esta em concordância com a literatura (Cho et al., 2003).

Secções feitas através de molares desenvolvidos por duas semanas após transplante de mandíbulas primordiais E10.5 de camundongos selvagens em cápsula renal de camundongos *Rosa26*, revelaram presença de células endoteliais derivadas do doador e do hospedeiro. A literatura sugere que a vascularização da polpa dentária, após o transplante de germes dentários E15 de *M. musculus* em sítios ectópicos, de camundongos *M. caroli*, é quimérica (Carlile et al., 1998). No dente desenvolvido após conduzir-se o experimento de transplante de E10.5, ou seja, em fase embrionária mais recente, verificou-se histologicamente a presença de células do hospedeiro compondo vasos sanguíneos em conjunto com células do doador. Adicionalmente, a imunomarcagem permitiu identificar as células do hospedeiro como sendo de origem endotelial. Estes dados mostram que a origem dos vasos sanguíneos presentes na polpa dentária também é quimérica. No entanto, quando o experimento foi conduzindo em

uma fase embrionária mais tardia (E13.5), os vasos sanguíneos derivaram-se inteiramente das células do doador. Adicionalmente, houve presença de tipos celulares derivados do hospedeiro localizados na polpa dentária em proximidade com vasos sanguíneos e com a camada de odontoblastos que não foram identificados.

A análise histológica do dente desenvolvido após duas semanas do transplante de mandíbulas primordiais de E10.5 em cápsula renal de camundongos *Rosa26*, mostrou presença de células *LacZ* positivas frequentemente localizadas em proximidade com a camada de odontoblastos, a camada sub-odontoblástica e a zona rica em células. As células *LacZ* positivas estavam em proximidade com os vasos sanguíneos e elas apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos com pequenos núcleos. Estes dados mostram que a maior parte dos vasos sanguíneos derivados das células do hospedeiro estava mais presente perifericamente, na região OL, composta pela camada de odontoblastos, camada sub-odontoblástica e zona rica em células. Esta investigação está em concordância com um estudo semelhante quando conduziram transplante de germes dentários em sítios ectópicos, objetivando identificar a contribuição de células do hospedeiro na formação dentária. Neste estudo, os vasos sanguíneos pareceram ser derivados do doador na região central da polpa dentária e derivadas do hospedeiro perifericamente (Carlile et al., 1998).

Este estudo mostrou uma alta percentagem de vasos sanguíneos na camada sub-odontoblástica e na camada de odontoblastos. Adicionalmente, o dente quimérico mostrou que a maioria das células *LacZ* positivas, derivadas do hospedeiro, estava revestindo vasos sanguíneos presentes na camada sub-odontoblástica. Estes dados estão em concordância com a literatura que indica haver uma maior presença de capilares na camada sub-odontoblástica durante a dentinogênese (Ten Cate, 1998).

Durante a dentinogênese normal, as células progenitoras circulantes no camundongo adulto podem invadir o dente que esta em desenvolvimento e participar na vascularização da polpa dentária. A literatura mostra que tecidos de diferentes origens embrionárias vascularizam-se por dois mecanismos diferentes; angiogênese e vasculogênese. Germes de membros originados da esplancopleura e transplantados em aves foram vascularizados por vasculogênese (Ambler et al., 2001; Yamashita et al., 2000; Pardanaud et al., 1987). Portanto, os vasos sanguíneos foram derivados do hospedeiro. Diferente dos dados obtidos pelo presente experimento, mostrando a possibilidade de ocorrência de vascularização quimérica ao se transplantar mandíbulas primordiais de 10.5 dias embrionários por duas semanas em cápsula renal de camundongos.

Alternativamente, rudimentos originados da somatopleura e transplantados em aves, resultaram em vascularização por angiogênese (Pudliszewski and Pardanaud, 2005), resultando em vasos sanguíneos derivados do doador e do hospedeiro. O presente estudo sugere que a vascularização do germe dentário sofre angiogênese quando as mandíbulas primordiais são transplantadas no estágio embrionário E10.5 em um hospedeiro transgênico. A angiogênese é definida como a colonização de uma rede vascular pré-existente por células endoteliais extrínsecas (Hertig, 1935). Sabendo da existência de células progenitoras endoteliais (endoglin positivas) na mandíbula primordial antes do experimento de transplantação ser conduzido (E10.5 e E13.5), após o transplante, células circulantes progenitoras poderiam ter sido atraídas aos sítios dos micro-vasos por indução de citocinas, onde elas puderam se diferenciar em células endoteliais e, portanto, contribuir para a vascularização angiogênica do dente em desenvolvimento. No experimento de transplante conduzido na fase de E13.5, os dentes resultantes foram vascularizados apenas com células provindas do germe dentário, não havendo contribuição de células do camundongo

hospedeiro. Pode sugerir-se que na fase E13.5 a organização das células endoteliais progenitoras era maior e não houve necessidade de células circulantes no sangue para completar a formação vascular da polpa dentária.

Células tronco isoladas da circulação sanguínea de humanos são capazes de originar diferentes tipos celulares (Labat et al., 1991; Bringuier et al., 1992), incluindo células endoteliais (Boyer et al., 2000; Labat et al., 2000). Estas células foram descritas como células monocitóides (Labat et al., 1991) as quais podem derivar células do sistema retículo-endotelial. Os dados desta investigação sugerem que células progenitoras circulantes podem se diferenciar em células endoteliais e contribuir para a vascularização do dente. Adicionalmente, outros tipos celulares, não identificados, foram encontrados na polpa dentária durante o desenvolvimento dentário. Pesquisadores sugerem uma associação física entre as células tronco e a microvascularização (Lee et al., 2004; Rieger et al., 2005), adicionalmente, foi sugerida a co-localização das células endoteliais e de populações de células progenitoras (Palmer, Willioite, Gage, 2000).

Sabendo que células circulantes contribuem para a formação da vasculatura da polpa dentária, existe a possibilidade de células circulantes poderem contribuir para a formação da população de células tronco presentes na polpa dentária. Caso as células tronco da polpa dentária possam se originar de células circulantes, existe a possibilidade de que estas células possam contribuir para a formação tecidos não-dentários. Este dado poderá ser útil para futura terapia à base de células tronco.

Células pluripotentes da crista neural migram para os tecidos periféricos onde elas podem ser encontradas nos tecidos de adultos vertebrados (Pierret et al., 2006). A plasticidade de potenciais células progenitoras do doador é importante para o entendimento da diversidade

terapêutica. Adicionalmente, estudos são sugeridos para a identificação do potencial de células circulantes na formação de outras estruturas dentárias. A dentição decídua mostrou conter células tronco que podem ser originadas de pericitos (Miura et al., 2003). Acredita-se que os pericitos possam ser originados da crista neural (CN). Como perspectiva futura, objetivando estudar detalhadamente estas células, sugere-se o uso de camundongos repórteres transgênicos *Wnt-1-Cre/R26R*, contendo uma ligação entre a atividade promotora do *Wnt-1*, a qual é específica para as células da CN, com a expressão *Rosa26*, permitindo o rastreamento da células derivadas da CN por meio do gene *LacZ* (Jiang et al., 2000).

A descoberta da origem e da localização de células progenitoras tem por objetivo avançar a medicina regeneradora. As células derivadas da CN têm mostrado potencial de se diferenciar em células das três camadas germinativas (Le Douarin, 2003) e sua identificação e localização poderiam contribuir para o avanço da medicina regeneradora. Os dados do experimento de transplante de mandíbulas primordiais E13.5 de GFP em cápsulas renais de camundongos *Rosa26*, por duas semanas, mostrou a presença de células do hospedeiro em proximidade com a camada de odontoblastos e com os vasos sanguíneos. Estes sítios podem potencialmente ser nichos para as células tronco da polpa dentária.

AGRADECIMENTOS

Dr. Cimara Fortes Ferreira gostaria de agradecer Dr. Matthew Bradman, BSc, BVSc por conduzir todas as cirurgias de transplante, Dra. Amanda Yen, Dra. Andrea Mantesso, Dra. Maisa Seppala e Dra. Jo-Maree Courtney pela assistência laboratorial e o Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por ceder a bolsa acadêmica.

REFERÊNCIAS

Ambler CA, Nowicki J L, Burke AC, Bautch VL (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* 234: 352-364.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228.

Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, Trevor KT (2000). Isolation of endothelial cells and their progenitors from human peripheral blood. *J Vasc Surg* 31 : 181-9.

Bringuier AF, Séébold-Choqueux C, Moricard Y, Simmons DJ, Milhaud G, Labat ML (1992). T-lymphocyte control of HLA-DR blood monocyte differentiation into neofibroblasts. Further evidence of pluripotential secreting functions of HLA-DR monocytes involving not only collagen but also uromodulin, amyloid beta peptide precursor, alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen. *Biomed Pharmacother* 46 : 91-108.

Browning PJ, Sechler JMG, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yazchoan R, et al. (1994) Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. *Blood* 84 : 2711-2720.

Carlile MJ, Harrison VT, Lumsden AG, Palmer RM (1998). Development and cell fate in interspecific (Mus musculus/Mus caroli) orthotopic transplants of mouse molar tooth germs detected by in situ hybridization. *Arch Oral Biol* 43:395-406.

Cho SW, Hwang HJ, Kim JY, Song WC, Song SJ, Yamamoto H, et al. (2003). Lineage of non-cranial neural crest cell in the dental mesenchyme: using a lacZ reporter gene during early tooth development. *J Electron Microsc* 52:567-71.

Cleaver O, Melton DA (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Med* 9: 661–668.

D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. (1997). Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 2040–2049.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27–45.

Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 128:1059-1068.

- Feinberg RN, Beebe DC (1983). Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220:1177-1179.
- Ferrara N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 1–30.
- Friedrich G, Soriano P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Develop* 5:1513–1523.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 1998 76:79-90.
- Hertig AT (1935). Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Carnegie Institute of Washington Publication 459, Contributions to embryology* 25, 37-81
- Houser JW, Ackerman GA, Knouff RA (1961). Vasculogenesis and erythropoiesis in the living yolk sac of the chick embryo. A phase microscopic study. *Anat Rec* 140:29-43.
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127:1607–1616.
- Labat ML, Bringuier AF, Séébold C, Moricard Y, Meyer-Mula C, Laporte P, et al. (1991). Monocytic origin of fibroblasts: spontaneous transformation of blood monocytes into neofibroblastic structures in osteomyelosclerosis and Engelmann's disease. *Biomed Pharmacother* 45:289-299.
- Labat ML, Bringuier AF, Arys-Philippart C, Arys A, Wellens F (1994). Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. *Biomed Pharmacother* 48:103-111.
- Labat ML, Milhaud G, Pouchelet M, Boireau P (2000). On the track of a human circulating mesenchymal stem cell of neural crest origin. *Biomed Pharmacother* 54:146-62.
- Le Douarin NM, S Creuzet, G Couly, and E Dupin. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131:4637–4650.
- Lee, O. K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669–1675 (2004).
- Lev EI, Kleiman NS, Birnbaum Y, Harris D, Korbling M, Estrov Z (2005). Circulating endothelial progenitor cells and coronary collaterals in patients with non-ST segment elevation myocardial infarction. *J Vasc Res* 42:408-414.
- Ma W, Rogers K, Zbar B and Schmidt L (2002). Effects of Different Fixatives on β -Galactosidase Activity. *J Histochem Cytochem* 50:1421–1424.

- Maye P, Becker S, Kasameyer E, Byrd N, Grabel L (2000). Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies. *Mech Dev* 94:117–132.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:5807-5812.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10344-10349.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479–494.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lièvre F, Buck CA (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100: 339-349.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105: 473-485.
- Péault B, Coltey M, Le Douarin NM (1988). Ontogenic emergence of a quail leukocyte/endothelium cell surface antigen. *Cel. Differ* 23:165-174.
- Pierret C, Spears K, Maruniak JA, Kirk MD (2006). Neural crest as the source of adult stem cells. *Stem Cells Dev* 15:286-291.
- Pudliszewski M, Pardanaud L (2005). Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras. *Int J Dev Biol* 49:355-361.
- Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S et al. (2002). Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 13: 61–67, 2002.
- Rieger, K. *et al.* (2005). Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.* 33, 605–611.
- Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91.
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000). Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 11307-11312.
- Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996). Alternative neural cell fates are instructively promoted by TGF β superfamily members. *Cell* 85: 331-343.

Shi S, Gronthos S. (2003) Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research* 18(4):696-704.

Ten Cate AR (1998). Development of the tooth and its supporting structures. In: Ten Cate AR, ed. Oral histology – development, structure, and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, Inc.:78-103.

Thorin E, Shreeve SM (1998). Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol ther* 78: 155-166.

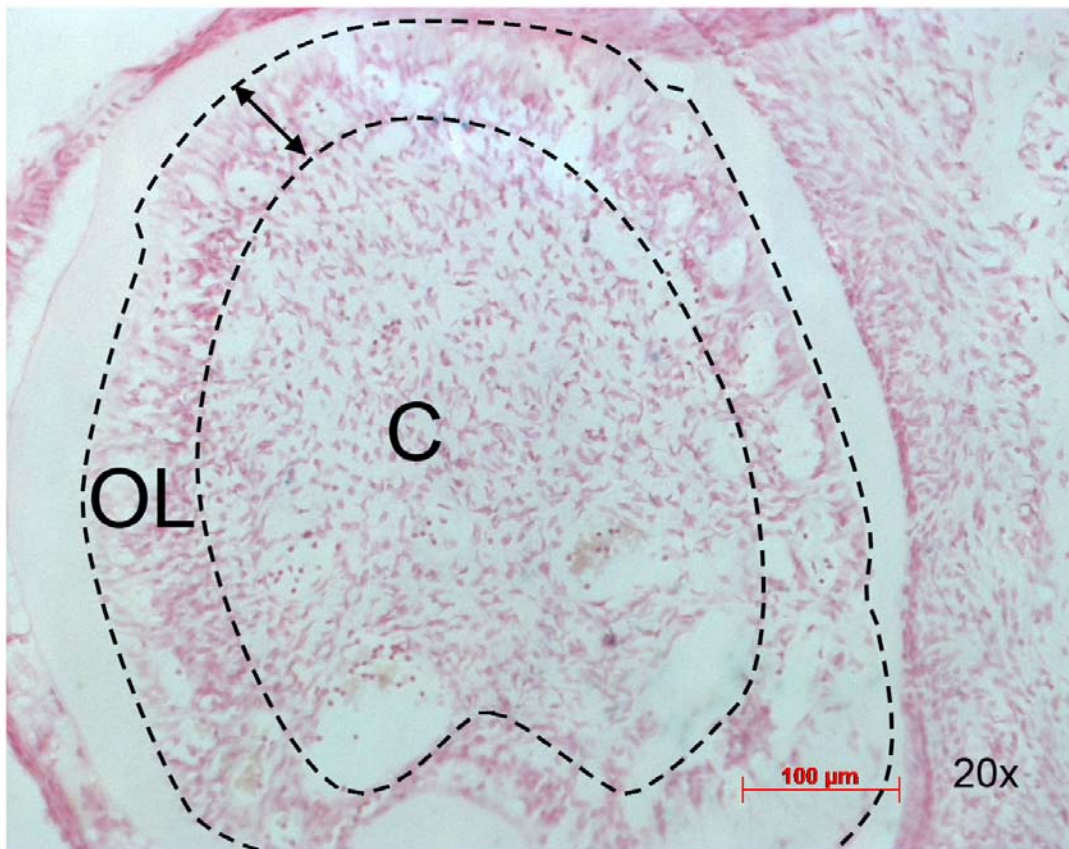
Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92-96.

Zhao Y, Glesne D, Huberman E (2003). A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2426-2431.

