

Odontociencia

Revista de la Facultad de Odontología

Universidad de Cuenca
Año 2 * Número 2
Julio de 2010

Odontociencia

**Decano de la Facultad de
Odontología de la Universidad de
Cuenca**

Dr. Oswaldo Vázquez C.

Consejo Editorial

*Dr. Eduardo Suárez Q.
Dra. Andrea Carvajal E.
Dr. Cristian Abad C.*

Diseño Gráfico y Diagramación

IDEANDO

Portada

IDEANDO

Inpresión

Grafisum Cía. Ltda.

Publicación Periódica Anual

ISSN 1390-0889

*Revista Científica de la Facultad de
Odontología de la Universidad de Cuenca*

*Dirección: Campus El Paraíso.
Avenida El Paraíso s/n.*

Teléfonos (593) 7 4051150

(593) 7 4051151

Fax (593) 7 4051152

Cuenca-Ecuador

Julio 2010

PRESENTACIÓN

Dr. Oswaldo Vásquez Cordero
DECANO

Es un honor personal el hacer la presentación de este segundo número de la Revista de la Facultad de Odontología que se publica durante el presente periodo administrativo.

No hubiese sido posible llegar a este momento de profunda satisfacción si no se contara con la capacidad y dedicación de los miembros del Consejo Editorial; al aporte de los docentes que mediante sus artículos hacen posible cumplir con el cometido de presentar esta publicación a la comunidad universitaria, a los profesionales de la odontología y a quienes se relacionan con esta noble profesión; y al decidido apoyo del señor Rector de la Universidad.

Que se presente este segundo número no es un hecho aislado de lo que ha sido el desarrollo de nuestra Facultad: el traslado de edificio, el reequipamiento de las clínicas y laboratorios, la modernización de los sistemas de apoyo a la docencia, la implementación de aula virtual y del centro de computo, en lo físico; en lo humano el crecimiento de la planta docente, de empleados y trabajadores; en lo académico la continuación de los cursos de postgrado en el nivel de diplomados y el trabajo continuo que deja ver en un futuro cercano la oferta académica de las especialidades, la implementación del sistema de créditos dentro de la

estructura del Plan de Carrera; la revisión y reformas a los reglamentos, son entre otros las acciones que en conjunto muestran la presencia viva de esta Facultad y del transitar que me ha correspondido representar.

Los contenidos de los artículos que se presentan hablan por si solos de la calidad científica y editorial, que no es sino la continuación del camino trazado por quienes en el pasado dedicaron sus esfuerzos y capacidades para la publicación de otras expresiones del quehacer de nuestra Facultad, las que han conseguido el posicionamiento de la Revista en los niveles que institucionalmente se han deseado, constituyendo una publicación indexada y que gracias a la continuidad de las publicaciones esperamos actualizarla; aspecto que se ha visto reflejado en la aceptación que sintiéramos al hacer su entrega a la comunidad odontológica local, nacional e internacional.

Espero que en el futuro se mantenga la periodicidad y calidad de la publicación, con lo que mostrar quienes somos y que hacemos se vea reflejado en la difusión de conocimientos, de investigaciones y quehacer académico, contribuyendo al engrandecimiento de la profesión odontológica y que esta revista sea el medio de comunicación e intercambio que posibiliten la integración y convergencia de las instituciones de formación odontológica.



Fotografía: Luis Bern

INGENIERÍA DE TEJIDOS EN ENDODONCIA: ESTADO ACTUAL E IMPLICACIONES FUTURAS

Dr. José Luis Álvarez Vásquez.
Especialista en Endodoncia.

DOCENTE DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que ha tenido avances impresionantes en la última década en el campo odontológico; mediante el diseño y manufactura de nuevos tejidos, procura reemplazar tejidos alterados o dañados. Los 3 elementos clave en la ingeniería de tejidos son células madre, factores de crecimiento o morfógenos y, un "molde" de matriz extracelular, que constituye un microambiente para los anteriores. En la presente revisión bibliográfica, se resaltarán aspectos relacionados con los diferentes acercamientos que se han hecho en la bioingeniería de tejidos dentales en el campo endodóntico, así como los desafíos que se imponen a la consecución de un "biodiente".

PALABRAS CLAVE:

Ingeniería de tejidos, regeneración dental, células madre pulpares, endodoncia regenerativa.

ABSTRACT

Tissue engineering is a multidisciplinary science with impressive approaches in the last decade on the dental field; through design and manufacture of new tissues, it intends to replace impaired or damaged ones. The three key elements for tissue engineering are stem cells, growth factors or morphogens, and a scaffold of extracellular matrix that constitutes the microenvironment for the last ones. The present article will overview current approaches toward teeth engineering in the endodontic field as well as some aspects and challenges that must be met in the making of a bio-tooth.

KEY WORDS:

Tissue engineering, dental regeneration, pulp stem cells, regenerative endodontics.

INTRODUCCIÓN

Los recientes avances en la investigación odontológica acerca del empleo de terapias celulares con el fin de lograr regeneración dental, han hecho que la ingeniería de tejidos dentarios tenga perspectiva para convertirse en una opción terapéutica "biológica" en un futuro no tan lejano, ya sea para formar una pieza dental completa, así como regenerar el complejo dentinopulpar.^{1,2,3,4}

La creación y colocación de nuevos tejidos para reemplazar el tejido pulpar perdido, enfermo o traumatizado, es lo que se ha denominado como endodoncia regenerativa, constituyéndose en una opción terapéutica innovadora y con un acercamiento más biológico, para tratar dientes con exposición pulpar por caries, e inclusive se piensa en la remoción y posterior reemplazo de tejido pulpar necrótico, mediante la colocación intraconducto de tejido pulpar sano para revitalizar el diente.^{3,5}

¿QUE ES LA INGENIERÍA DE TEJIDOS?

La ingeniería de tejidos es una ciencia multidisciplinaria que aplica principios y fundamentos de biología celular y molecular, ingeniería celular, genética, biónica, inmunología, entre otras ciencias básicas, para procurar, mediante sustitutos biológicos, la regeneración y restauración de tejidos u órganos que han sido dañados o perdidos.^{1,2,3,4,5}

Los elementos clave en la ingeniería de tejidos dentarios son las células madre, factores de crecimiento, denominados también morfógenos y, un "molde" de matriz extracelular o llamado "scaffold" en inglés. Esta tríada de componentes es lo que constituye lo que se conoce como un "constructo".³

ELEMENTOS CLAVE EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS

CÉLULAS MADRE

Éstas células son las más apetecidas en el emergente campo de la medicina regenerativa. La investigación sobre estas células está dando luces sobre el crecimiento y desarrollo de un organismo como el nuestro, así como sobre la manera en que las células sanas reemplazan a las dañadas o enfermas en un organismo adulto. Las células madre tienen la habilidad de dividirse continuamente, ya sea para replicarse a sí mismas (autorreplicación), o para producir células especializadas capaces de diferenciarse en varios tipos de células (diferenciación multilinaje).^{3,4,7}

Las células madre embrionarias y fetales son pluripo-

tentes, estos es, poseen capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula, pero implicaciones éticas y legales no hacen permisible su uso terapéutico. Por otro lado, las células madre del cordón umbilical son multipotentes, puesto que pueden diferenciarse en un rango limitado de tipos celulares y, pueden ser conservadas mediante criogenia, con un potencial empleo en futuras terapias celulares. Las células madre postnatales residen en tejidos ya desarrollados, dirigiendo su crecimiento y mantenimiento durante toda la vida; éstas células también son multipotentes.^{3,7}

Las células madre postnatales originan tipos celulares del tejido en el cual residen, no obstante, investigaciones en los últimos años dan cuenta de un fenómeno conocido como plasticidad, mediante el cual las células madre de un tejido pueden ser capaces de formar células de un tejido completamente distinto.^{3,8} Estas células han sido encontradas en casi todos los tejidos del organismo, incluyendo los tejidos dentales.^{3,7,9} Hasta la fecha se han aislado y caracterizado 5 tipos de células madre humanas de origen dental: 1) células madre de pulpa dental de dientes permanentes^{10,11,2}) células madre de dientes deciduos exfoliados^{12,13,3}) células madre de la papila apical^{14,15,4}) células madre del ligamento periodontal^{16,5}) células precursoras del folículo dental (obtenidas de folículos de terceros molares impactados).^{19,17}