FIGURAS

Fig 1 -



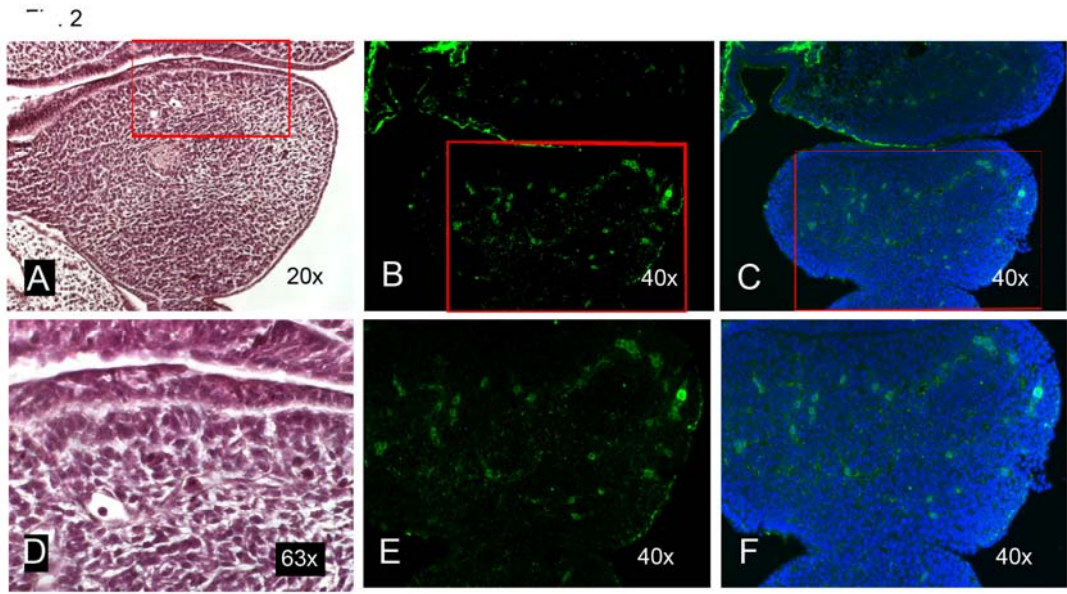


Fig 3

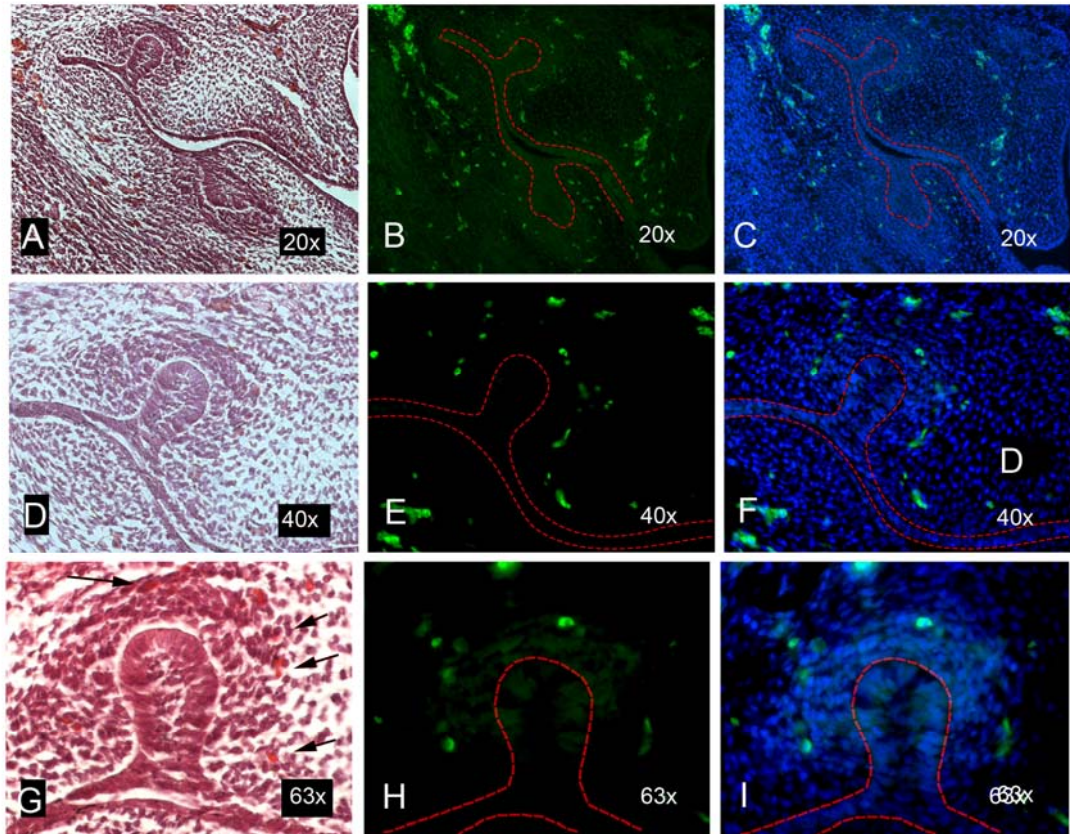


Fig 4

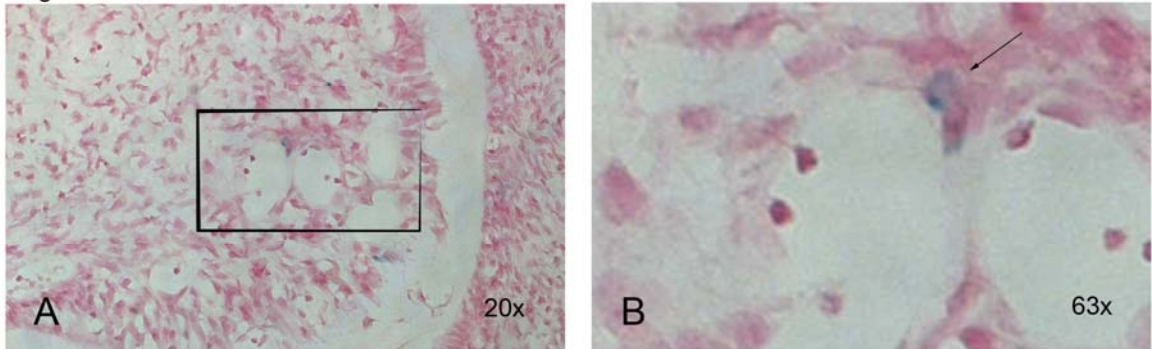


Fig 5

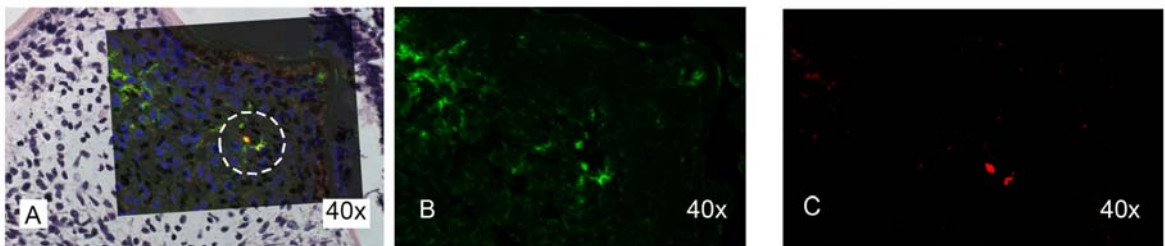


Fig 6

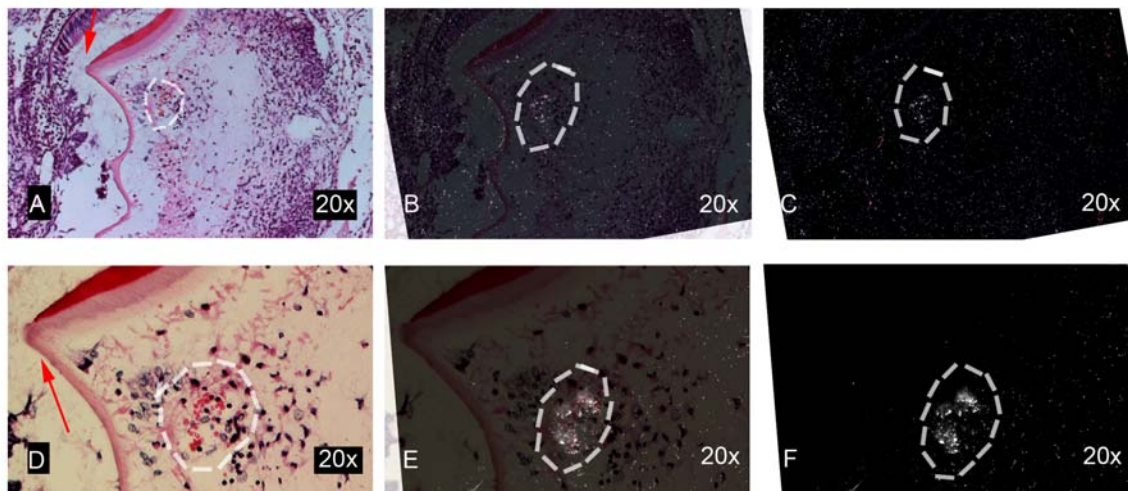
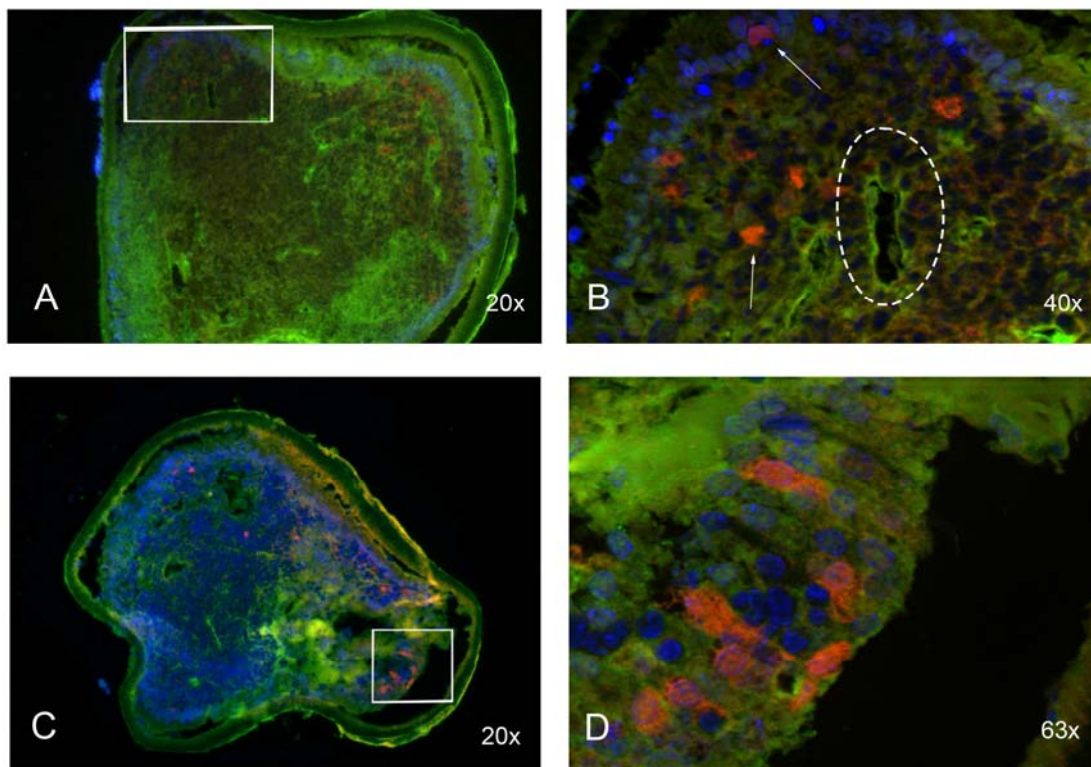


Fig 7



LEGENDA DAS FIGURAS

Fig 1 – Secção histológica do dente desenvolvido por 2 semanas após transplante de mandíbula primordial de E10.5 de camundongos selvagens em cápsula renal de *Rosa26*. Objetivando compilar dados, o dente foi dividido em duas regiões: OL e C. A região OL compreendeu a camada de odontoblastos, a camada sub-odontoblástica e a zona rica em células (OL) (linha pontilhada). A espessura da região OL foi estipulada em uma circunferência de aproximadamente 80 μm , iniciando no começo da dentina mineralizada até o final da zona rica em células. A região C foi a área circular resultante, delimitada pelo limite inferior da região OL.

Fig 2 – Secções de mandíbulas primordiais de camundongos selvagens E10.5 foram coradas com HE (A,D). Células endoteliais precursoras imunomarcadas por endoglin (green), estão presentes no mesênquima (B, C). O quadrado vermelho (C) apresenta maior magnificação (E,F) da mandíbula primordial de E10.5. Sobreposição da marcação com o anticorpo para endoglin (verde) com o DAPI que marca o núcleo celular (azul) (C, F).

Fig 3 – Secções de mandíbulas primordiais de camundongos selvagens E13.5 foram coradas com HE (A, D, G). Células eritróides nucleadas estão presentes em D e em maior magnificação em G (setas pretas). Células precursoras endoteliais imunomarcadas por endoglin (células verdes presentes em B, C, E, F, H and I), estão presentes no mesênquima do futuro dente (linhas vermelhas pontilhadas) em proximidade com a área onde as células eritróides nucleadas estão presentes (setas em D e G).

Fig 4 – Secções histológicas do dente desenvolvido 2 semanas após transplante de mandíbula primordial E10.5 de camundongo selvagem em camundongos *Rosa26* após corar com *LacZ* (A). Em maior magnificação (quadrado em A), células azuis presentes na polpa dentária revestindo vasos sanguíneos (B, seta) podem ser localizadas.

Fig 5 – Secção através de um molar desenvolvido duas semanas após transplante de mandíbula primordial E10.5 de camundongo selvagem em cápsula renal de camundongo *Rosa26* e imunomarcada para fator de VW (B, canal verde) e β - galactosidase (C, canal vermelho). Secções B e C foram superimpostas com as secções consecutivas coradas com HE (A). O núcleo celular foi marcado com DAPI (azul). Dentro das linhas pontilhadas (A) existe uma célula marcada em verde, expressando apenas o fator VW, esta é portanto, uma célula endotelial originada do doador. Células amarelas, expressando β - galactosidase e fator VW são, portanto, células endoteliais do hospedeiro (A, círculo branco pontilhado). Os vasos sanguíneos delimitados pelas linhas pontilhadas brancas são compostos por células endoteliais derivadas do doador (células marcadas em verde) e do hospedeiro (células marcadas em amarelo).

Fig 6 – Secção através do molar desenvolvido por 2 semanas após transplante de mandíbula primordial E10.5 de camundongo selvagem transplantado em cápsula renal de camundongo *Rosa26* foi marcada em HE (A e D), mostra presença de vasos sanguíneos (linhas brancas pontilhadas) em proximidade com as cúspides dentárias (seta vermelha). Hibridização radioativa *in situ* foi conduzida com sonda *LacZ* para detectar células do hospedeiro na polpa do dente desenvolvido (C e F). Secções A e D foram superimpostas com C e F (B e E),

respectivamente. Houve presença de radioatividade nas células marcadas pelas sondas *LacZ* na área próxima a vasos sanguíneos (B e E).

Fig 7 – As secções através do molar desenvolvido por 2 semanas após transplante de mandíbula primordial de E13.5 de camundongos selvagens em cápsula renal de camundongos *Rosa26* foram imunomarcadas para GFP (células verdes presentes em A, B, C e D) e β -galactosidase (células vermelhas presentes em A, B, C e D). O núcleo celular foi marcado com DAPI (células azuis presentes em A, B, C e D). Os quadrados brancos em A e C foram magnificados em B e D, respectivamente. O vaso sanguíneo dentro da polpa dentária, delimitado pelo círculo de linhas brancas pontilhadas (B) mostra células GFP positivas (verde) e que, portanto, são derivadas do doador sem contribuição das células do hospedeiro. Adicionalmente, células do hospedeiro β -galactosidase positivas podem ser visualizadas em proximidade com os vasos sanguíneos e com a camada de odontoblastos em B e dentro da camada de odontoblastos em D (células vermelhas alongadas).

GRÁFICO I)

Todas as secções feitas através de um dente formado, duas semanas após transplante de E10.5 de camundongos selvagens em cápsula renal de camundongos *Rosa26*, foram coradas pelo método *LacZ*. Analisou-se a presença de células *LacZ* positivas em proximidade com a camada de odontoblastos (OL) (n = 353, $\Sigma = 465$) ; e no centro da polpa dentária (C) (n = 112, $\Sigma = 465$). A percentagem de células *LacZ* positivas revestindo vasos sanguíneos em proximidade com a camada de odontoblastos, e no centro da polpa dentária foram de 30.02% (n = 106, $\Sigma = 353$) e de 5.35% (n = 6, $\Sigma = 112$), respectivamente.

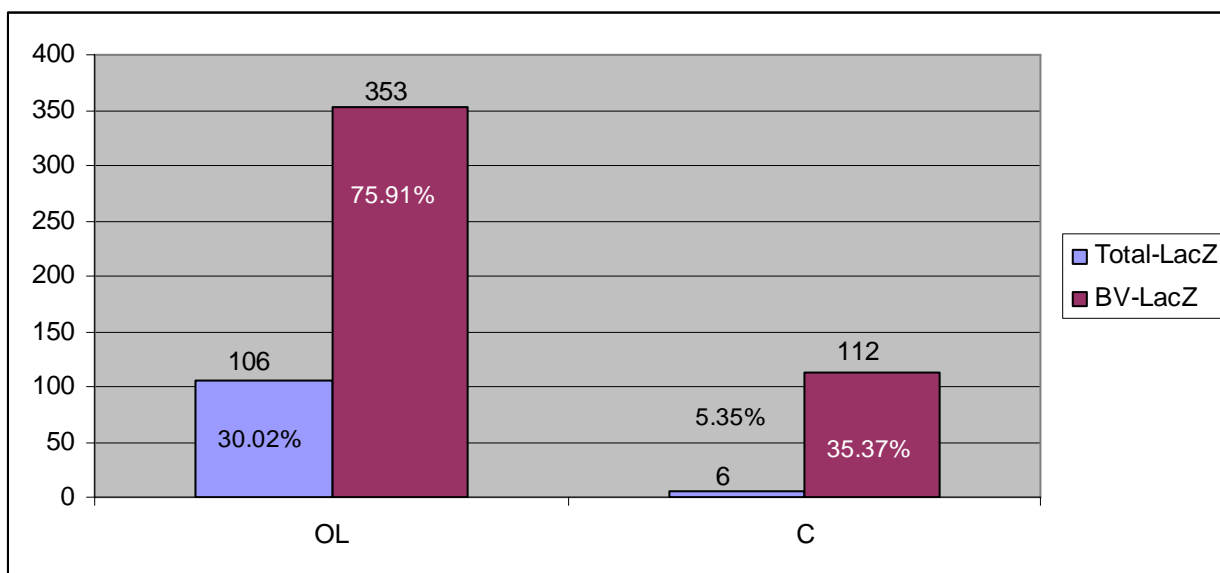
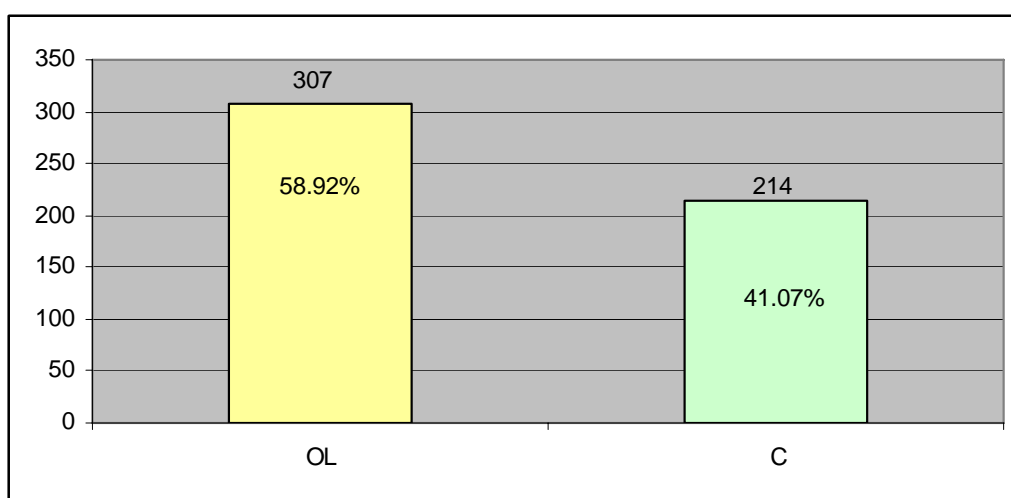


GRÁFICO II)

Todas as secções feitas através de um dente formado, 2 semanas após transplante de E10.5 de camundongos selvagens em cápsula renal de camundongos *Rosa26*, foram coradas pelo método *LacZ*. A percentagem de vasos sanguíneos presentes nas regiões OL e C foi de 58.92% (n = 307) e 41.08% (n = 214), respectivamente.