Los 5 tipos de células madre descritos pertenecen al grupo de células madre mesenquimales^{3,9}, por lo que son "aptas" para la ingeniería de tejidos, ya que éste tipo de células no son rechazadas por el sistema inmune del organismo, debido a su capacidad inmunosupresora, la cual dependería de sus efectos sobre células T, dendríticas, NK, células B, así como porque estas células madre poseen una baja expresión de CMH-I (complejo mayor de histocompatibilidad I) y, no expresan CMH-II.^{5,7} Por otro lado, se ha demostrado que las células madre de dientes permanentes y de dientes deciduos exfoliados, tienen el potencial de diferenciarse en células nerviosas, tanto neuronas como células gliales, lo que las hace buenas candidatas para terapias de regeneración en casos de trauma de la médula espinal, así como en enfermedades neurodegenerativas.^{7,18}

FACTORES DE CRECIMIENTO

Son proteínas señalizadoras secretadas hacia el medio extracelular, las cuales regulan proliferación y diferenciación celular, jugando un rol fundamental en diversos procesos fisiológicos durante la morfogénesis y organogénesis en las etapas embrionarias^{3,4,19} por lo que actúan como moléculas inductoras esenciales en la odontogénesis, la cual es regulada por comunicaciones célula-matriz extracelular y por interacciones epitelio mesénquima.^{20,21} Además, regulan muchas funciones en órganos y tejidos durante el crecimiento y desarrollo postnatales, incluyendo la pulpa dental.^{3,19}

Estos factores regulan la división y especialización de células madre, así como median eventos celulares clave en la regeneración tisular, como son proliferación,

quimiotaxis, diferenciación y síntesis de matriz extracelular; muchos de ellos son versátiles en su función, en tanto que otros son altamente específicos. Algunos factores se usan para incrementar la proliferación de células madre, como es el caso del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), factor estimulador de colonias (CSF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). De estos muchos tienen rol fundamental en la odontogénesis, pero particularmente lo tienen las proteínas morfogenéticas óseas (BMP)^{2,4 y 7,3,4}

Después de unirse a sus receptores celulares, los factores de crecimiento inducen cascadas de señalización intracelular conducentes a la activación génica, que finalmente dictará la actividad celular específica o cambios en el fenotipo celular; diferentes avances se han hecho para mejorar los métodos de aplicación de los factores de crecimiento en la ingeniería de tejidos orales y dentales.^{4,6}

MATRIZ EXTRACELULAR (SCAFFOLD)

Es el medio en el que están contenidas las células madre y los factores de crecimiento y, provee un microambiente físico-químico y biológico de tipo tridimensional para el crecimiento y diferenciación celular. Las matrices pueden ser de tipo natural, como colágeno y glicosaminoglucanos, o de tipo sintético, permitiéndose en estas últimas controlar ciertas propiedades físico-mecánicas como tasa de degradación, microestructura y fuerza mecánica. Entre las sintéticas, tenemos ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de éstos ácidos, polímeros de polietilenglicol, matrices de hidroxiapatita, fosfato tricálcico y polifosfato de calcio. En la bioingeniería de tejidos dentales se han usado tanto las naturales como las sintéticas, teniendo ambas ventajas y desventajas inherentes,^{1,3} e incluso se podría pensar en el empleo de nanomatrices,²² si pensamos en que los eventos celulares ocurren a nanoescala.

INGENIERÍA DE TEJIDOS EN ENDODONCIA

Algunos estudios han sugerido que, ya sea en cavidades o preparaciones dentarias profundas, en las que hay muerte y desorganización de los odontoblastos, las células formadoras ya sea de dentina reparativa o regenerativa, podrían derivar de células madre pulpares perivasculares. En uno de éstos estudios, se realizaron preparaciones cavitarias con exposición pulpar en terceros molares extraídos por razones ortodónticas y, se demostró mediante inmunomarcaje con BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina), que es un marcador de proliferación celular, la activación y migración de éstas células progenitoras (madre) hacia el sitio de agresión desde un nicho perivascular pulpar.²³ Este estudio confirma la presencia de las células madre postnatales, y su posible

rol en la diferenciación hacia odontoblastos, así como su empleo en terapias de endodoncia regenerativa. Si bien actualmente la opción terapéutica promisoriosa en casos de exposición pulpar directa es el uso del MTA (Mineral Trióxido Agregado)- considerando el hecho de que los dientes incluidos en los estudios son sanos y libres de caries - se podría pensar en un manejo más biológico de ésta eventualidad con la ingeniería de tejidos dentarios, esto es, el uso de matrices ó nanomatrices extracelulares embebidas en factores de crecimiento como BMP's, IGF-1 ó PDGF, cuyo rol fundamental durante la odontogénesis/dentinogénesis ha sido muy estudiado y demostrado;^{26,27,28,29} además se podría pensar en añadir a dichas matrices un neuropéptido como el VIP (Péptido Intestinal Vasoactivo), para el mantenimiento de la salud y vitalidad del complejo dentinopulpar, debido a las propiedades antiinflamatorias y citoprotectoras de éste neuropéptido.³⁰