MANUSCRIPT 1**Origins of the dental pulp vasculature – an *in vivo* study**

This manuscript is formatted according with the author's guidelines for the *Journal of Dental Research*.

ABSTRACT

To study blood vessel formation during tooth development, we examined the expression of progenitor endothelial markers. In order to trace the origins of the tooth blood vessels, transgenic mice models were used. Mandible primordia, derived from 10.5 and 13.5 day embryos (E) from wild type (wt) and green-fluorescent protein (GFP) mice, respectively, were transplanted into kidney capsules of adult male *Rosa26* mice. Two weeks later, histological analyses, immunofluorescence and radioactive *in situ* hybridization were conducted on the resulting teeth. Transplanting E10.5 mandibles resulted in teeth with chimeric vasculature derived from both, host and donor cells. Transplanting E13.5 mandibles resulted into teeth with donor-derived vasculature only. In addition, there were unidentified cells present inside the dental pulp in proximity to the blood vessels and close to the odontoblast layer. We conclude that cells derived from the circulatory system can contribute to angiogenesis during early tooth development, a phenomenon which occurs in organs of somatopleural origin. Additionally, circulating cells can contribute to other cell types inside the dental pulp that are yet to be identified.

Key-words: Tooth development, vascularization, *in situ* radioactive hybridization, immunofluorescence.

INTRODUCTION

Blood vessels form in response to angiogenic factor stimulation by two distinct processes: vasculogenesis and angiogenesis (Maye et al., 2000; Doetschman et al., 1985). Vasculogenesis describes the process by which endothelial precursor cells form new blood vessels in the early embryo (Pardanaud et al., 1987; Péault et al., 1988; Houser et al., 1961; Feinberg and Beebe, 1983). Angiogenesis is the remodeling of existing blood vessels to form mature vasculature (Risau and Flamme, 1995; Hertig, 1935) and it is the main mechanism of neovascularization during postnatal wound healing and inflammation (Ferrara, 1999).

Initially, angiogenesis in the adult was considered a characteristic of terminally differentiated endothelial cells, with the capacity to form vascular tubes and recruit mural cells. Further studies suggested, however, that the angiogenic processes might involve bone marrow-derived vascular progenitor cells that colonize angiogenic sites and further differentiate into endothelial and mural cells (Asahara et al., 1999; Rafii et al., 2002).

Vascularization of developing tissues have been studied in the mouse (Ambler et al., 2001) and chick (Yamashita et al., 2000; Pudliszewski and Pardanaud, 2005) after transplantation of embryonic tissues between different species. When the transplanted tissue is splanchnopleural derived, studies show that the vasculature can be entirely derived from the donor (Pardanaud et al., 1989; Pudliszewski and Pardanaud, 2005). Alternatively, when the transplanted tissue is somatopleural derived, the vasculature can be chimeric, derived from the donor and the host (Ambler et al., 2001; Yamashita et al., 2000; Pardanaud et al., 1987). Additionally, chimeric vessels can be formed after intracardiac injection of mouse endothelial cells into chick embryos (Yamashita et al., 2000).

Stem cells have been isolated from the deciduous dentition and suggested to be derived from pericytes (Miura et al., 2003). Cells of the dental pulp, including pericytes, are derived from the neural crest (NC) (Etchevers et al., 2001). NC cells are pluripotent cells that arise during embryogenesis from the dorsal neural tube and brain. As development progresses, they migrate from the lateral margin of the neural tube and contribute to organ formation (Le Douarin et al., 2004). Populations of progenitor cells have been found in the heart vasculature that expressed neural crest markers. These cells can contribute to the formation of blood vessel smooth muscle (Schuldiner et al., 2000). In organs and in the human circulatory system, progenitor cells are able to give rise to several different cell types (Labat et al., 1991; Bringuier et al., 1992; Labat et al., 1994), including endothelial cells (Boyer et al., 2000; Labat et al., 2000). When the stem cells circulate in the adult blood they appear as monocytoïd cells (Bringuier et al., 1992). Investigators attempted to classify these cells as monocytoïd ectomesenchymal progenitor cells (Labat et al., 2000), a system that includes a subpopulation of monocyte-like cells which are mesenchymal progenitor cells, mesenchymal type cells and cells derived from the reticulo-endothelial system. It is unclear if the endothelial cells belong to this system. However, Kaposi's sarcoma-like cells, believed to be derived from monocytoïd ectomesenchymal progenitor cells (Labat et al., 2000), express endothelial markers (Browning et al., 1994).

Blood vessels enter the dental pulp by apical and accessory foramina. They then reduce calibre and branch into the subodontoblastic area as they enter the coronal pulp. When dentine formation begins, capillaries are found in the subodontoblast layer, beneath the newly differentiated odontoblast layer to assist in dentin mineralization (Ten Cate, 1998). The dental pulp is comprised of fibroblasts, macrophages, lymphocytes, dendritic cells, blood and lymphatic vessels, pulp matrix, undifferentiated ectomesenchymal cells. The dental pulp stem

cells can, in theory, be derived from any of these cells. An investigation showed that most of the dental pulp stem cells express pericyte markers (Shi, Gronthos, 2003). Pericytes are cells that surround blood vessels and of which its function is still unknown. Pericytes are capable to differentiate into cells from the three germ layers (Le Douarin et al., 2004). The extensive blood supply to dental pulp, together with indirect evidence for a pericyte contribution to cells in the circulation, and the possible pericyte origin of dental pulp stem cells, makes the development of dental pulp vasculature an important issue. There is sufficient evidence for the presence of circulating adult endothelial progenitor cells (Labat et al., 1991; Zhao et al., 2003; Orlic et al., 2001; Lev et al., 2005; Werner et al., 2005), of which during development have also shown to be co-localized with stem cells (Cleaver and Melton, 2003; Lee et al., 2004; Rieger et al., 2005). However, the origins of the circulating cells that contribute to vessel formation in the dental pulp are not fully understood.

Transplantation experiments enable us to trace the fate of foreign cells inside the developing tooth (Cho et al., 2003; Carlile et al., 1998). The aim of this study was to verify the origins of the dental vasculature. Wild type (wt) and green fluorescent protein (GFP) mandible primordia were dissected from 10.5 and 13.5 days embryos (E), respectively, and transplanted into Rosa 26 mice kidney capsules for 2 weeks. This study model enables cells derived from the host to be distinguished from those originating in the donor. Histological analysis, LacZ staining, immunofluorescence and *in situ* hybridization were conducted.

MATERIAL AND METHODS

Transplantation procedure

All the mice used in these experiments (n = 12) were kept in the Biological Service Unit of King's College London, where they received care by veterinarians and water and food *ad libitum*. Adult male *Rosa26* mice (n = 6) (Friedrich and Soriano, 1991) received intra-peritoneal anesthetic (Fentanyl/fluanisone). Antisepsis was conducted on the mouse skin with alcohol 70%, the fur was shaved and a 1 cm central incision was made to expose the kidney. Early stage wt and GFP (Hadjantonakis et al, 1998) primordial mandibles were dissected at E10.5 and E13.5, respectively, and transplanted into kidney capsules of *Rosa26* mice. All the primordial mandibles were dissected under stereomicroscope (Leica, MZFLIII, Germany).

E10.5 primordia mandibles were transplanted into *Rosa26* mice kidney capsules. This procedure was conducted three times and resulted in the development of 11 primordial mandibles, from which 7 (63.63%) showed tooth development. The remaining samples (n = 3, 36.37%), did not show evidence of tooth formation. E13.5 primordia mandibles were transplanted into *Rosa26* mice kidney capsules. This procedure was conducted three times and resulted in the development of 15 primordial mandibles, from which 14 (93.33%) showed tooth development. The remaining samples (n = 1, 6.66%), did not show evidence of tooth formation. Two weeks after transplantation, all the samples were harvested, fixed, embedded and cryosectioned for analysis.

This research was approved by the Ethics Committee and all the surgeries were covered by the Animals Act 1986.

LacZ staining

After dissection the samples were fixed in 4% PFA for 1 hour at 4°C. Next, they were decalcified with 0.5M EDTA, pH 8.0 for 3 days at 4°C. The samples were embedded in gelatin (G2500-Sigma type A) for 1 to 4 hours. Then, mounted in a plastic mounting recipient and left at room temperature until the embedding solution formed a gel. They were cryosectioned (Cryostat BRIGHT OTF Cryostat, Huntington, UK) in 7 µm and serial sections were placed on consecutive *Super Frost* slides. After dissection, they were fixed with 1% paraformaldehyde (PFA) and glutaraldehyde at 4°C for 1 hour. They were washed in PBS and stained with x-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) solution for 4 hours according to LacZ staining protocol (Ma et al., 2002).

Cell counting

All the LacZ positive cells were counted in each 7 µm sections of a resulting tooth. The resulting tooth was divided into odontoblast layer (OL) and core (C). The OL comprised of the odontoblast layer, the sub-odontoblastic zone and the cell-rich zone. The thickness of the OL was stipulated in a circumference of approximately 80 µm, from the beginning of the mineralized dentin to the end of the cell-rich zone (Fig 1). The C region comprised of a circular area initiating at the lower limit of the OL up to the centre of the tooth. The number of blood vessels present in each section was counted for regions OL and C (GRAPH II).

Immunofluorescence

Rabbit antibodies included the Von Willebrand factor (VW) (Abcam plc, Cambridge, UK); and Endoglin (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and GFP (Abcam plc, Cambridge, UK). Goat antibodies consisted of the β-galactosidase (Abcam plc, Cambridge, UK). The antibody for the GFP was used to amplify the signal expressed by the GFP mice cells. The secondary antibodies consisted of biotilylated donkey anti-goat and biotilylated Chicken anti-rabbit (Abcam plc, Cambridge, UK). The immunofluorescent assay was conducted following the

manufacture guidelines for the Tyramid Signal Amplification for Fluorescence (PerkinElmer TSA Plus Fluorescence Systems, NEL # 780). After conducting immunofluorescence the slides were mounted with Vectra Shield (Vector, Burlingame, CA) containing 0.1 ng/μl DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole).

Radioactive *in situ* hybridization

The patterns of LacZ were examined by radioactive *in situ* hybridization using ³⁵S-UTP labeled RNA probes as previously described (Tucker, Khamis & Sharpe, 1998). A 700-bp LacZ nucleotide of *pBlueprint* plasmid was digested with *SacI* and transcribed with T7 RNA polymerase for the antisense probe (D'Souza et al., 1997).

Image analyses

The images were obtained by a *ZEISS Axioskop 2 plus* (Carls Zeiss, Gottingen, Alemanha) connected to an *AxioCam*. The digitalized images were acquired by means of the *software AxioVision* (Carls Zeiss, Göttingen, Germany).

RESULTS

Mandible primordia analysis

In order to identify early endothelial cells in the embryo mandible mesenchyme, immunofluorescence was conducted with endoglin antibody. Sections of E10.5 shows the presence of endoglin positive cells in the mandible mesenchyme (Fig. 2A-F). At E13.5, the epithelium had invaginated into the mesenchyme forming the bud stage (Fig. 3A-I-dotted lines), from which a tooth will be derived. At E13.5 embryonic erythrocytes, are visible in the histological staining with hematoxylin-eosin (HE) (Fig. 3D). Consecutive sections showed presence of endoglin positive cells in close proximity to the areas where nucleated erythroid cells are present (Fig. 2B, C, E and F).

E10.5 wt mandible primordia transplantation into kidney capsules of *Rosa26* mice

Two weeks after transplantation of E10.5 wt mandible primordia into *Rosa26* mice kidney capsules, immunofluorescence was conducted. β -galactosidase activity analysis showed presence of LacZ positive cells, derived from the host, in the dental pulp during tooth development. Cells were in the vicinity of blood vessels and the odontoblast layer, others were lining blood vessels and showed fibroblastic-like morphology and small round nuclei (Fig. 4A and B), which characterized the microvessel morphology (Thorin, Shreeve, 1998). Of all LacZ positive cells counted inside all the sections of a tooth (n = 465), 75.91% were located in OL region which comprises of the odontoblast layer, sub-odontoblast layer and cell-rich zone and 24.09% (n= 112) were located in the C region which is the core of the tooth (Fig 1 – Table 1). In the OL region, 30.02% (n = 106) were in the vicinity or lining blood vessels, the remaining LacZ positive cells (n= 247) were not identified. In the C region,

5.35% (n = 6) were in the vicinity or lining blood vessels, the remaining LacZ positive cells (n= 106) were not identified (Table I, Fig. 1). Our findings suggest that 35.37% of the LacZ positive cells present inside the chimeric dental pulp were in the vicinity of blood vessels. 58.92% (n=307) of the blood vessels inside the chimeric tooth were located in the subodontoblastic layer (Table I), and these blood vessels were comprised of fibroblast-like cells with small nuclei, morphologically resembling endothelial cells of which included LacZ positive cells (Figure 1).

The OL region showed 58.92% (n =307) of blood vessels in the chimeric dental pulp (GRAPH II), and these blood vessels showed cells similar to fibroblasts with small nuclei and morphology similar to endothelial cells *LacZ* positive and *LacZ* negative. The majority of the blood vessels were located in the OL region of the tooth (GRAPH II), the number of cells lining blood vessels was much higher in the OL region, compared to the C region (Figure 1 - GRAPH I).

Immunofluorescence was conducted on sections of a tooth resulting from a 2 week transplantation of E10.5 wt mandible primordia into Rosa26 kidney capsule. Von Willebrand (VW) factor antibody, was used to identify progenitor endothelial cells, and β -galactosidase antibody, was used to identify host cells, inside the resulting teeth. Sections of the resulting teeth showed presence of VW factor positive cells deriving from both, the host and the donor (Fig. 5). Radioactive *in situ* hybridization was conducted on further sections using a LacZ probe to confirm the presence of host cells in the dental pulp. Sections showed presence of LacZ in the regions of blood vessels (Figure 6). Knowing that β -galactosidase is not expressed in red blood cells, these findings suggest that the donor cells present inside and in proximity to blood vessels are endothelial cells. These results corroborate with the previous results from the immunofluorescent assay.

E13.5 GFP mandible primordia transplantation into kidney capsules of Rosa26 mice

Two weeks after E13.5 GFP mandible primordia were transplanted into Rosa26 mice kidney capsules, immunofluorescence was conducted. GFP antibody was used to identify donor cells, and β -galactosidase antibody was used to identify host cells inside the resulting teeth. Sections of the resulting teeth showed the presence of β -galactosidase positive host cells in close proximity to the odontoblast layer and to blood vessels. However, the blood vessels seemed to be entirely derived from the donor cells (Fig 7). Although the LacZ positive cells were not identified, they do not appear to be red blood cells. In some instances they were present in the odontoblast layer, where they show to have an elongated form (Fig. 7D-red stained cells). These cells could potentially be dental pulp stem cells.

DISCUSSION

It has been shown that blood vessels grow in the dental follicle and enter the dental papilla during the cap stage (E14.5) (Ten Cate, 1998). Our study examined stages of tooth development prior to the cap stage at E10.5 and E13.5. Single endothelial progenitor cells were present in the mesenchyme of wt primordial mandibles. Additionally, these endoglin positive cells were shown to be in the region close to nucleated erythroid cells.

Transplantation of wt mandible primordia into Rosa26 mice enabled us to study the formation of dental pulp vasculature. The current investigation used transgenic Rosa26 mice, which express LacZ in all the tissues present in the dental pulp, with the exception of red blood cells. The *in situ* hybridization assay showed presence of LacZ positive host derived cells inside and in proximity to blood vessels. This experiment is consistent with the immunofluorescence results, which showed presence of β -galactosidase positive and VW factor positive cells composing dental pulp blood vessels and are in concurrence with the literature (Cho et al., 2003).

Sections made through molars developed for two weeks after transplantation of E10.5 wt mandible primordia into Rosa26 mouse kidney capsules, revealed presence of endothelial cells derived from both the donor and the host. The literature suggests that vascularization of the dental pulp, after transplantation of E15 *M. musculus* tooth germs into ectopic sites of *M. caroli* mice, is chimeric (Carlile et al., 1998). Our study, conducting the transplantation experiment at an earlier embryonic stage, verified histologically the presence of host cells composing blood vessels in conjunction with donor cells in the developing tooth. Furthermore, immunofluorescence enabled us to identify the host cells as endothelial in origin. Therefore, our findings show that the origin of the blood vessels present in the dental pulp is also chimeric. However, when conducting the experiment at a later embryonic stage (E13.5), our findings showed that the blood vessels were derived entirely from the donor

cells. Additionally, there were unidentified cell types derived from the host located inside the dental pulp in proximity to blood vessels and to the odontoblast layer.

Histological analysis of the tooth resulting from the two week transplantation experiments of wt E10.5 mandibles primordia into Rosa26 kidney capsules showed that LacZ positive cells were frequently located in the vicinity of the odontoblast layer, in the sub-odontoblast layer and in the cell rich zone. Their sites were in proximity to the blood vessels and they presented as fibroblast-like cells with small nuclei. Our findings show that the majority of blood vessels derived from the host cells were present more peripherally, in the OL region. The result concurs with a similar study in which tooth bud transplantation into ectopic sites was used to verify host cell contribution to tooth formation. Blood vessels appeared to be donor derived in the dental pulp core region and host derived more peripherally (Carlile et al., 1998).

The present study showed a high percentage of blood vessels present in the sub-odontoblast layer zone and the odontoblast layer. Additionally, the chimeric tooth showed that most LacZ positive cells, derived from the host, were located in the vicinity of blood vessels present in the subodontoblast layer. These findings are in concurrence with the literature showing increased presence of capillaries in the sub-odontoblast layer during dentinogenesis (Ten Cate, 1998).

In normal odontogenesis, the circulating progenitor cells of an adult mouse can invade the developing tooth and participate in the dental pulp vascularization. The literature shows that tissues from different embryonic origins vascularize through two distinct mechanisms; angiogenesis and vasculogenesis. Splanchnopleura limb buds transplanted into quail were vascularized by vasculogenesis (Ambler et al., 2001; Yamashita et al., 2000; Pardanaud et al.,

1987). Therefore, the blood vessels were derived from the donor. Alternatively, somatopleural organ rudiments, transplanted into quail resulted in vascularization by angiogenesis (Pudliszewski and Pardanaud, 2005), resulting in blood vessels derived from the donor and the host. Our data suggests that the tooth bud vasculature undergoes angiogenesis when mandibles primordia are transplanted from the E10.5 stage into a transgenic donor. Angiogenesis is defined as the colonization of a rudiment by extrinsic endothelial cells from a preexisting vascular network (Hertig, 1935). Knowing that there were already endothelial progenitor cells (endoglin positive) in the primordial mandible before the transplantation experiment was conducted (E10.5 and E13.5), after transplantation, circulating progenitor cells could be drawn to the microvascular sites by cytokine induction, where they could differentiate into endothelial cells and, therefore, contributing to angiogenic vascularization of the developing tooth. The transplantation experiment conducted at E13.5, the resulting teeth were vascularized only with donor cells, there was no contribution from the host cells. At E13.5, we suggest that the organization of the progenitor endothelial cells is increased, compared to E10.5, and there was no need for circulating cells to complete the vasculature formation of the dental pulp.