Se ha investigado también la aplicación de factores de crecimiento recombinantes para promover la regeneración dentinaria en sitios de exposición pulpar, con resultados favorables.^{1,29}

También en el campo endodóntico, el descubrimiento de las células madre de la papila apical, ha abierto nuevas opciones terapéuticas en el manejo de la apexificación. Así, a través de técnicas de "revascularización", algunas de las cuales emplean sobreinstrumentación para inducir hemorragia y permitir la formación de un coágulo en el conducto y, manejo de una pasta antibiótica triple en el conducto (ciprofloxacina, metronidazol y minociclina), se ha verificado el desarrollo radicular en dientes con pulpa necrótica, tanto en longitud como grosor,^{5,31,32,33} situación que se ha manifestado ocurre debido a la preservación de las mencionadas células a nivel apical, así como de las células de la vaina epitelial radicular de Hertwig, lo cual ocurriría por la irrigación lateral que reciben estas células debido a su ubicación.^{3,5,15} (ver Fig.1)

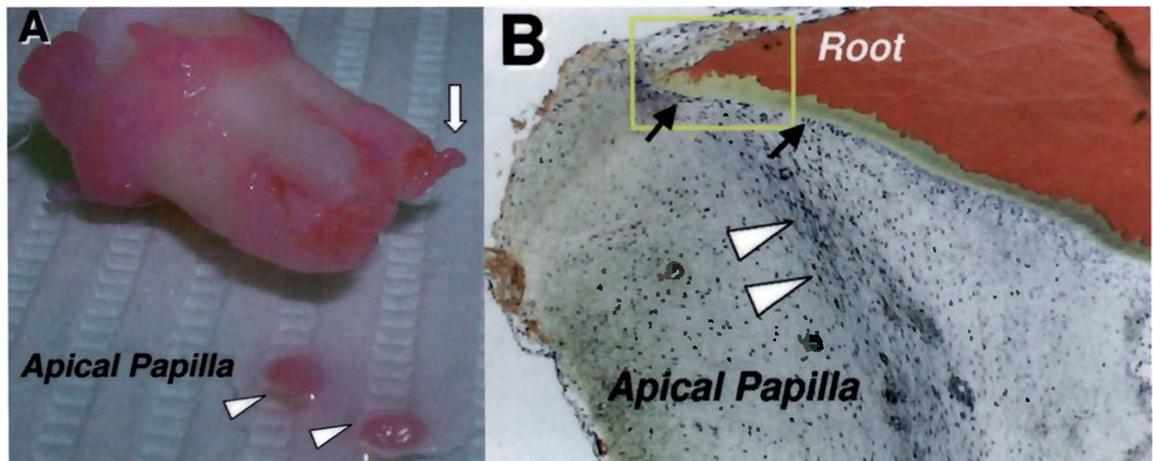


Figura 1

La papila apical (a) es la porción apical de la papila dental en un diente inmaduro, en el ejemplo de un tercer molar; la flecha apunta hacia un segmento de papila apical todavía adherido a la raíz, en tanto las cabezas de flecha indican dos segmentos de papila separados de las raíces. (b) tinción de hematoxilina/eosina de una raíz en desarrollo cultivada in vitro; se indican los odontoblastos (flechas negras), zona apical rica en células (cabezas de flecha), y la papila apical.

TOMADO DE HUANG G, SONOYAMA W, LIU Y, LIU H, DDS, WANG S, SHI S. THE HIDDEN TREASURE IN APICAL PAPILLA: THE POTENTIAL ROLE IN PULP/DENTIN REGENERATION AND BIOROOT ENGINEERING. J ENDOD. 2008; 34(6): 645-651

Estas células serían las responsables, de los reportes de casos clínicos en que se da cuenta de la formación completa del ápice radicular así como del ensanchamiento de las paredes radiculares en dientes sometidos a apexificación, que incluso tenían lesiones periapicales,^{31,33,34} casos en los cuales no sería factible tal eventualidad, sino más bien en casos de apexogénesis.

Otro acercamiento es que, mediante la bioingeniería de tejidos, se puedan implantar a futuro constructos pulpares (células madre-matriz-factores de crecimiento) en el conducto radicular, para conseguir la regeneración del complejo dentinopulpar, e inducir entonces la continuación de la formación radicular, aprovechando además la situación del ápice abierto y presencia de las células de la papila apical.^{2,5,35}

Se ha mencionado la dificultad que se presentaría al tratar de conseguir revascularización de los constructos, a pesar de que sería factible la vascularización a través del ápice abierto, por lo que se ha sugerido el empleo de factores promotores de angiogénesis como el VEGF (Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular) y PDGF, por ejemplo.^{3,5} También surgen otras interrogantes: si los odontoblastos neodiferenciados se unirán o no a las paredes del conducto ya tratadas por la preparación quimiomecánica, la capacidad de formación de dentina de los odontoblastos en cantidad y calidad, así como cual sería la fuente celular indicada de las células madre, esto es, bancos de células autólogas o alogénicas.^{5,36}

En un estudio, mediante microscopía electrónica de barrido, se pudo comprobar la adhesión de constructos pulpares en las paredes de dientes permanentes extraídos, mismos que fueron sometidos a preparación quimiomecánica, en los cuales fueron colocados constructos de una matriz de ácido poliláctico, células

madre de dientes deciduos exfoliados, con o sin adición de factores de crecimiento; los resultados de ésta investigación³⁵ podrían tener implicaciones clínicas en un futuro, respecto a posibles terapias endodónticas regenerativas, hacia las cuales se muestra gran optimismo.^{3,4,36}

¿REGENERACIÓN DE UNA PIEZA DENTAL COMPLETA: FANTASÍA O REALIDAD?

La pérdida dental afecta de manera adversa la función masticatoria, la estética facial e incluso el estado de ánimo y calidad de vida de una persona. Es una enfermedad frecuente en la población mundial y, está asociado con causas fisiológicas, patológicas y genéticas: caries, enfermedad periodontal, trauma dentoalveolar, envejecimiento, anodoncia.^{1,3,6,7}

Las opciones terapéuticas actuales para tratarla, se basan en métodos no biológicos, como las prótesis dentales fijas y removibles, así como los implantes dentales, métodos que no siempre cumplen las expectativas estéticas y funcionales o pueden ocasionar un rechazo inmunológico. La regeneración de una pieza dental ha sido un sueño durante mucho tiempo, y representaría una opción terapéutica con un acercamiento más biológico.^{1,3,6,7}

Además las opciones terapéuticas actuales "no biológicas" tienen ciertas desventajas, como sensación extraña o de incomodidad por parte del paciente, biocompatibilidad parcial, daño a los tejidos adyacentes, así como eficacia terapéutica impredecible a largo plazo.¹ Los recientes avances en la ingeniería de tejidos dentarios, se han encaminado a tratar de hacer realidad una, hasta

ahora, fantasía: ver "crecer" un diente en boca.

Mediante la ingeniería de tejidos con células madre, no se ha podido obtener, hasta el momento, una pieza dental completamente formada y funcional en los modelos animales de experimentación, no obstante estos estudios proveerán mucho sobre la base celular y molecular, para futuras aplicaciones clínicas en humanos.^{4,37} Por otro lado, mediante el empleo de epitelio embrionario y células madre mesenquimales adultas, tanto de origen dental como no dental (células madre de médula ósea, por ejemplo), cultivados ya sea *in vitro* o *in vivo*, se ha conseguido la formación de gérmenes dentales, que fueron luego implantados en el maxilar de ratones^{38,39,40} e incluso en otros sitios como cápsula renal de ratones,³⁹ consiguiéndose en ambos casos la formación de piezas dentales completamente formadas. En uno de los estudios antes referidos⁴⁰ se pudo com-

probar que los molares que se desarrollaron a partir de los gérmenes dentales implantados eran completamente funcionales, pues los estudios sobre la dureza Knoop de esmalte y dentina mostraron valores similares a los dientes control. Además los dientes llegaron a una oclusión normal y, fueron sometidos a fuerzas ortodónticas, mostrando en el estudio histológico zonas de compresión y tensión similares a las observadas en los dientes control. Por último, en el tejido óseo circundante se encontró expresión de csf-1 (Factor estimulador de colonias) y Pthr1 (Receptor de hormona paratiroidea), los cuales son reguladores de la osteoclastogénesis durante el proceso normal de erupción dental. Sin embargo, el diente formado era más pequeño que el diente normal que fue extraído⁴⁰ (ver Fig.2).