Stem cells isolated from human blood are able to give rise to several different cell types (Labat et al., 1991; Bringuier et al., 1992), including endothelial cells (Boyer et al., 2000; Labat et al., 2000). These cells were described as monocytoid (Labat et al., 1991) cells which can derive cells from the reticulo-endothelial system. Our data suggests that circulating progenitor cells can differentiate into endothelial cells and contribute to tooth vasculature formation. Furthermore, other unidentified cell types can be found in the dental pulp during tooth development. The physical association between stem cells and the microvasculature has been suggested (Lee et al., 2004; Rieger et al., 2005). Investigators

have suggested a co-localization of the endothelial cells and progenitor populations. (Palmer, Willioite, Gage, 2000). It has also been suggested that the endothelial cells may have the potential to regulate signals that can affect primitive cell fate (Shah, Groves, Anderson, 1996).

Knowing that circulating cells can contribute to dental pulp vasculature, there is a possibility of circulating cells contributing to the population of dental pulp stem cells. If dental pulp stem cells can originate from circulating cells, there is a possibility of these cells contributing to the formation of non-dental tissues. This finding would be useful for future stem cell based therapies.

Pluripotent neural crest cells migrate to peripheral tissues where their progeny are found throughout the body in all adult vertebrates (Pierret et al., 2006). The plasticity of potential donor progenitor cells is important to understand its therapeutic diversity. Further studies are suggested to identify the potential of circulating cells in the formation of other dental structures.

Deciduous tooth pulp has been shown to contain stem cells that may be derived from pericytes (Miura et al., 2003). These cells are believed to be neural crest (NC) in origin. In order to further study these cells, it is suggested to use of transgenic reporter mice Wnt-1-Cre/R26R, which links early Wnt-1 promoter activity, specific to NC, with Rosa26 expression, which enables to trace cells derived from the NC with the LacZ gene (Jiang et al., 2000).

Regenerative medicine would be advanced by the discovery of the origin and location of progenitor cells. NC derived cells have shown the potential to differentiate into all three germ layers (Le Douarin, 2003) and the identification of the NC derived cells location would contribute to the attainment of this goal. Our findings of the transplantation experiment of

E13.5 GFP mandible primordia into Rosa26 mice kidney capsules for two weeks showed presence of host cells close to the odontoblast layer and to blood vessels. These cells can potentially be dental pulp stem cell niches.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr. Cimara Fortes Ferreira would like to acknowledge Dr. Matthew Bradman, BSc, BVSc for conducting all the transplantation surgeries, Dr. Amanda Yen and Dr. Andrea Mantesso, Dr. Maisa Seppala and Dr. Jo-Maree Courtney for their laboratory assistance, and the *Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for granting the academic scholarship.

REFERENCES

Ambler CA, Nowicki J L, Burke AC, Bautch VL (2001). Assembly of trunk and limb blood vessels involves extensive migration and vasculogenesis of somite-derived angioblasts. *Dev Biol* 234: 352-364.

Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228.

Boyer M, Townsend LE, Vogel LM, Falk J, Reitz-Vick D, Trevor KT (2000). Isolation of endothelial cells and their progenitors from human peripheral blood. *J Vasc Surg* 31 : 181-9.

Bringuier AF, Séébold-Choqueux C, Moricard Y, Simmons DJ, Milhaud G, Labat ML (1992). T-lymphocyte control of HLA-DR blood monocyte differentiation into neofibroblasts. Further evidence of pluripotential secreting functions of HLA-DR monocytes involving not only collagen but also uromodulin, amyloid beta peptide precursor, alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen. *Biomed Pharmacother* 46 : 91-108.

Browning PJ, Sechler JMG, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yazchoan R, et al. (1994) Identification and culture of Kaposi's sarcoma-like spindle cells from the peripheral blood of human immunodeficiency virus-1-infected individuals and normal controls. *Blood* 84 : 2711-2720.

Carlile MJ, Harrison VT, Lumsden AG, Palmer RM (1998). Development and cell fate in interspecific (Mus musculus/Mus caroli) orthotopic transplants of mouse molar tooth germs detected by in situ hybridization. *Arch Oral Biol* 43:395-406.

Cho SW, Hwang HJ, Kim JY, Song WC, Song SJ, Yamamoto H, et al. (2003). Lineage of non-cranial neural crest cell in the dental mesenchyme: using a lacZ reporter gene during early tooth development. *J Electron Microsc* 52:567-71.

Cleaver O, Melton DA (2003). Endothelial signaling during development. *Nature Med* 9: 661–668.

D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, et al. (1997). Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12: 2040–2049.

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R (1985). The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27–45.

Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF (2001). The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 128:1059-1068.

- Feinberg RN, Beebe DC (1983). Hyaluronate in vasculogenesis. *Science* 220:1177-1179.
- Ferrara N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 237: 1–30.
- Friedrich G, Soriano P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: A genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Develop* 5:1513–1523.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 1998 76:79-90.
- Hertig AT (1935). Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. *Carnegie Institute of Washington Publication 459, Contributions to embryology* 25, 37-81
- Houser JW, Ackerman GA, Knouff RA (1961). Vasculogenesis and erythropoiesis in the living yolk sac of the chick embryo. A phase microscopic study. *Anat Rec* 140:29-43.
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127:1607–1616.
- Labat ML, Bringuier AF, Séébold C, Moricard Y, Meyer-Mula C, Laporte P, et al. (1991). Monocytic origin of fibroblasts: spontaneous transformation of blood monocytes into neofibroblastic structures in osteomyelosclerosis and Engelmann's disease. *Biomed Pharmacother* 45:289-299.
- Labat ML, Bringuier AF, Arys-Philippart C, Arys A, Wellens F (1994). Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. *Biomed Pharmacother* 48:103-111.
- Labat ML, Milhaud G, Pouchelet M, Boireau P (2000). On the track of a human circulating mesenchymal stem cell of neural crest origin. *Biomed Pharmacother* 54:146-62.
- Le Douarin NM, S Creuzet, G Couly, and E Dupin. (2004). Neural crest cell plasticity and its limits. *Development* 131:4637–4650.
- Lee, O. K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669–1675 (2004).
- Lev EI, Kleiman NS, Birnbaum Y, Harris D, Korbling M, Estrov Z (2005). Circulating endothelial progenitor cells and coronary collaterals in patients with non-ST segment elevation myocardial infarction. *J Vasc Res* 42:408-414.
- Ma W, Rogers K, Zbar B and Schmidt L (2002). Effects of Different Fixatives on β -Galactosidase Activity. *J Histochem Cytochem* 50:1421–1424.

- Maye P, Becker S, Kasameyer E, Byrd N, Grabel L (2000). Indian hedgehog signaling in extraembryonic endoderm and ectoderm differentiation in ES embryoid bodies. *Mech Dev* 94:117–132.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:5807-5812.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10344-10349.
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 425: 479–494.
- Pardanaud L, Altmann C, Kitos P, Dieterlen-Lièvre F, Buck CA (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development* 100: 339-349.
- Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105: 473-485.
- Péault B, Coltey M, Le Douarin NM (1988). Ontogenic emergence of a quail leukocyte/endothelium cell surface antigen. *Cel. Differ* 23:165-174.
- Pierret C, Spears K, Maruniak JA, Kirk MD (2006). Neural crest as the source of adult stem cells. *Stem Cells Dev* 15:286-291.
- Pudliszewski M, Pardanaud L (2005). Vasculogenesis and angiogenesis in the mouse embryo studied using quail/mouse chimeras. *Int J Dev Biol* 49:355-361.
- Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S et al. (2002). Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 13: 61–67, 2002.
- Rieger, K. *et al.* (2005). Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. *Exp. Hematol.* 33, 605–611.
- Risau W, Flamme I (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91.
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000). Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 11307-11312.

Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996). Alternative neural cell fates are instructively promoted by TGF β superfamily members. *Cell* 85: 331-343.

Shi S, Gronthos S. (2003) Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research* 18(4):696-704.

Ten Cate AR (1998). Development of the tooth and its supporting structures. In: Ten Cate AR, ed. Oral histology – development, structure, and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, Inc.:78-103.

Thorin E, Shreeve SM (1998). Heterogeneity of vascular endothelial cells in normal and disease states. *Pharmacol ther* 78: 155-166.

Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007.

Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408: 92-96.

Zhao Y, Glesne D, Huberman E (2003). A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2426-2431.

FIGURES

Refer to the following pages:

Fig 1 – pg. 35

Fig 2 – pg. 36

Fig 3 – pg. 36

Fig 4 – pg. 37

Fig 5 – pg. 37

Fig 6 – pg. 38

Fig 7 – pg. 38

FIGURE LEGENDS

Fig 1 – Histological section of a tooth resulting from a 2 week transplantation of E10.5 wt mandible primordia into Rosa26 kidney capsule. In order to compile data, the tooth was divided into two regions: OL and C. The OL region comprised of odontoblast layer, sub-odontoblast area and cell-rich zone (OL) (dotted line). The thickness of the OL region was stipulated in a circumference of approximately 80 μm , from the beginning of the mineralized dentin to the end of the cell-rich zone. The C region was the resulting circular area limited by the inferior limit of the OL region.

Fig 2 – HE sections of E10.5 wt primordia mandible (A,B). Endothelial precursor cells, immunostained by endoglin (green), are present in the mesenchyme (B, C). Red square (C) shows a greater magnification (E,F) of the E10.5 primordia mandible. Overlap of the endoglin immunostained section (green) with DAPI (blue), which stained cell nuclei (C, F).

Fig 3 – HE section of an E13.5 wt primordia mandible at tooth bud development stage (A, D, G). Nucleated erythroid cells (red arrows) are present in D (red arrows) and in G is a higher magnification (black arrows). Endothelial precursor cells, immunostained by endoglin (green cells present in B, C, E, F, H and I), are present in the mesenchyme of the future tooth (red dotted lines) in close proximity to the area where the nucleated erythroid cells are present (arrows in D and G).

Fig 4 – Histological section of a tooth resulting from a two week transplantation of an E10.5 primordia mandible into a Rosa26 mouse after LacZ staining (A). At a higher magnification (square in A), blue cells present in the dental pulp lining blood vessels (B, arrow) can be seen.

Fig 5 – Section through a molar tooth resulting from an E10.5 wt mandible primordia transplanted for two weeks into a Rosa26 kidney capsule and immunochemically stained for VW factor (B, green channel) and β -galactosidase (C, red channel). Sections B and C were superimposed with and HE consecutive section (A). Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Inside the dotted line (A) there is a green cell, expressing only the VW factor, is thus an endothelial cell derived from the donor. Yellow cells, express β -galactosidase and VW factor and are therefore, endothelial cells derived from the host (A, white dotted circle). The blood vessel delimited by the white dotted lines is composed of endothelial cells derived from the donor (green cell) and the host (yellow cells).

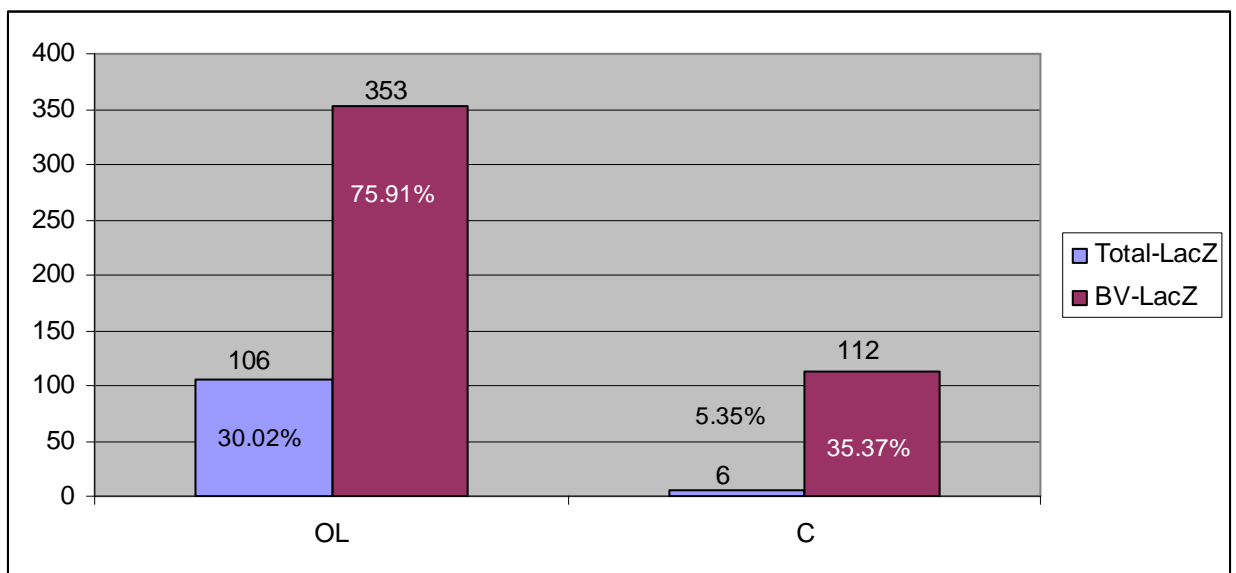
Fig 6 – HE section through a molar tooth, resulting from an E10.5 wt mandible primordia transplanted for two weeks into a Rosa26 kidney capsule (A and D), shows presence of a

blood vessel (white dotted circle) close to the dental cusp (red arrow). Radioactive *in situ* hybridization was conducted with LacZ probe to trace host cells in the developed tooth (C and F). Sections A and D were superimposed with C and F (B and E), respectively. There is presence of radioactivity for the LacZ probe in the area close to the blood vessels (B and E).

Fig 7 – Section through a molar tooth resulting from an E13.5 GFP mandible primordia transplanted for two weeks into a Rosa26 kidney capsule immunochemically stained for GFP (green cells present in A, B, C and D) and β -galactosidase (red cells present in A, B, C and D). Cell nuclei were stained with DAPI (blue cells present in A, B, C and D). The white squares in A and C were magnified at B and D, respectively. The blood vessel inside the dental pulp and delimited by the white dotted circle (B) shows GFP positive (green) cells and therefore, are derived from the donor with no contribution from the host cells. Furthermore, β -galactosidase positive host cells can be seen in close proximity to the blood vessels and to the odontoblast layer in B and inside the odontoblast layer in D (red elongated cells).

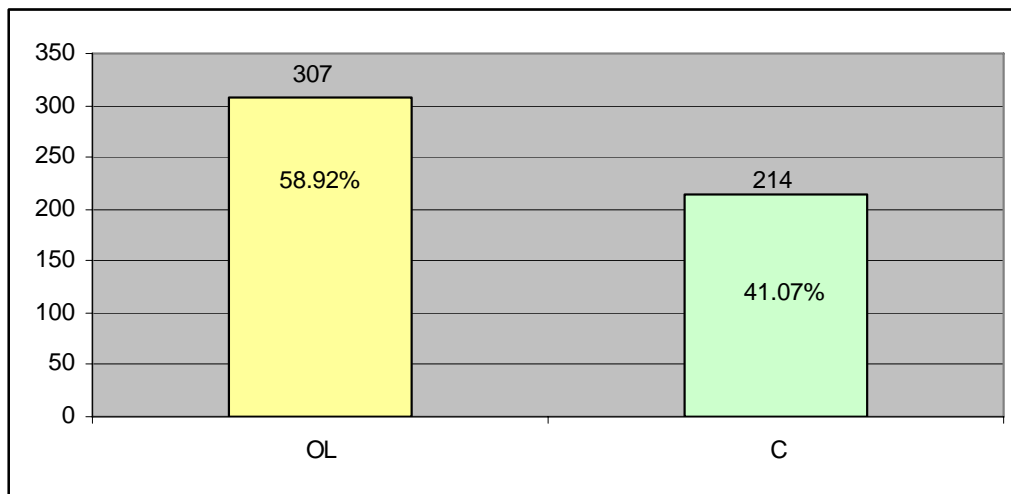
GRAPH I)

Sections made through a tooth resulting from the transplantation of E10.5 wt mandible primordia into a Rosa26 mouse kidney capsule were LacZ stained. All the sections of one tooth were analyzed as to the presence of LacZ positive cells in proximity to the odontoblast layer (OL); and in the core of the dental pulp (C). The percentage of LacZ positive cells lining blood vessels in proximity to the odontoblast layer, and in the dental core were, 30.02% (n = 106, $\Sigma = 353$), and 5.35% (n = 6, $\Sigma = 112$), respectively.



GRAPH II)

Sections made through a tooth resulting from the transplantation of E10.5 wt mandible primordia into a *Rosa26* mouse kidney capsule were LacZ stained. The percentage of blood vessels present at OL and C were 58.92% (n = 307) e 41.07% (n = 214), respectively.



BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ALMUSHAYT, A. et al. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. **Gene Therapy**, v. 13, n. 7, p. 611-620, Apr. 2006.

BRACHVOGEL, B. et al. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. **Development**, v. 132, n. 11, p. 2657-2668, Apr. 2005

BURNHAM, E.; MOSS, M. Progenitor cells in acute lung injury. **Minerva Anesthesiology**, v. 72, n. 6, p. 369-374, Jun. 2006

DJAKOVIC, A.; DIETL, J. Stem cell transplantation of umbilical cord blood from related and non-related donors in children and adults--a review of stem cell transplantation from umbilical cord blood. **Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie**, v. 209, n. 5, p. 159-166, Oct. 2005.

DORE-DUFFY, P. et al. CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. **Journal of Cerebral and Blood Flow Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 613-624, May. 2006.

FERGUSON, C.A.; TUCKER, A.S.; SHARPE, P.T. Temporospatial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. **Development**, v. 127, n. 2, p. 403-412. Jan. 2000.