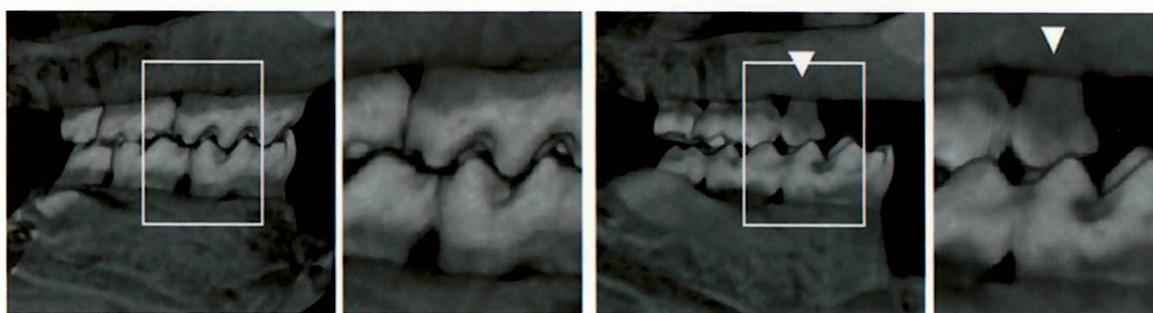


Figura 2

Imágenes mediante microtomografía computarizada para comparar la oclusión y el tamaño entre el diente normal y el diente formado a partir del germen dental cultivado mediante bioingeniería de tejidos, indicado con la cabeza de flecha. Los dos primeros recuadros muestran el diente normal, en tanto los dos últimos indican el biodiente

Tomado de Ikeda E, Moritaa R, Nakao K, Ishidaa K, Nakamura T, Takano T, Ogawab M, Mizunoo M, Kasugaie S, Tsujia T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106(32): 13475-13480.

De los estudios referidos, y muchos otros citados en varias revisiones bibliográficas^{1,2,4,7} surgen muchas interrogantes, que representan desafíos para la posibilidad terapéutica de la implantación de un germen dental en el humano: como controlar la forma y tamaño del diente, de donde obtener las células epiteliales postnatales, como obtener una erupción bien direccionada y en el espacio correcto en los maxilares, así como la obtención de un ligamento periodontal completamente funcional, interrogantes que por cuestión de espacio no pueden ser abordadas en la presente revisión bibliográfica, pero pueden ser analizadas en otras revisiones en este sentido.^{1,2,4} No obstante los desafíos, los grupos de investigación se han propuesto como meta el año 2017 como fecha para lograr la implantación de gérmenes dentales en el humano.²

CONCLUSIONES

La continúa investigación sobre la tríada de la ingeniería de tejidos - células madre, factores de crecimiento y matriz extracelular artificial - proveerá muy seguramente un acercamiento biológico innovador para el tratamiento de varias enfermedades dentarias. Los avances en el conocimiento sobre células madre y los diversos mecanismos moleculares implicados en la odontogéne-

sis, permitirán que la regeneración dental, incluyendo una pieza dental completa, se convierta en una realidad terapéutica en un futuro no muy lejano, lo cual contribuirá a mejorar la calidad de vida de las personas.