FERNANDES, K.J. et al. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. **Nature and Cell Biology**, v. 6, n. 11, p. 1082-1093, Nov. 2004.

FERNANDES, K.J., et al. Analysis of the neurogenic potential of multipotent skin-derived precursors. **Experimental Neurology**, v. 201, n.1 p. 32-48, Sept. 2006.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13625-13630, Dec. 2000.

GRONTHOS, S. et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**. v. 81, n. 8, p. 531-555, Aug. 2002.

HE, F.; TAN, Y.H.; ZHANG, G. Isolation and identification of human dental pulp stem cells. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi**, v. 23, n. 1, p. 75-78, Feb. 2005.

HOFFMANN, J. et al. Endothelial survival factors and spatial completion, but not pericyte coverage of retinal capillaries, determine vessel plasticity. **The FASEB Journal**, v.19, p. 2035- 2036, Dec. 2005.

- KASSIS, I. et al. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. **Bone Marrow Transplantation**, v. 37, n. 10, p. 967-76, May. 2006.
- KLEINMAN, M.E.; BLEI, F; GURTNER, G.C. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Vascular Anomalies, **Lymphatic Research and Biology**, v. 3, n. 4, p. 234-239, 2005.
- LAINO, G. et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 17, n. 3, p. 511-555, May. 2006.
- LE DOUARIN, N.M. et al. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-4650, Oct. 2004.
- LEE, O. K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, p. 1669-1675, Oct. 2004.
- LERI, A.; KAJSTURA, J.; ANVERSA, P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 4, p. 1373-1426, Oct. 2005.
- MANSILLA, E. et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. **Transplantation Proceedings**, v. 38, n. 3, p. 967-969, Apr. 2006.
- MANZKE, E, et al. Structural features of forming and developing blood capillaries of the enamel organ of rat molar tooth germs by light microscopy. **Journal of Morphology**, v. 265, n. 3, p. 335-342, Sep. 2005.
- McKENZIE, I.A. et al. Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells for the injured and dysmyelinated nervous system. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 24, p. 6651-6660, Jun. 2006.
- MILETICH, I.; SHARPE, P.T. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. **Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews**, v. 72, p. 200-212, Jun. 2004.
- MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 10, p. 5807-5812, May. 2003.
- MONTARRAS, D. et al. Direct Isolation of Satellite Cells for Skeletal Muscle Regeneration. **Science**, v. 309, n. 5743, p. 2064-2067, Sept. 2005.
- NADAL-GINARD, B. et al. Cardiac stem cells and myocardial regeneration. **Novartis Foundation symposium**, v. 265, p. 142-154, 2005.
- NAKASHIMA, M.; AKAMINE, A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 10, p. 711-718, Oct. 2005.

PIERDOMENICO, L. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. **Transplantation**, v. 80, n. 6, p. 836-842, Sept. 2005.

PINZON, R.D.; TOTO, P.D.; O'MALLEY, J.J. Kinetics of rat molar pulp cells at various ages. **Journal of Dental Research**, v. 45, n. 3, p. 934-938, May-Jun. 1966.

PORTMANN-LANZ, C. et al. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 194, n. 3, p. 664-673, Mar. 2006.

QUINONES-HINOJOSA, A. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. **The Journal of comparative neurology**, v. 494, n. 3, p. 415-434, Jan. 2006.

RIEGER, K. et al. Mesenchymal stem cells remain of host origin even a long time after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation. **Experimental Hematology**, v. 33, p. 605-611, 2005.

ROCHFORT, G.Y. et al. Multipotential Mesenchymal Stem Cells are Mobilized into Peripheral Blood by Hypoxia. **Stem Cells**, v. 24, n. 10, p. 2202-2208. Oct. 2006.

ROSKAMS, T. Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. **Oncogene**, v. 25, n. 27, p. 3818-3822, Jun. 2006.

SANAI, N.; ALVAREZ-BUYLLA, A.; BERGER, M.S. Neural stem cells and the origin of gliomas. **The New England journal of medicine**, v. 353, n. 8, p. 811-822, Aug. 2005.

SCHMELZER, E.; WAUTHIER, E.; REID, L.M. The Phenotypes of Pluripotent Human Hepatic Progenitors. **Stem Cells**, v. 24, n. 8, p. 1852-1858, Aug. 2006.

SEO, B.M. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-155, Jul. 2004.

TEN CATE, A.R. Development of the tooth and its supporting structures. In: TEN CATE, A.R., ed. Oral histology – development, structure, and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, Inc.:78-103, 1998.

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signalling networks regulating dental development. **Mechanisms of development**, v. 67, n. , p. 111-123, Oct. 1997.

THESLEFF, I.; VAAHTOKARI, A.; PARTANEN, A.M. Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. **International Journal of Developmental Biology**, v. 39, n. 1, p. 35-50. Feb. 1995.

URBANEK, K. et al. From the Cover: Stem cell niches in the adult mouse heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 24, p. 9226-9231, Jun. 2006.

VASCOTTO, S.G.; GRIFFITH, M. Localization of candidate stem and progenitor cell markers within the human cornea, limbus, and bulbar conjunctiva in vivo and in cell culture. **The anatomical record. Part A, Discoveries in molecular, cellular, and evolutionary biology**, v. 288, n. 8 , p. 921-931, Aug. 2006.

XING, Z. et al. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. **Blood**, v. 108 , n. 7 , p. 2190-2197, Oct. 2006.

YEN, C.C. et al. Stem cells in the lung parenchyma and prospects for lung injury therapy. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 36, n. 5, p. 310-319, May. 2006.

ARTIGO 2

Implantodontia: passado, presente e futuro

Breve revisão realizada e formatada conforme as normas da
elaboração de artigos da *Journal of Oral Research*.

RESUMO

A implantodontia não é, de forma alguma, um fenômeno recente na odontologia. Ela existiu de diversas formas desde o período da antiga civilização Egípcia. De pedras preciosas até os implantes de titânio, os cirurgiões-dentistas se esforçaram para reparar o dente perdido ou ausente. Atualmente, com o advento das células tronco, existe uma possibilidade de desenvolver dentes biológicos completos no futuro não tão distante.

INTRODUÇÃO

Desde os tempos da pré-história, a humanidade teve a preocupação com os métodos de reposição dentária, até mesmo antes das técnicas de reparo dentário. No Egito, 2500AC¹, uma prótese foi confeccionada por fios, presos a dentes adjacentes, para suportar dois pânticos. Pedras decorativas, calcita, conchas, madeira e marfim lapidados, além de transplantes de dentes, foram todos empregados para alcançar este fim.

O primeiro tipo de implante moderno foi criado em 1809, quando se utilizou um implante de ouro¹ como raiz artificial retida no osso por forcas, sobre as quais uma coroa era assentada. Desde então, implantes foram fabricados de vários materiais e formas, no entanto sempre apresentavam problemas devido à falta de biocompatibilidade com o organismo.

Nos anos 50, um ortopedista, Per-Ingvar Branemark, estudava a micro-circulação do osso de coelhos utilizando uma micro-câmera de titânio. Ao concluir seus estudos, ele descobriu ao remover a micro-câmera, que ela estava rigidamente aderida ao osso circundante.⁵

Após investigações mais aprofundadas, esta interação entre o osso e o titânio foi identificada como osseointegração.⁶ Desde então, a interface osso-implante⁷⁻¹⁴ e as interações de ligas de titânio com o osso¹⁵⁻¹⁷ vem sendo extensamente estudadas.

Implantes dentários foram inicialmente utilizados para reabilitações totais do arco dental inferior.¹⁸ Devido ao sucesso destas reabilitações, o seu uso foi estendido para reabilitar perdas parciais¹⁹⁻²¹ e unitárias.²²⁻²⁵

Apesar das altas taxas de sucesso dos implantes osseointegrados, nas últimas décadas, falhas subótimas ocorriam. Pesquisadores notaram que implantes apresentando mobilidade clínica revelavam pequenas áreas de osso não-mineralizado na região apical e colonização bacteriana na região cervical. Após análise dos dados, os autores sugeriram que os principais fatores etiológicos para falha de implantes eram: carga oclusal excessiva e infecção.²⁶ Adicionalmente, fatores iatrogênicos, incluindo técnica cirúrgica, contribuem para a falha de implantes.

A falha de implantes nos faz perceber as propriedades da dentição natural que não estão presentes nas próteses sobre implantes. O dente natural apresenta o ligamento periodontal, o qual é responsável pela absorção de cargas mecânicas e o sulco crevicular, localizado entre o dente e o osso, o qual possui o fluido crevicular que contém imunoglobulinas e outras substâncias antibacterianas não específicas, formando, desta forma, uma defesa local para controle da população bacteriana.²⁷ A falta de ligamento periodontal e do fluido crevicular, contendo um mecanismo de defesa anti-bacteriano fornecido pela dentição natural, agrava a homeostase do complexo implante-hopedeiro.

Persiste ainda uma necessidade clara de busca de melhores alternativas para as reposições dentárias, objetivando assim, restaurar a homeostase até então apenas fornecida pela dentição natural.

As células tronco foram primeiro descritas nos anos 60.²⁸ Desde então, elas têm sido o alvo de vários estudos reveladores.³¹ Em 1998, James Thomson e colaboradores conseguiram produzir a primeira linhagem de células tronco embrionárias humana na Universidade de Wisconsin, Madison.³¹ O uso de células tronco embrionárias é controverso, por outro lado, as células tronco de adulto, ou somáticas, não apresentam tal restrição e

conseqüentemente são o tópico de investigações sendo feitas mundialmente devido à seu grande potencial em aplicações terapêuticas.

Células tronco de adulto foram isoladas de dentes,³³⁻³⁴ como também da corrente sanguínea,⁴⁵⁻⁴⁶ de outros órgãos e tecidos do corpo,⁴⁷⁻⁴⁹ incluindo o tecido adiposo.⁵⁰ A capacidade de isolar estas células e de induzi-las a iniciarem o desenvolvimento dental poderia ser um grande marco na odontologia regeneradora.

Para alcançar a fabricação de tecidos e a reposição de órgãos, a biologia de desenvolvimento, biologia molecular, biotecnologia e a bioengenharia precisam estar interconectadas. Estudos, embora limitados, indicam a viabilidade de uma abordagem por engenharia dental para se alcançar reposições dentárias, reparo dentário e para o tratamento de doenças periodontais.³³⁻³⁵

TEXTO PRINCIPAL

Reparando parcialmente as estruturas dentárias

Com o advento das pesquisas com células tronco, a restauração biomimética parcial de estruturas dentárias foi abordada.⁵⁷⁻⁶⁰

O dente inclui esmalte, dentin e polpa dental. Após o total desenvolvimento dentário o esmalte não se auto-repara, devido à perda dos ameloblastos, células que produzem esmalte.⁶¹ No entanto, o processo de lesão cariiosa pode ser interrompido fisicoquimicamente pela incorporação de cálcio, fosfato e/ou flúor caso esteja presente no sítio de remineralização do esmalte.⁶²⁻⁶³ Os ameloblastos não mais estão presentes na dentição do adulto; no entanto, existe uma possibilidade de células tronco de adulto se diferenciarem em ameloblastos.⁶⁰

Diferente do esmalte, a dentina é produzida por toda a vida.⁶⁴ A manutenção e reparo da dentina são alcançados por meio da ação secretora dos odontoblastos, os quais estão localizados na periferia da polpa dental. É sabido que estas células respondem à lesões causadas por cárie e por procedimentos restauradores.⁶⁵⁻⁶⁷ Os fatores associados com o reparo da dentina são: 1) a extensão e a duração da lesão; 2) a variabilidade da estrutura da dentina; e 3) a idade do indivíduo.⁶¹ Com o avanço da idade, ocorre deposição de dentina secundária, e conseqüente redução da câmara pulpar em tamanho. Sabe-se que a dentina secundária é produzida por odontoblastos previamente existentes.⁶⁹ Alternativamente, em resposta à danos, fratura dental ou lesões cariosas profundas, a polpa dental pode ser exposta. Esta condição requer tratamento por meio de capeamento direto, que é a colocação de uma restauração provisória à base de hidróxido de cálcio sobre a área exposta. Caso a lesão dentária não seja

exposta, o capeamento indireto pode ser executado. Este procedimento consiste de uma abordagem mais conservadora da lesão cariosa. A remoção de parte, mas não toda, a lesão cariosa e a colocação de um cimento provisório são executados antes de ocorrer a exposição dental. Estes procedimentos visam promover a formação de dentina terciária.⁷⁰ Em pacientes jovens, a polpa dental parece apresentar uma capacidade mais alta de se auto-reparar. Com o avanço da idade os indivíduos apresentam uma resposta regeneradora comprometida.⁷¹ Sugere-se que a origem do material semelhante à dentina pode estar relacionada com os odontoblastos primários, visto que durante o desenvolvimento dentário, apenas as células derivadas da crista neural mostram a capacidade de responder a sinais específicos para se diferenciarem em odontoblastos.⁷² No entanto, vários estudos sugerem que as células progenitoras dos odontoblastos sejam derivadas de células mesenquimais indiferenciadas^{71,73}

A polpa dental tem mostrado alojar células progenitoras que podem ser induzidas a produzir osso e dentina,^{35,36,74} como também as células da crista neural e os adipócitos³⁷ quando isolados e cultivados *in vitro*. Para se alcançar a regeneração de órgãos, células competentes precisam ser coletadas. Células tronco hematopoiéticas (CTH), células tronco da medula óssea (CTMO), células tronco da polpa dental (CTPD) e células tronco do sangue periférico são possíveis fontes que serão revisadas.

Células tronco derivadas da medula óssea

As células tronco derivadas da medula óssea apresentam pelo menos dois tipos de populações distintas.⁷⁵ células tronco hematopoiéticas e mesenquimais. As células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) mantém a linhagem hematopoiética. Estudos *in vitro* mostram que as CTMMO podem se diferenciar em vários tipos celulares, incluindo;

neurônios,⁷⁶ cartilagem,⁷⁷ osso e tecido adiposo.⁷⁸ Estudos *in vivo*, mostram a recuperação de defeitos neurais,⁷⁹ ósseos⁸⁰ e do tecido cardíaco,⁸¹ após deposição local de CTMMO. Uma análise molecular em camundongos mostrou que as CTMMO expressam genes associados com as três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma.⁸² Adicionalmente, uma única CTMMO pode contribuir para a formação do fígado, da medula óssea, da pele e do trato digestivo *in vivo*.⁸³

Um estudo em humanos, utilizando o rastreamento pelo cromossomo *Y*, mostrou que as CTMMO podem contribuir para a formação de vários tecidos no adulto. Este estudo utilizou homens doadores de células da medula óssea e mulheres receptoras. As CTMMO podem ser imunomarcadas pelo cromossomo *Y*. Isso permite que elas sejam rastreadas dentro do hospedeiro após a aplicação de ensaios de imunofluorescência. A autópsia revelou presença de CTMMO rastreadas pelo cromossomo *Y* no fígado, na pele, no trato digestivo e no cérebro.⁸⁴

As células tronco hematopoiéticas (CTH) geram o durável e flexível fenômeno da hematopoiese durante a vida. A divisão constante de uma pequena população de células tronco é necessária para a manutenção da produção regular de células do sangue maduras como também é necessária em resposta ao estresse: infecção ou perda de sangue.⁴⁵ Esta demanda requer que um subgrupo de células tronco esteja se dividindo constantemente sem perder sua multipotencialidade, ou que uma maior população de células tronco quiescentes, as quais apresentam uma capacidade limitada de auto-renovação, estejam se dividindo de forma imprevisível e esporádica.⁴⁵ É sabido que as CTH dividem-se indefinidamente quando transplantadas.⁸⁵

Existem evidências substanciais de que a medula óssea aloja células tronco, no entanto, a coleta das células tronco da medula óssea é um procedimento invasivo. Outros sítios, como a circulação sanguínea, são promissores e mais acessíveis para a coleta de células tronco.

Células tronco da circulação sanguínea

Células progenitoras multipotenciais podem ser identificadas no sangue periférico.⁸⁶⁻⁸⁸ Existe evidências de que as CTMMO deixam a medula óssea e ganham a circulação sanguínea. A imobilização das células tronco do sistema circulatório é um meio menos invasivo para coleta das mesmas.⁸⁹ Adicionalmente, estas células foram identificadas como derivadas do mesênquima. Após a coleta, estas células se diferenciam em células das três camadas germinativas, incluindo macrófagos, linfócitos T, células epiteliais, neurônios e hepatócitos,⁹⁰ como também células hematopoiéticas e cardíacas.⁹¹

Células tronco da polpa dental

Progresso significativo já ocorreu na identificação de células tronco em vários órgãos, incluindo; pele,⁴⁴ tecido neural,⁴³ tecido ósseo,³⁹ polpa dental^{33,35,36,40-42} e ligamento periodontal.⁹³ Os potenciais das células da polpa dental foram analisados *in vitro*, utilizando camundongos transgênicos.⁴² O uso de camundongos transgênicos permite a identificação de nichos de células progenitoras na polpa dental. Este estudo mostrou que durante a fase secretora do desenvolvimento dentário, a proteína transgênica, Collal-GFP, foi encontrada na camada de odontoblastos imaturos. Adicionalmente, esta proteína foi expressa em várias áreas onde ocorria formação dentária durante as fases embrionárias do desenvolvimento dentário.

Estas observações indicam que o uso de camundongos transgênicos é um excelente modelo não invasivo para análise do progresso da diferenciação odontoblástica de células progenitoras.^{36,41}

Enquanto estudando as possíveis origens das células tronco da polpa dental, pesquisadores notaram que, caso o tecido dentário fosse lesado e os odontoblastos sobrevivessem, eles seriam capazes de depositar dentina reacionária. Alternativamente, caso os odontoblastos não sobrevivessem, a polpa dental seria invadida por uma população de células mesenquimais indiferenciadas situadas na região perivascular (pericitos) ou por células mesenquimais formando uma camada subodontoblástica, a qual assume característica odontoblástica.⁹³ Desta forma, enquanto é claro que durante o desenvolvimento, os odontoblastos são derivados da crista neural, o processo de reparo no dente de adulto pode envolver a diferenciação de odontoblastos derivados de outras linhagens celulares.

Características ultra-estruturais da microvascularização do dente foram estudadas pela microscopia de transmissão eletrônica.⁹⁴ Este estudo revelou que a polpa dental é rica em capilares consistindo de células endoteliais, células transitórias, fibroblastos e pericitos. Os nichos para as células tronco foram estudados na polpa dental.⁹³ Células tronco da polpa dental (CTPD) foram isoladas utilizando o anticorpo para STRO-1, o qual reconhece um antígeno para células perivasculares. As CTPD STRO-1 positivas também foram positivas para a expressão de antígenos vasculares (CD146, α -actina de musculatura lisa) e para o antígeno associados com o pericito (3G5), células da musculatura lisa dos vasos. A capacidade de diferenciação e proliferação dos pericitos esta sendo estudada objetivando criar terapias à base de células tronco para a resolução de problemas mais eficientemente.^{93,94}

Reposição dentárias

Próteses parciais podem ser utilizadas para repor dentes perdidos. A maior parte dos pacientes prefere uma solução fixa para o problema. Próteses fixas podem ser a solução, no entanto, para serem permanentemente cimentadas, precisa-se desgastar os dentes vizinhos. A forma mais conservadora de repor dentes perdidos de forma fixa é por meio de próteses sobre implantes dentários. No entanto, comparando com a dentição natural, o implante dentário está mais propenso a falhas mecânicas e biológicas. A certo ponto, o dente biológico é mais equipado para atenuar ameaças biológicas e de carga mecânica.

Métodos distintos estão sendo estudados objetivando alcançar o desenvolvimento dentário.^{57,58,59,95} Estes incluem a simulação da formação da terceira dentição, a construção de um dente por bioengenharia das diferentes partes que compõem o dente separadamente, semeando arcabouços com forma de dente com células tronco e produzindo dente primordial semelhante ao do embrião por meio de população de células cultivadas *in vitro*. Cada uma destas abordagens apresentam vantagens e desvantagens e apenas o tempo e pesquisas com grande investimento financeiro revelarão qual, se alguma, será bem sucedida e mais importante, reproduzível na clínica dentária. Nosso laboratório tem concentrado predominantemente em tentar produzir um dente primordial, como ele ocorre no embrião, de células que possam crescer e manter-se em cultura. Esta abordagem é baseada na reprodução do processo natural de formação dentária na boca do adulto para que o dente e todos os tecidos de suporte associados com o mesmo possam formar-se naturalmente.

Sabendo que o desenvolvimento dentário ocorre por meio de uma cascata de sinalizações recíprocas provindas do epitélio oral para o mesênquima subjacente,⁵² princípios básicos da embriologia oral foram utilizados na tentativa de gerar dentes. Sabendo que a

formação dentária ocorre por meio de interações entre o epitélio oral embrionário e o ectomesênquima subjacente, a substituição do ectomesênquima por células tronco de adulto poderia resultar em formação dentária? Objetivando provar este princípio, pesquisadores dissecaram o epitélio embrionário antes do início da formação dentária e substituíram o ectomesênquima subjacente por células tronco de adulto de origem não-dentária. Esta técnica resultou na formação de dentes de camundongos.³⁹ O sucesso de qualquer método para produção de dentes naturais para reposição depende da capacidade do dente, ou dos dentes primordiais, formar coroas e raízes funcionais na cavidade oral. A capacidade extraordinária do germe dentário formar dentes após transplante na cavidade oral, primeiro demonstrado por Ohazama e colaboradores,³⁹ indicou que os dentes podem se desenvolver no ambiente da cavidade oral de adulto.

Nas últimas décadas, a base do conhecimento molecular para controle da seqüência do desenvolvimento dentário foi adquirida.⁹⁶⁻¹⁰⁴

CONCLUSÃO

A odontologia clínica tem tomado uma abordagem prática na tentativa de resolução dos problemas diários da clínica odontológica. O hidróxido de cálcio é utilizado para promoção da dentinogênese embora seu mecanismo de ação não seja bem conhecido. Ainda existem obstáculos óbvios para serem superados antes que a reposição de dentes perdidos, ausentes ou danificados possa ser feita por engenharia tecidual. No entanto, as aplicações futuras resultantes da odontologia regeneradora são promissoras. O resultado final da terapia perfeita será quando a clínica odontológica e as ciências básicas se encontrarem.

REFERÊNCIAS

- 1- Coleman AI. A syllabus in the study of history of dentistry. USC COD, LA. 1970;5,12.
- 2- Asbell MB. Dentistry: A historical perspective. Bryn Mawr, Penn. Dorrance-Company, Inc. 1988:45,52,60.
- 3- Atilla G. A rare find in Anatolia - A tooth implant (mid-sixth century B.C.). *J Oral Implant.* 1993;XIX:54-57.
- 4- Ring ME. Pause for a moment in dental history: A thousand years of dental implants: A definitive history - Part 1. *Compendium* 1995;16:1060-1069.
- 5- Branemark P-I. Bone marrow microvascular structure and function. *Adv Microbiol*, 1968 1: 1-65.
- 6- Branemark P-I, Breine U, Adel R, Hanson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prosthesis. Part I: experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1969; 3:81-100.
- 7- Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, 1981;9:15-25.
- 8- Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, editors. *Skeletal trauma*. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p 31-75.
- 9- Johansson CB, Roser K, Bolind P, Donath K, Albrektsson T. Bone-tissue formation and integration of titanium implants: an evaluation with newly developed enzyme and immunohistochemical techniques. *Clin Implant Dent Relat Res*, 1999;1:33-40.
- 10- Ruggeri A Jr, Strocchi R, Franchi M, et al. Peri-implant medullary cisternae at the interface of bone-smooth surface titanium endosseous implant. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol.* 1999; 41:104-111.
- 11- Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, et al. Titanium metals form a direct bonding to bone after alkali and heat treatments. *Biomaterials*, 2001;22:2525-2533.
- 12- Proussaefs P, Lozada J, Ojano M. Histologic evaluation of threaded HÁ-coated root-form implants after 3.5 to 11 years of function: a report of three cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2001;21:21-29.
- 13- Hirai H, Okumura A, Goto M, Katsuki T. Histologic study of the bone adjacent to titanium bone screws used for mandibular fracture treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 2001;59:531-537.

- 14- Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Marinho VC, Corigliano M, Piattelli A. Immediate postextraction implants: a histologia and histometric analysis in monkeys. *J Oral Implantol*, 2000;26:163-169.
- 15- Lavos-Valereto IC, Wolyneec S, Deboni MC, Konig B Jr. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxiapatite coating. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:727-733.
- 16- Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:350-357.
- 17- Esenwein SA, Esenwein S, Herr G, Muhr G, Kusswetter W, Hartwig CH. Osteogenic activity of BMP-3 coated titanium specimens of different surface textures at the orthotopic implant bed of giant rabbits. *Chirurg*, 2001; 72:1360-1368.
- 18- Branemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year study period. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1977; 16:1-132.
- 19- Schnitman PA, Rubenstein JE, Woehrle PS, Da Silva JD, Koch GG. Implants for partial edentulism. *J Dental Edu*. 1988;52:725-736.
- 20- Carlson BR, Yontchev E. Long-term observations of extensive fixed partial dentures on mandibular canine teeth. *J Oral Rehabil*. 1996;23:163-169.
- 21- Olson JW, Dent CD, Morris HF, Ochi S. Long-term assessment (5 to 71 months) of endosseous dental implants placed in the augmented maxillary sinus. *Ann Periodontol*. 2000;5:152-156.
- 22- Weiss MB, Rostoker W. Development of a new endosseous dental implant. Part II: Human studies. *J Prosthet Dent*. 1982;47:633-645.
- 23- Voitik AJ. The single missing tooth: conventional fixed and removable solution capabilities are expanded with implant supported restorations. *Trends Tech Contemp Dent Lab*. 1989;6:42-47.
- 24- Ohnell LO, Hirsch JM, Ericsson I, Branemark PI. Single tooth replacement with aid of osseointegration: a modified surgical prosthetic procedure. *Quintessenz*. 1989;40:1403-1411.
- 25- Van Beek GJ, Versteegh PA, Van der Veld RG, et al. The single, hollow titanium cylinder implant (I.T.I.) *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 1989;96:95-99.
- 26- Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Sennerby L, Lekholm U. Histopathologic observations on late implant failures. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2000; 2:18-32.

- 27- Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* 3rd ed., Munksgaard, Copenhagen, pages 973,1997.
- 28- Altman J, Das GD. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature*. 1964; 204:1161–1163.
- 29- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physio*. 1963; 62: 327-336.
- 30- Prindull G, Prindull B, Meulen N. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand*. 1978 Jul;67(4):413-6.
- 31- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-737.
- 32- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
- 33- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13625–13630.
- 34- Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81:531-535.
- 35- Batouli S, Miura M, Brahimi J, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003; 82:976-981.
- 36- Braut A, Kollar EJ, Mina M. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp *in vivo* using a Col1a1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol*. 2003;47:281-292.
- 37- Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 5807–5812.
- 38- Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons *in vitro*; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004;19:2388-2398.
- 39- Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*. 2004a;83:518-522.
- 40- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29:532–539.
- 41- Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs*. 2004;176:120–133.

- 42- Balic A, Mina M. Analysis of developmental potentials of dental pulp in vitro using GFP transgenes. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8:252-8.
- 43- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol.* 2006;494(3):415-434.
- 44- Xie XF, Jia CY, Fu XB, Liu HX. Isolation, culture and identification of adult epidermal stem cells. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2006;18:46-8.
- 45- Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene.* 2002; 21: 3403-3413.
- 46- Paczkowska E, Larysz B, Rzeuski R, et al. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol.* 2005;75:461-467.
- 47- Altman J and Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965; 124: 319-335.
- 48- Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005;7: 86-95.
- 49- Murrell W, Feron F, Wetzig A, et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005;233: 496-515.
- 50- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13: 4279-4295.
- 51- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920–926.
- 52- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997; 67:111-123.
- 53- Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *Biomater Sci Polymer Ed.* 1998: 9: 749–764.
- 54- Thomas BL, Sharpe PT. Patterning of the murine dentition by homeobox genes. *Eur. J. Oral. Sci.* 1998; 106, 48-54.
- 55- Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52: 443–451.
- 56- Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2004;61:113–34.

- 57- Young CS, Kim SW, Qin C, et al. Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol.* 2005a;50:259-265.
- 58- Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004;83:523-528.
- 59- Young CS, Abukawa H, Asrican R, et al. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng.* 2005b;11:1599-1610.
- 60- Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, et al. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res.* 2006;85:416-421.
- 61- Ten Cate AR, ed. Oral histology – development, structure, and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, Inc. 1998:78-103.
- 62- Ripa LW. Occlusal sealants: rationale and review of clinical trials. *Int Dent J.* 1980;30:127-139.
- 63- Ripa LW. Sealants revisited: an update of the effectiveness of pit-and-fissure sealants. *Caries Res.* 1993;27(suppl 1):77-82.
- 64- Linde, A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res.* 1985; 64:523–529.
- 65- Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N et al. Odontoblast stimulation of ferrets by dentin matrix components. *Arch Oral Biol.* 1994;39:13–22.
- 66- Robertson A, Lundgren T, Andreasen JO, Dietz W, Hoyer I, Noren JG. Pulp calcifications in traumatized primary incisors: a morphological and inductive analysis study. *Eur J Oral Sci.* 1997;105:196–206.
- 67- About I, D Laurent-Maquin, U Lendahl et al. Nestin expression in embryonic and adult teeth under normal and physiological conditions. *Am J Pathol.* 2000;157: 287–295.
- 68- Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res.* 1992;100:193-199.
- 69- Nakamura Y, Hammarstrom L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J.* 2002;35:407-417.
- 70- Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent.* 2005;33:639-647.
- 71- Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem cells and Development.* 2004;13:255-262.

- 72- Ruch JV. Patterned distribution of differentiating dental cells: fact and hypotheses. *Journal de Biologie Buccale*. 1990;18:91–98.
- 73- Feit J, Metelova M, Sindelka Z. Incorporation of 3H-thymidine into damaged pulp. *J Dent Res*. 1970; 49:783–786.
- 74- 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; 8:191–199.
- 75- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418, 41-49.
- 76- Scintu F, Reali C, Pillai R, et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci*. 2006;7:14.
- 77- Park IK, Qian D, Kiel M, et al. BMI-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003; 423: 302-305.
- 78- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
- 79- Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W.. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 2002; 30:215-222.
- 80- Yano S, Kuroda S, Lee JB, et al. *In vivo* fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatic injury model of rat spinal cord. *J Neurotrauma*. 2005;22:907-918.
- 81- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428:668-673.
- 82- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*. 2002; 96, 908-917.
- 83- Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-377.
- 84- Körbling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 738-746.

- 85- Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Aguero B, Eder P, Srour EF. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol.* 1996 Aug;24(10):1215-24.
- 86- Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kitligand. *Cell.* 2002;109:625–637.
- 87- Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz.* 2002;27:579-588.
- 88- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/ macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003; 107: 1164–1169.
- 89- Kessinger A, Sharp JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 319-329.
- 90- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. *et al.* A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100, 2426-2431.
- 91- Abuljadayel IS. Induction of stem cell-like plasticity in mononuclear cells derived from unmobilised adult human peripheral blood. *Current Medical Research and Opinion.* 2003;19:355–375.
- 92- Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-155.
- 93- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18:696-704.
- 94- Carlile 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;32:239-245.
- 95- Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structure on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81: 695–700.
- 96- Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development.* 1998;125:2803-2811.
- 97- Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:4520–4524.

- 98- Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech Dev.* 2002;119 Suppl 1:S107-110.
- 99- Courtney JM, Blackburn J, Sharpe PT. The Ectodysplasin and NFkappaB signalling pathways in odontogenesis. *Arch Oral Biol.* 2005;50:159-163.
- 100- Cobourne MT, Miletich I, Sharpe PT. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development* 2004;131:2875-2885.
- 101- Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72:200-212.
- 102- Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res.* 2004b;83:241-244.
- 103- Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol.* 2004;268:185-194.
- 104- Mitsiadis TA, Angeli I, James C, Lendahl U, Sharpe PT. Role of Islet1 in the patterning of murine dentition. *Development.* 2003;130:4451-4460.

MANUSCRIPT 2**Implantology: past, present, and future**

This review is formatted according to the author's guidelines for the *Journal of Oral Research*.

ABSTRACT

Implantology is by no means a recent development in dentistry. It has existed in various forms since the time of the ancient Egyptian civilization. From precious stones to titanium implants dental practitioners have strived to rehabilitate or repair the lost, missing or injured tooth. Today with the advent of stem cell research, there exists the possibility of developing complete biological replacement teeth in the foreseeable future.

INTRODUCTION

Since prehistoric times, mankind has been concerned with tooth replacement methods, even predating tooth repairing techniques. In Egypt, 2500BC,¹ a prosthesis made out of gold wiring, attached to adjacent teeth, was used to hold two pontics. Decorative stones², calcite,³ carved shells,⁴ bone, ivory, and tooth transplantations² were all employed towards this goal.

The first modern style implant was created in 1809⁴ using a gold implant as an artificial root retained in the bone by prongs, over which a crown was placed. Since then, implants have been made out of various materials and shapes but always presented problems due to lack of biocompatibility with the organism.

In the 1950s, the orthopedic surgeon, Prof. Per-Ingvar Branemark, was studying the microcirculation of the bone in rabbits using titanium micro-cameras. At the conclusion of the study he discovered while removing the micro-camera that it was rigidly attached to the surrounding bone.⁵

Upon further investigation this interaction between bone and titanium was identified as osseointegration.⁶ Since then, the interface titanium-implant⁷⁻¹⁴ and the interactions of titanium alloys with bone¹⁵⁻¹⁷ have been extensively studied.

Dental implants were initially used to rehabilitate the full mandibular arch.¹⁸ Due to the success of dental implant rehabilitations, their use was extended to rehabilitate partial¹⁹⁻²¹ and single tooth replacements.²²⁻²⁵

In spite of the high success rate of osseointegrated oral implants over the past few decades, suboptimal failures occur. Investigators have noticed that implants with clinical mobility revealed minute areas of non-mineralized bone in the apical region, and bacterial

colonization in the cervical region. Upon data analysis the authors suggested that the main etiological factors for implant failure were: excessive occlusal loading and infection.²⁶ Additionally, iatrogenic factors, including surgical techniques, contribute to implant failure.

Implant failures give us insights into properties of natural dentition not possessed by dental implants. The natural tooth has the periodontal ligament, which is responsible for mechanical stress absorption and the crevicular sulcus, located between the tooth and the bone, which contains the crevicular fluid with immunoglobulins and other non-specific antibacterial substances forming a local defense mechanism to control bacterial population.²⁷ The lack of periodontal ligament and crevicular fluid containing the anti-bacterial defense mechanism provided by the natural dentition, aggravates the homeostasis of the complex implant-host.

There remains a clear need to search for better alternatives for tooth replacements to restore the homeostasis as yet only provided by the natural dentition.

Stem cells were first described in the 1960s.²⁸ From then, they have been the focus of many revealing studies.³¹ In 1998, James Thomson and coworkers managed to derive the first human embryonic stem cell line at the University of Wisconsin, Madison.³² The use of embryonic stem cells is controversial, in contrast, adult or somatic stem cells present no such reservations and consequently are the subject of widespread investigation due to their great potential and therapeutic applications.

Adult stem cells have been isolated from teeth³³⁻³⁴ as well as blood,^{45,46} other organs and tissues of the body,⁴⁷⁻⁴⁹ including adipose tissue.⁵⁰ The capacity to isolate these cells and induce them to initiate tooth development would be a breakthrough in regenerative dentistry.