BIBLIOGRAFÍA

1. Yu J, Shi J, Jin Y. Current Approaches and Challenges in Making a Bio-Tooth. *Tissue Engineering: Part B*. 2008;14(3): 307-319.
2. Snead M. Whole-Tooth Regeneration: It Takes a Village of Scientists, Clinicians, and Patients. *J Dent Educ*. 2008 August ;72(8): 903-911.
3. Shehab E. Tissue engineering in endodontics. 2009;51(4):495-507.
4. Zhang Y, Chen Z, Song Y, Liu C, Chen Y. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Research*. 2005;15(5):301-316.
5. Huang G. Apexification: the beginning of its end. *Int End J*. 2009;42:855-866
6. Kaigler D, Cirelli J, Giannobile W. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. *Expert Opin Drug Deliv*. 2006;3(5): 647-662.
7. Zeidán F, Noda M. "Opening" The Mesenchymal Stem Cell Tool Box. *Eur J Dent*. 2009;3:240-249.
8. Yu, J, Wang, Y, Deng, Z, Tang, L, Li, Y, Shi, J, and Jin, Y. Odontogenic capability: bone marrow stromal stem cells versus dental pulp stem cells. *Biol Cell*. 2007;99:465.
9. Huang G, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009 September ; 88(9): 792-806.
10. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13625-13630.
11. Trubiani O, D'Arcangelo C, Di Iorio I, Di Nardo Di Maio, Caputi S. Dental pulp stem cells bioadhesivity: evaluation on mineral-trioxide-aggregate. *Int J Immunopathol*. 2007;20:81-86.
12. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:5807-5812.
13. Casagrande L, Mattuella L, De Araujo F, Eduardo J. Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent*. 2006;31: 25-27.
14. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008;34:166-171.
15. Huang G, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, DDS, Wang S, Shi S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *J Endod*. 2008; 34(6): 645-65.
16. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.
17. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 2005;24:155-165.
18. Nosrat I, Smith C, Mullaly P, Olson L, Nosrat C. 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. *European Journal of Neuroscience*. 2004;19:2388-2398.
19. Werner H, Katz J. The emerging role of the insuline-like growth factors in oral biology. *J Dent Res*. 2004;83:832-836.
20. Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol*. 2002;217:93-135.
21. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003;116:1647-1648.
22. Engel E, Michiardi A, Navarro M, Lacroix D, Planell J. Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side. *Trends in Biotechnology*. 2007;26(1): 39-47.
23. Télès O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger A, Camps J, Dejou J, About I. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol*. 2005;50:103-108.
24. Nair P, Duncan H, Pittford T, Luder H. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int Endod J*. 2008;41: 128-150.
25. Bogen G, Kim J, Bakland L. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate : an observational study. *JADA*. 2008;139:305-315.
26. Caviedes J, Londoño P, Díaz A, Orozco M, Álvarez J, Lombana N, Díaz E, Muñoz R. Variation in the Expression of Insuline-like Growth Factor-1 in human pulp tissue according to the root development stage. *J Endod*. 2007;33:1293-1295.
27. Caviedes J, Canales P, Castrillón N, Jovel J, Álvarez J, Rivero C, Azuero M, Muñoz H. Expression of insulin-like growth factor-1 and proliferating cell nuclear antigen in human pulp cells of teeth with complete and incomplete root development. *Int Endod J*. 2009;42:686-693.

28. Kim M, Kim B, Yoon S. Effect on the healing of periapical perforations in dogs of the addition of growth factors to calcium hydroxide. *J Endod.*2001;27:734-7.
29. Rutherford R, Gu K. Treatment of inflamed ferret dental pulps with recombinant bone morphogenetic protein 7. *Eur J Oral Sci.*2000;108:202-6.
30. El-Karim I, Lamey P, Ardill J, Linden G, Lundy F. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and VPAC1 receptor in adult human dental pulp in relation to caries. *Arch Oral Biol.*2006;51:849-55.
31. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol?. *J Endod.*2004;30:196-200.
32. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth : case report and review of the literature. *Pediatric Dentistry.*2007;29:47-50.
33. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatol.*2001;17:185-7.
34. Chueh L, Huang G. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod.* 2006;32:1205-13.
35. Gotlieb E, Murray P, Namerow K, Kuttler S, Garcia F. An ultrastructural investigation of tissueengineered pulp constructs implanted within endodontically treated teeth. *JADA.*2008;139(4):457-465.
36. Epelman I, Murray P, Garcia F, Kuttler S, Namerow K. A Practitioner Survey of Opinions Toward Regenerative Endodontics. *J Endod.* 2009;35:1204-1210.
37. Young CS, Terada S, Vacanti JP, et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res.*2002; 81:695-700.
38. Modino S, Sharpe P. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Biol.*2005;50:255-258.
39. Ohazama A, Modino S, Miletich I, Sharpe P. Stem-cell based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.*2004;83(7):518-22.
40. Ikeda E, Moritaa R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano T, Ogawab M, Mizunoa M, Kasugaie S, Tsujia T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.*2009;106(32): 13475-13480.