To achieve the fabrication of tissues and replacement organs, developmental biology, molecular biology, biotechnology and bioengineering need to be interconnected.⁵¹⁻⁵⁷ Studies, although limited, indicate the viability of a dental engineering approach for tooth replacement, tooth repair and for treating periodontal diseases.³³⁻³⁵

MAIN TEXT

Repairing partial tooth structures

With the advent of stem cell research, the biomimetic restoration of partial teeth structures has been approached.⁵⁷⁻⁶⁰

The tooth is comprised of enamel, dentine and the dental pulp. The enamel does not repair itself, due to the loss of the ameloblasts, cells that produce enamel, after a tooth is fully developed.⁶¹ However, the carious process can be interrupted physiochemically by calcium, phosphate and/or fluoride incorporation if present in the remineralizing enamel site.^{62,63} The ameloblasts are no longer present in the adult dentition; however, the possibility of differentiating adult stem cells into ameloblasts is a possibility.⁶⁰

Unlike enamel, dentin is produced throughout a lifetime.⁶⁴ Dentin maintenance and repair are reached by means of the secretory action of the odontoblasts, which are localized in the periphery of the dental pulp. It is known that these cells respond to injuries caused by carious lesions and restorative procedures.⁶⁵⁻⁶⁷ The factors associated to dentin repair are: 1) the extension and duration of the injury; 2) the variability of the dentine structure; and, 3) the age of the tooth.⁶¹ With the advance in age, secondary dentin is deposited, consequently, the pulp chamber reduces in size.⁶⁸ The secondary dentine is known to be produced by previously existing odontoblasts.⁶⁹ Alternatively, in response to injury, tooth fracture, or deep carious lesions, the dental pulp can be exposed. This condition requires treatment by means of a direct capping procedure, which is the placement of a dressing material, calcium hydroxide based, over the exposed area. If the dental lesion has not resulted in pulp exposure, an indirect

capping procedure can be conducted. This procedure consists of a more conservative approach to the carious lesion. Removal of great part but not all the carious tissue and the placement of a dressing material is done before the pulp exposure occurs. These procedures aim to promote tertiary dentine formation.⁷⁰ In young patients, the dental pulp seems to have a higher capacity to repair itself. Older patients present a compromised regenerative response.⁷¹ It has been suggested that the origins of the dentine-like material could be related to the primary odontoblasts, since during tooth development, only the neural crest-derived cells show the capacity to respond to specific signaling to differentiate into odontoblasts.⁷² However many studies suggest that the progenitor cells of the odontoblasts are derived from undifferentiated mesenchymal cells.^{71,73}

The dental pulp has shown to lodge progenitor cells that can be induced to produce bone and dentin,^{35,36,74} in addition to neural cells and adipocytes³⁷ when isolated and cultured *in vitro*. In order to achieve organ regeneration, competent cells need to be harvested. Hematopoietic stem cells (HSC), bone marrow stem cells (BMSC), dental pulp stem cells (DPSC) and circulating stem cells (CSC) are possible sources that will be reviewed.

Bone marrow derived stem cells

Bone marrow contains at least two types of distinguishable stem cell populations;⁷⁵ hematopoietic and mesenchymal stem cells. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) sustain the hematopoietic lineage. *In vitro* studies show that BMSC can differentiate into many cell types, including neural cells,⁷⁶ cartilage,⁷⁷ bone and adipose tissue.⁷⁸ *In vivo* studies show the recovery of neural defects,⁷⁹ bone⁸⁰ and cardiac tissue⁸¹ with local deposition of BMSC. A molecular analysis in mice showed that BMSC express genes associated with the

three germ layers: ectoderm, mesoderm and endoderm.⁸² Additionally, a single BMSC can contribute to liver, bone marrow, skin and digestive tract formation *in vivo*.⁸³

A study in humans, using *Y* chromosome tracking, showed that the BMSC can contribute to many adult tissues. This study used men donors of BMSC and women hosts. The BMSC can be marked by the *Y* chromosome with immunofluorescence. This permits them to be traced inside the hosts by fluorescence assays. Autopsy revealed the presence of BMSC traced by the *Y* chromosome in the liver, skin, digestive tract and brain.⁸⁴

The hematopoietic stem cells (HSC) give rise to the durable and flexible phenomena of hematopoiesis during life. The constant division of a small population of stem cells is necessary to maintain a regular production of mature blood cells as well as in response to stress: infection or blood loss.⁴⁵ This demand requires either a subgroup of stem cells constantly dividing without losing their multipotentiality or a greater population of quiescent stem cells, which present a limited capacity to auto-renew, dividing in an unpredictable and sporadic way.⁴⁵ HSC are known to divide indefinitely when transplanted.⁸⁵

There is thus substantial evidence that bone marrow harbors stem cells, however, the harvesting of bone marrow stem cells is an invasive procedure. Other sites, such as the circulatory system, are promising and more accessible for harvesting stem cells.

Stem cells in the circulatory system

Multipotent progenitor cells can be identified in the peripheral blood.⁸⁶⁻⁸⁸ There is evidence that BMSC leave the bone marrow and reach the circulatory system. The immobilization of stem cells in the circulatory system is a less invasive source of harvesting

stem cells.⁸⁹ Additionally, these cells have been identified as mesenchymal-derived. After harvesting, these cells differentiated into cells from the three primary germ layers, including; macrophages, *T* lymphocytes, epithelial cells, neural cells and hepatocytes,⁹⁰ as well as hematopoietic, neural and cardiac cells.⁹¹

Stem cells in the dental pulp

Significant progress has occurred in identifying stem cells in various adult organs, including; skin,⁴⁴ neural tissue,⁴³ bone tissue,³⁹ dental pulp^{33,35,36,40-42} and the periodontal ligament.⁹³ The dental pulp cell potentials were analyzed *in vitro*, using transgenic mice.⁴² The use of transgenic mice enabled to identify progenitor stem cell niches in the dental pulp. This study model showed that during the secretory phase of tooth development, the transgenic protein, Collal-GFP, was found in the immature odontoblast layer. Additionally, this protein was expressed in the areas where tooth development was occurring during the embryonic phases of tooth formation. These observations indicate that the use of transgenic mice is an excellent non-invasive model for analysis of the odontoblastic differentiation progress of progenitor cells.^{36,41}

While studying the possible origins of dental pulp stem cells, investigators noticed that if the dental tissue is injured and the odontoblasts survive, they are capable of depositing reactionary dentin. Alternatively, if odontoblasts do not survive, the dental pulp is invaded by a population of undifferentiated mesenchymal cells situated in the perivascular region (pericytes) or by mesenchymal cells forming a sub-odontoblastic layer, which assumes odontoblastic characteristics.⁹³ Thus whereas it is clear that during development, odontoblasts

are derived from neural crest cells, repair processes in the adult tooth may involve differentiation of odontoblasts derived from other cell lineages.

Ultra-structural characteristics of the tooth microvasculature were studied by transmission electron microscopy.⁹⁴ This study revealed that the dental pulp was rich in capillaries composed of endothelial cells, transitional cells, fibroblasts, and pericytes. Niches for mesenchymal stem cells have been studied in the dental pulp.⁹³ DPSC were isolated by immunoselection using STRO-1 antibody, which recognizes an antigen for perivascular cells. STRO-1 positive DPSC were also positive for vascular antigen expression (CD146, α -smooth muscle actin) and a pericyte associate antigen (3G5). The capacity of pericytes, smooth muscle cells, to differentiate and proliferate is being studied in order to create stem cell based therapies to solve dental problems more efficiently.^{93,94}

Replacing a tooth

Partial removable dentures can be used to replace a missing tooth. A great majority of the patients prefer a fixed solution to the problem. Fixed bridges can be a solution, however in order to be permanently cemented, they require grinding of the adjacent teeth. The most conservative way to replace a missing tooth with a fixed prosthesis is by means of a dental implant. However, in comparison to the natural dentition, the dental implant is more prone to mechanical and biological failure. To a certain extent, the biological tooth is more equipped to attenuate biological threat and mechanical loading.

Several different methods have been proposed to achieve biological tooth replacement^{57,58,59,95}. These include stimulation of the formation of a 3rd dentition, the construction of a

tooth by bioengineering the different component parts separately, seeding of tooth-shaped biodegradable scaffolds with stem cells and producing embryonic-like tooth primordium from cultured cell populations. Each of these approaches has advantages and disadvantages and only time and a great deal of well-funded research will reveal which, if any, will be successful and more importantly, usable in the dental clinic. We have predominantly focused on trying to produce a tooth primordium, as it would appear in the early embryo, from cells that can be grown and maintained in culture. This approach is based on reproducing the natural process of tooth formation in the adult mouth so that a tooth and all its associated support tissues, bone, blood vessels, nerves etc. form naturally.

Knowing that tooth development occurs due to a cascade of reciprocal signals from the oral epithelium to the underlying mesenchyme,⁵² basic principals of tooth embryology have been used to attempt to generate new teeth. If tooth formation occurs by means of interactions between the embryonic dental epithelium with the underlying mesenchyme, can the mesenchyme be replaced by adult stem cells resulting in tooth formation? In order to prove this principle, investigators dissected the embryonic epithelium before tooth formation initiated and replaced the underlying mesenchyme with non-dental adult stem cells. This technique resulted in the formation of murine teeth.³⁹ The success of any method for producing natural replacement teeth depends upon the teeth or teeth primordia being able to form crowns and functional roots in the mouth. The remarkable ability of the early tooth germ to form complete teeth following transplantation into the adult mouth, first demonstrated by Ohazama and coworkers³⁹ indicated that teeth can develop in the environment at the adult mouth.

For the last few decades, molecular knowledge base for controlling the sequence of tooth development have been acquired⁹⁶⁻¹⁰⁴

CONCLUSION

Clinical dentistry has taken a practical approach in order to solve the day-to-day problems in the dental clinic. Calcium hydroxide is used to promote dentinogenesis although its mechanism of action was not well understood. There are obvious practical obstacles still to be overcome before the replacement of lost, missing or injured teeth can be done by tissue engineering. However, the future applications resulting from regenerative dentistry are promising. The end result of the perfect therapy will be when clinical dentistry and basic sciences meet.

REFERENCES

- 1- Coleman AI. A syllabus in the study of history of dentistry. USC COD, LA. 1970;5,12.
- 2- Asbell MB. Dentistry: A historical perspective. Bryn Mawr, Penn. Dorrance-Company, Inc. 1988:45,52,60.
- 3- Atilla G. A rare find in Anatolia - A tooth implant (mid-sixth century B.C.). *J Oral Implant.* 1993;XIX:54-57.
- 4- Ring ME. Pause for a moment in dental history: A thousand years of dental implants: A definitive history - Part 1. *Compendium* 1995;16:1060-1069.
- 5- Branemark P-I. Bone marrow microvascular structure and function. *Adv Microbiol*, 1968 1: 1-65.
- 6- Branemark P-I, Breine U, Adel R, Hanson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intraosseous anchorage of dental prosthesis. Part I: experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1969; 3:81-100.
- 7- Schroeder A, van der Zypen E, Stich H, Sutter F. The reactions of bone, connective tissue and epithelium to endosteal implants with titanium sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg*, 1981;9:15-25.
- 8- Schenk RK. Biology of fracture repair. In: Browner BD, Jupiter JB, Levine AM, Trafton PG, editors. *Skeletal trauma*. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p 31-75.
- 9- Johansson CB, Roser K, Bolind P, Donath K, Albrektsson T. Bone-tissue formation and integration of titanium implants: an evaluation with newly developed enzyme and immunohistochemical techniques. *Clin Implant Dent Relat Res*, 1999;1:33-40.
- 10- Ruggeri A Jr, Strocchi R, Franchi M, et al. Peri-implant medullary cisternae at the interface of bone-smooth surface titanium endosseous implant. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol.* 1999; 41:104-111.
- 11- Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, et al. Titanium metals form a direct bonding to bone after alkali and heat treatments. *Biomaterials*, 2001;22:2525-2533.
- 12- Proussaefs P, Lozada J, Ojano M. Histologic evaluation of threaded HA-coated root-form implants after 3.5 to 11 years of function: a report of three cases. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 2001;21:21-29.
- 13- Hirai H, Okumura A, Goto M, Katsuki T. Histologic study of the bone adjacent to titanium bone screws used for mandibular fracture treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 2001;59:531-537.

- 14- Scarano A, Iezzi G, Petrone G, Marinho VC, Corigliano M, Piattelli A. Immediate postextraction implants: a histologia and histometric analysis in monkeys. *J Oral Implantol*, 2000;26:163-169.
- 15- Lavos-Valereto IC, Wolyneec S, Deboni MC, Konig B Jr. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility testing of Ti-6Al-7Nb alloy with and without plasma-sprayed hydroxiapatite coating. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:727-733.
- 16- Klokkevold PR, Johnson P, Dadgostari S, Caputo A, Davies JE, Nishimura RD. Early endosseous integration enhanced by dual acid etching of titanium: a torque removal study in the rabbit. *Clin Oral Implants Res*. 2001;12:350-357.
- 17- Esenwein SA, Esenwein S, Herr G, Muhr G, Kusswetter W, Hartwig CH. Osteogenic activity of BMP-3 coated titanium specimens of different surface textures at the orthotopic implant bed of giant rabbits. *Chirurg*, 2001; 72:1360-1368.
- 18- Branemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year study period. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 1977; 16:1-132.
- 19- Schnitman PA, Rubenstein JE, Woehrl PS, Da Silva JD, Koch GG. Implants for partial edentulism. *J Dental Edu*. 1988;52:725-736.
- 20- Carlson BR, Yontchev E. Long-term observations of extensive fixed partial dentures on mandibular canine teeth. *J Oral Rehabil*. 1996;23:163-169.
- 21- Olson JW, Dent CD, Morris HF, Ochi S. Long-term assessment (5 to 71 months) of endosseous dental implants placed in the augmented maxillary sinus. *Ann Periodontol*. 2000;5:152-156.
- 22- Weiss MB, Rostoker W. Development of a new endosseous dental implant. Part II: Human studies. *J Prosthet Dent*. 1982;47:633-645.
- 23- Voitik AJ. The single missing tooth: conventional fixed and removable solution capabilities are expanded with implant supported restorations. *Trends Tech Contemp Dent Lab*. 1989;6:42-47.
- 24- Ohnell LO, Hirsch JM, Ericsson I, Branemark PI. Single tooth replacement with aid of osseointegration: a modified surgical prosthetic procedure. *Quintessenz*. 1989;40:1403-1411.
- 25- Van Beek GJ, Versteegh PA, Van der Veld RG, et al. The single, hollow titanium cylinder implant (I.T.I.) *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 1989;96:95-99.
- 26- Esposito M, Thomsen P, Ericson LE, Sennerby L, Lekholm U. Histopathologic observations on late implant failures. *Clin Implant Dent Relat Res*, 2000; 2:18-32.

- 27- Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* 3rd ed., Munksgaard, Copenhagen, pages 973,1997.
- 28- Altman J, Das GD. Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature*. 1964; 204:1161–1163.
- 29- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physio*. 1963; 62: 327-336.
- 30- Prindull G, Prindull B, Meulen N. Haematopoietic stem cells (CFUc) in human cord blood. *Acta Paediatr Scand*. 1978 Jul;67(4):413-6.
- 31- Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; 3:730-737.
- 32- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282:1145-1147.
- 33- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:13625–13630.
- 34- Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81:531-535.
- 35- Batouli S, Miura M, Brahimi J, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*. 2003; 82:976-981.
- 36- Braut A, Kollar EJ, Mina M. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a Col1a1-2.3-GFP transgene. *Int J Dev Biol*. 2003;47:281-292.
- 37- Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100: 5807–5812.
- 38- Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implications for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2004;19:2388-2398.
- 39- Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*. 2004a;83:518-522.
- 40- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29:532–539.
- 41- Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs*. 2004;176:120–133.

- 42- Balic A, Mina M. Analysis of developmental potentials of dental pulp in vitro using GFP transgenes. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8:252-8.
- 43- Quinones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol.* 2006;494(3):415-434.
- 44- Xie XF, Jia CY, Fu XB, Liu HX. Isolation, culture and identification of adult epidermal stem cells. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue.* 2006;18:46-8.
- 45- Steinman RA. Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene.* 2002; 21: 3403-3413.
- 46- Paczkowska E, Larysz B, Rzeuski R, et al. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol.* 2005;75:461-467.
- 47- Altman J and Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965; 124: 319-335.
- 48- Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005;7: 86-95.
- 49- Murrell W, Feron F, Wetzig A, et al. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005;233: 496-515.
- 50- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13: 4279-4295.
- 51- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993;260:920–926.
- 52- Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 1997; 67:111-123.
- 53- Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *Biomater Sci Polymer Ed.* 1998: 9: 749–764.
- 54- Thomas BL, Sharpe PT. Patterning of the murine dentition by homeobox genes. *Eur. J. Oral. Sci.* 1998; 106, 48-54.
- 55- Stock UA, Vacanti JP. Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 2001; 52: 443–451.
- 56- Levenberg S, Langer R. Advances in tissue engineering. *Curr Top Dev Biol* 2004;61:113–34.

- 57- Young CS, Kim SW, Qin C, et al. Developmental analysis and computer modelling of bioengineered teeth. *Arch Oral Biol.* 2005a;50:259-265.
- 58- Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *J Dent Res.* 2004;83:523-528.
- 59- Young CS, Abukawa H, Asrican R, et al. Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng.* 2005b;11:1599-1610.
- 60- Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, et al. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res.* 2006;85:416-421.
- 61- Ten Cate AR, ed. Oral histology – development, structure, and function. 5th ed. St Louis: Mosby-Year Book, Inc. 1998:78-103.
- 62- Ripa LW. Occlusal sealants: rationale and review of clinical trials. *Int Dent J.* 1980;30:127-139.
- 63- Ripa LW. Sealants revisited: an update of the effectiveness of pit-and-fissure sealants. *Caries Res.* 1993;27(suppl 1):77-82.
- 64- Linde, A. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. *J Dent Res.* 1985; 64:523–529.
- 65- Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N et al. Odontoblast stimulation of ferrets by dentin matrix components. *Arch Oral Biol.* 1994;39:13–22.
- 66- Robertson A, Lundgren T, Andreasen JO, Dietz W, Hoyer I, Noren JG. Pulp calcifications in traumatized primary incisors: a morphological and inductive analysis study. *Eur J Oral Sci.* 1997;105:196–206.
- 67- About I, D Laurent-Maquin, U Lendahl et al. Nestin expression in embryonic and adult teeth under normal and physiological conditions. *Am J Pathol.* 2000;157: 287–295.
- 68- Solheim T. Amount of secondary dentin as an indicator of age. *Scand J Dent Res.* 1992;100:193-199.
- 69- Nakamura Y, Hammarstrom L, Matsumoto K, Lyngstadaas SP. The induction of reparative dentine by enamel proteins. *Int Endod J.* 2002;35:407-417.
- 70- Koliniotou-Koumpia E, Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent.* 2005;33:639-647.
- 71- Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem cell responses in tooth regeneration. *Stem cells and Development.* 2004;13:255-262.

- 72- Ruch JV. Patterned distribution of differentiating dental cells: fact and hypotheses. *Journale de Biologie Buccale*. 1990;18:91–98.
- 73- Feit J, Metelova M, Sindelka Z. Incorporation of 3H-thymidine into damaged pulp. *J Dent Res*. 1970; 49:783–786.
- 74- 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; 8:191–199.
- 75- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418, 41-49.
- 76- Scintu F, Reali C, Pillai R, et al. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci*. 2006;7:14.
- 77- Park IK, Qian D, Kiel M, et al. BMI-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003; 423: 302-305.
- 78- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
- 79- Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W.. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. 2002; 30:215-222.
- 80- Yano S, Kuroda S, Lee JB, et al. *In vivo* fluorescence tracking of bone marrow stromal cells transplanted into a pneumatic injury model of rat spinal cord. *J Neurotrauma*. 2005;22:907-918.
- 81- Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428:668-673.
- 82- Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*. 2002; 96, 908-917.
- 83- Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001;105:369-377.
- 84- Körbling M, Katz RL, Khanna A, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346: 738-746.

- 85- Leemhuis T, Yoder MC, Grigsby S, Aguero B, Eder P, Srour EF. Isolation of primitive human bone marrow hematopoietic progenitor cells using Hoechst 33342 and Rhodamine 123. *Exp Hematol.* 1996 Aug;24(10):1215-24.
- 86- Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kitligand. *Cell.* 2002;109:625–637.
- 87- Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz.* 2002;27:579-588.
- 88- Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/ macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation.* 2003; 107: 1164–1169.
- 89- Kessinger A, Sharp JG. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 319-329.
- 90- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. *et al.* A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100, 2426-2431.
- 91- Abuljadayel IS. Induction of stem cell-like plasticity in mononuclear cells derived from unmobilised adult human peripheral blood. *Current Medical Research and Opinion.* 2003;19:355–375.
- 92- Seo BM, Miura M, Gronthos S, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004;364:149-155.
- 93- Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18:696-704.
- 94- Carlile 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;32:239-245.
- 95- Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structure on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.* 2002;81: 695–700.
- 96- Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development.* 1998;125:2803-2811.
- 97- Sarkar L, Cobourne M, Naylor S, Smalley M, Dale T, Sharpe PT. Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:4520–4524.

- 98- Yamashiro T, Aberg T, Levanon D, Groner Y, Thesleff I. Expression of Runx1, -2 and -3 during tooth, palate and craniofacial bone development. *Mech Dev.* 2002;119 Suppl 1:S107-110.
- 99- Courtney JM, Blackburn J, Sharpe PT. The Ectodysplasin and NFkappaB signalling pathways in odontogenesis. *Arch Oral Biol.* 2005;50:159-163.
- 100- Cobourne MT, Miletich I, Sharpe PT. Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development* 2004;131:2875-2885.
- 101- Miletich I, Sharpe PT. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2004;72:200-212.
- 102- Ohazama A, Courtney JM, Sharpe PT. Opg, Rank, and Rankl in tooth development: co-ordination of odontogenesis and osteogenesis. *J Dent Res.* 2004b;83:241-244.
- 103- Tucker AS, Headon DJ, Courtney JM, Overbeek P, Sharpe PT. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev Biol.* 2004;268:185-194.
- 104- Mitsiadis TA, Angeli I, James C, Lendahl U, Sharpe PT. Role of Islet1 in the patterning of murine dentition. *Development.* 2003;130:4451-4460.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

GLOSSÁRIO

Angiogenese – Processo pelo qual ocorre degradação da parede celular dos vasos sanguíneos e invasão de células endoteliais para dentro do tecido peri-vascular (Pudliszewsky e Pardanaud, 2005).

Célula Mesenquimal – É uma célula não-sanguínea derivada dos órgãos hematopoiéticos, como da medula óssea ou do fígado do feto, capacitada em sustentar o crescimento de células do sangue, *in vitro*. As células mesenquimais que produzem esta matriz dentro da medula óssea também são derivadas das células tronco mesenquimal (*National Institutes of Health* – Atualização realizada em setembro de 2002).

Célula Tronco – São células primordiais que mantêm a capacidade de se autorrenovar por meio de divisão celular e podem se diferenciar em uma grande gama de tipos celulares especializados (http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell).

Células Tronco Mesenquimais ou Células tronco da Medula Óssea – São células tronco multipotentes que podem se diferenciar em uma variedade de tipos celulares (http://en.wikipedia.org/wiki/Mesenchymal_stem_cells).

Explante – Um fragmento de tecido transplantado do seu sítio original e mantido em um meio artificial (Freshney, 2000).

Quimérico – Composto de partes de diferentes origens (The American Heritage®, Stedmen's medical dictionary, 2nd Edition, 2004).

Sistema retículoendotelial – Parte do sistema imunológico, consiste das células fagocíticas localizadas no tecido conjuntivo reticular, primariamente monócitos e macrófagos, estas células se acumulam nos linfonodos e no baço. As células de Kupffer do fígado e os histiócitos dos tecidos também são parte do sistema retículoendotelial (http://en.wikipedia.org/wiki/Reticuloendothelial_system).

Vacuologese – Formação de novos vasos sanguíneos onde não existiam previamente. Neste processo angioblastos migram e se diferenciam em resposta a fatores de crescimento. Estas redes vasculares podem estender-se posteriormente por meio de angiogênese (Pudliszewsky e Pardanaud, 2005).

APÊNDICE 2

RECOMENDAÇÃO DO FABRICANTE PARA USO DO KIT PERKIN/ELMER UTILIZADO NO EXPERIMENTO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os slides submetidos ao método de imunofluorescência foram embebidos em solução de PBS a 36° C por 35 minutos para a remoção da gelatina. Em seguida os slides foram aquecidos em solução tampão de fosfato em pH 8 e colocados em microondas em potência total por 5 minutos para a restauração dos antígenos de superfície. Esta etapa foi repetida duas vezes. Em seguida, foram colocados em solução de 30% de peróxido em metanol por 30 minutos sob leve vibração. Os slides foram enxaguados em TNT-PBS e 300 µl de solução tampão de bloqueio (TNB) foram adicionados em cada slide e mantidos por 30 minutos em câmara úmida na temperatura ambiente.

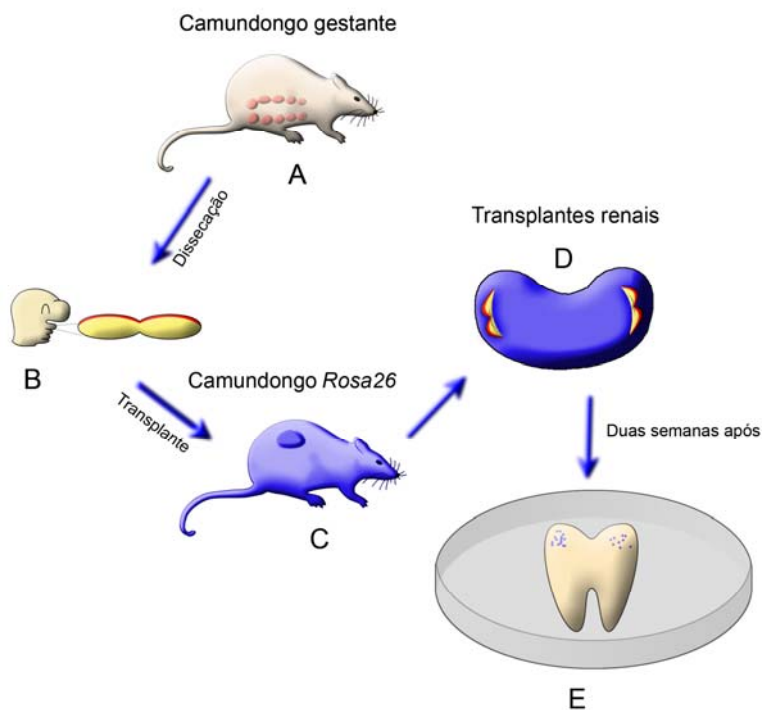
Os anticorpos primários foram diluídos em solução TNB e 300 µl foram depositados sobre cada slide e deixados a 4° C overnight. No dia seguinte os slides foram lavados em TNP-PBS e 300 µl do primeiro anticorpo secundário diluído em TNB foi aplicado sobre os slides e incubados em câmara úmida por 1 hora. Após, 200 µl do composto streptavidina, diluído em TNB na proporção de 1/100, foi aplicado em cada slide e os slides foram incubados em câmara úmida por 30 minutos. Após, os slides foram enxaguados e o composto biotínil fluoroforo tiramida foi diluído em fluído de amplificação na proporção de 1/100 e 200 µl foram aplicados em cada slide e incubados em câmara seca por 10 minutos. Após este procedimento, os slides foram incubados com 200 µl cada com 10% H₂O₂ por 15 minutos.

Após enxague, o segundo anticorpo secundário foi aplicado seguindo as mesmas etapas acima realizadas para o primeiro anticorpo secundário. Após a realização destas etapas os slides foram secos e receberam duas gotas de Vectashield contendo contra-corante DAPI. Os slides foram cobertos om *Coverslips*, analisados em microscópio de fluorescência ZEISS (Carl Zeiss, Alemanha) e armazenados em câmara escura a 4° C.

APÊNDICE 3

ESQUEMA DA METODOLOGIA APLICADA PARA O EXPERIMENTO REALIZADO

Mandíbulas primordiais (B) de camundongos fêmeas grávidas selvagens e GFP (A) foram dissecadas de E10.5 e E13.5, respectivamente, e transplantadas em cápsula renal (D) de camundongos *Rosa26* (C). A cápsula renal é uma membrana altamente vascularizada e permite a nutrição de tecidos ou órgãos após implantação. Duas semanas após, as amostras (E) foram processadas para verificar a contribuição de células do hospedeiro no desenvolvimento dentário.

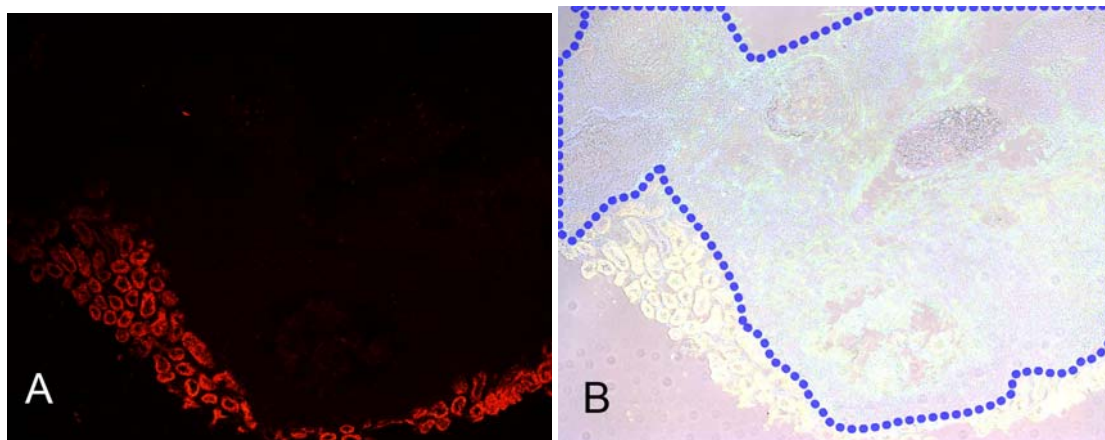


APÊNDICE 4

CONTROLES POSITIVOS DA IMUNOMARCAÇÃO

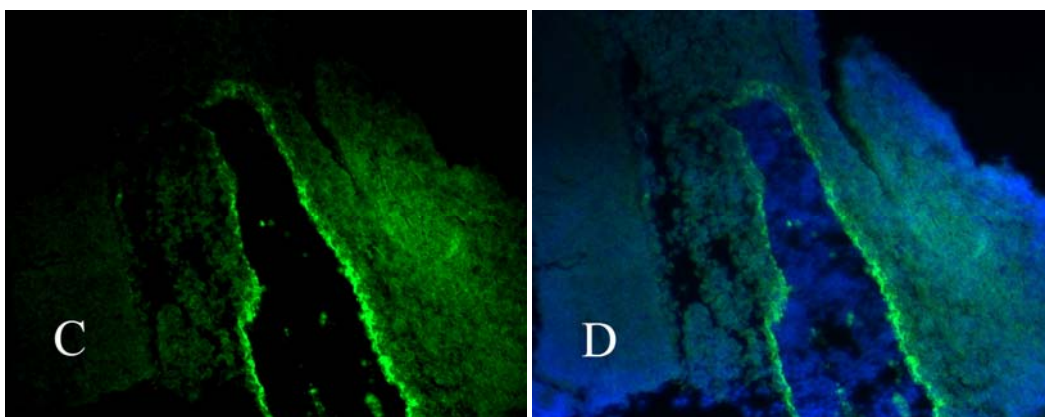
Controle do anticorpo para beta-galactosidase

Uma mandíbula primordial de camundongo selvagem E13.5 foi transplantada em em cápsula renal de camundongo Rosa26. Duas semanas após, a amostra foi dissecada, embebida em gelatina e crio-seccionada. As células marcadas com o anticorpo para a β -galactosidase (A, coloração vermelha) são pertencentes ao camundongo Rosa26. Imagem obtida com filtro Rodamina. Túbulos glomerulares, do hospedeiro camundongo Rosa 26, estão apresentados em vermelho (A). Delimitação da mandíbula primordial desenvolvida após duas semanas da transplantação em cápsula renal do camundongo Rosa 26 (Linha azul pontilhada) (B).



Controle do anticorpo para o fator Von Willebrand

Um vaso sanguíneo maior presente no interstício do pulmão de um camundongo selvagem, As células marcadas em verde (C e D) são positivas para o anticorpo para o fator de Von Willebrand (VW), anticorpo específico para células endoteliais. A figura D mostra presença de células VW positivas, delimitando o vaso sanguíneo. As células marcadas em azul são DAPI positivas (D).



APÊNDICE 5

RELAÇÃO DE TRABALHOS PUBLICADOS E ENVIADOS PARA PUBLICAÇÃO DURANTE O DOUTORADO

Capítulo de livros publicados:

MAGINI, R.S.; BENFATTI, C.A.M; ZENDRON, M.V.; FERREIRA, C.F. et al. Implantodontia Contemporânea Cirurgia Y próteses. In: Bioingenieria Aplicada a la Implantologia. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, p. 468-519. 2005.

MAGINI, R.S.; FERREIRA, C.F. Enxerto ósseo no seio maxilar: estética e função. In: Indicações, Contra-Indicações e Seleção do Indivíduo para Enxerto Ósseo no Seio Maxilar. Livraria Santos Editora Ltda., São Paulo, 2006.

Livros traduzidos:

PHILIP, W.; LANG, B.R.; RUBENSTEIN, J.E. Osseointegração na Odontologia-Uma visão geral, Tradução: FERREIRA, C.F., Quintessence Editora Ltda., p.174, 2005.

Artigos publicados:

PONTUAL, M.A.B.; FREIRE, J.N.O.; SOUZA, D.C.; FERREIRA, C.F. et al. Newly designed template device for use with the insertion of immediately loaded implants. *Journal of Implantology*, v. 30; n. 5, 2004.

FERREIRA, C.F. et al. Platelet-rich-plasma influence on human osteoblast growth. *Clinical Oral Implants Research*, v. 16, p. 456-460, 2005.

Artigos submetidos à publicação em periódicos nacionais e internacionais:

CUNHA, H.A.; FERREIRA, C.F.; COURA, G.S.; MAGINI, R.S. Immediate load of implant-retained prosthesis for the edentulous mandible: a three year follow-up. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2005

CUNHA, H.A.; OLIVERIA, R.C.G.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, D.C.; CARDOSO, A.C. Personalized implant for limited prosthetic space: seven year follow-up. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2005.

AGUIAR, R.C.; SOUZA, D.C.; ZABOLOTSKY, B.S.; FERREIRA, C.F.; CARDOSO, A.C. Provisional implants for patients with low bone density of the maxilla: an alternate rehabilitative strategy. Submetido à publicação no *Journal of Prosthetic Dentistry*, 2006

MAGALHÃES JUNIOR, E.B.; FERREIRA, C.F., et al. A comparative study of RFA of Immediate, early and delayed load for zygomatic implants: a six month follow-up. *Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 2006.

Trabalhos publicados em Anais de Congressos:

ARAÚJO, M.A.R.; ARAÚJO, C.D.R.P.D.; BENFATTI, C.M.; SIQUEIRA, A.F.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, D.C. Seven year longitudinal study of 320 morse taper connection implants. IADR Meeting, Baltimore, Estados Unidos, 2005.

SOUZA, D.C.; PONTUAL, M.B.A.; FERREIRA, C.F. et al. How I utilized micro-screwed prosthesis: the evolution of the implant supported fixed prosthesis. In: World Congress for Oral Implantology 6, Honolulu, Estados Unidos, 2004.

FREIRE, J.N.O.; COELHO, P.G.; MAGINI, R.S.; CARDOSO, A.C.; FERREIRA, C.F.; SOUZA, D.C. Biomechanical assessment of simplified mini-implants for orthodontic anchorage. IADR Meeting, Honolulu, estados Unidos, 2004.

OLIVEIRA, O.M.; MAGINI, R.S.; BIANCHINI, M.A.; FERREIRA, C.F.; PONTUAL, M.A.B. Torsion resistance test of bovine bone screws for bone augmentation. 83rd General Session & Exhibition of the International American Dental Research. *Journal of Dental Research*, v. 84, fasc. A, 2005.

PONTUAL, M.A.B.; MAGINI, R.S.; BIANCHINI, M.A.; FREIRE, J.N.O.; PONTUAL, M.D.; FERREIRA, C.F. Avaliação de 3 anos em pacientes da 3ª idade utilizando carga imediata em Implantes e Plasma Rico em Plaquetas (PRP). *World Celebration - 40 years of Osseointegration*. 2005.

FERREIRA, C.F.; SHARPE, P.T. Vascular origins of dental pulp stem cells. *British Society for Cell and developmental Biology*, v. 30, p. 97, 2006.

FERREIRA, C.F. Células tronco na odontologia: onde estamos e onde podemos chegar. 1 Congresso Nacional de Odontologia da ABO-MS, v. 1, p.32. 2006.

F383o Ferreira, Cimara Fortes

Origens da vascularização da polpa dentária – estudo in vivo
/ Cimara Fortes Ferreira; orientador Ricardo de Souza Magini. –
Florianópolis, 2006.

126 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia- Opção Implantodontia.

Inclui bibliografia.

1. Polpa dentária. 2. Dente - desenvolvimento. 3. Vasos
sanguíneos. I. Magini, Ricardo de Souza. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título.

CDU 616.314-089.843

Catálogo na fonte por: Vera Ingrid Hobold Sovernigo CRB-14/009

