



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**MINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DA DENTINA: ESTADO DA
ARTE**

Trabalho submetido por
Felícia Rocha de Almeida
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

novembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

MINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E DA DENTINA: ESTADO DA ARTE

Trabalho submetido por
Felícia Rocha de Almeida
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Carla Ascenso

novembro de 2021

AGRADECIMENTOS

Ao longo do meu percurso acadêmico tive a sorte de me cruzar com algumas pessoas que hoje tornaram-se numa fonte de inspiração e de motivação para prosseguir na minha caminhada. Razão pela qual quero deixar expresso os meus sinceros agradecimentos a todos eles.

À Prof. Doutora Carla Ascenso por todo o apoio, disponibilidade e incentivo nos momentos mais difíceis.

Ao ISCEM, por toda a aprendizagem enriquecedora.

Aos meus colegas de faculdade, Inês Lima, Sofia Furtado e Sebastião Ferreira, foram um pilar e um porto seguro durante esta jornada. Nos bons e maus momentos sempre superámos juntos. Por isso “seguimos juntos”.

À minha família por todo o apoio e amor. Aos meus pais Teresa e Heitor por nunca duvidarem das minhas capacidades. Aos meus irmãos Marta e Guilherme, por todo o apoio incondicional, obrigada pela paciência e por tudo aquilo que vocês sabem.

Aos meus grandes irmãos do coração, Jorge e Cátia, não há palavras para descrever. Obrigada por estarem sempre comigo, nos bons e maus momentos.

RESUMO

A Medicina Regenerativa tem sido considerada na odontologia como uma área em progresso, focando-se na elaboração de terapias de substituição de dentes projetadas por bioengenharia, com potencial para fornecer a função e a capacidade de resposta sensorial dos dentes naturais. Entender o processo de mineralização do dente, tanto durante a fase pré-eruptiva como na fase pós-eruptiva, revela-se extremamente importante no desenvolvimento de tratamentos para doenças relacionadas com a mineralização. Durante a gênese dentária, a formação mineral ganha expressão durante o desenvolvimento do esmalte e da dentina. O processo de mineralização envolvido resulta de um conjunto de interações bioquímicas, coordenadas por moléculas sinalizadoras, as quais estimulam a síntese e a liberação de proteínas e efluxo de íons para o espaço extracelular. Estas proteínas e íons, os quais incluem enzimas, fatores de transcrição, fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular, participam conjuntamente no processo de formação e regulação mineral, desde a nucleação ao crescimento do cristal. O conhecimento das vias de sinalização que induzem a expressão de vários sinais envolvidos na formação do esmalte e da dentina, proporcionam novas perspectivas direcionadas a identificação de interações durante a fase mineral e cristalina da apatite biológica.

Durante a amelogênese e a dentinogênese, os ameloblastos e os odontoblastos respetivamente, sofrem interações possibilitando a sua diferenciação celular e polarização. Consequentemente, ativam a síntese proteica, libertando proteínas e minerais para a região extracelular, onde ocorre a mineralização. Apesar de serem processos específicos de cada célula, interagem entre si através de sinais recíprocos permitindo a formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatite. Após a formação dos ameloblastos, estes sofrem apoptose o que constitui um dos maiores desafios da sua regeneração. Por sua vez, a dentina apresenta uma relação estreita com a polpa, onde os odontoblastos permanecem junto da região vascularizada permitindo a regeneração e reparação da mesma ao longo do seu tempo de vida. As estratégias terapêuticas atuais na dentina, focam-se principalmente na regeneração do complexo dentino-pulpar, com o intuito de aprimorar os materiais de capeamento pulpar, através de uma matriz orgânica de colagénio. No esmalte, as abordagens compreendem a reprodução da montagem dos cristais de HAp através do uso de proteínas. O objetivo é recriar o ambiente espaço-temporal da deposição e formação da estrutura mineral. A presente revisão, retrata o estado da arte do processo de mineralização dos tecidos dentários, fornecendo novos horizontes e oportunidades futuras para a sua regeneração e reparação. Assim, torna-se primordial perceber quais os componentes que atuam durante este processo de forma a serem aplicados em novas abordagens preventivas, novos materiais biomiméticos, ou mesmo novas estratégias terapêuticas de doenças que afetam o desenvolvimento do esmalte e da dentina.

Palavras-chave: mineralização, esmalte, dentina, amelogênese, dentinogênese, matriz extracelular, hidroxiapatite

ABSTRACT

Regenerative Medicine has been considered in dentistry as an advancing area, focusing on the development of bioengineered tooth replacement therapies with the potential to provide the function and sensory responsiveness of natural teeth. Understanding the tooth mineralization process, both during the pre-eruptive and post-eruptive phases, proves to be extremely important in the development of treatments for diseases related to mineralization. During dental genesis, mineral formation gains expression during enamel and dentin development. The mineralization process involved results from a set of biochemical interactions, coordinated by signaling molecules, which stimulate the synthesis and release of proteins and ion efflux to the extracellular space. These proteins and ions, which include enzymes, transcription factors, growth factors and extracellular matrix components, jointly participate in the mineral formation and regulation process, from nucleation to crystal growth. The knowledge of the signaling pathways that induce the expression of various signals involved in the formation of enamel and dentin, provides new perspectives aimed at identifying interactions during the mineral and crystalline phase of biological apatite

During amelogenesis and dentinogenesis, ameloblasts and odontoblasts, respectively, undergo interactions enabling their cell differentiation and polarization. Consequently, they activate protein synthesis, releasing proteins and minerals to the extracellular region, where mineralization occurs. Despite being processes specific to each cell, they interact with each other through reciprocal signals, allowing the formation and growth of hydroxyapatite crystals. After the formation of ameloblasts, they undergo apoptosis, which is one of the biggest challenges in their regeneration. In turn, dentin has a close relationship with the pulp, where odontoblasts remain close to the vascularized region, allowing its regeneration and repair throughout its lifetime. Current therapeutic strategies in dentin focus mainly on the regeneration of the pulp-dentin complex, with the aim of improving pulp capping materials through an organic collagen matrix. In enamel, approaches include reproducing the assembly of HAp crystals through the use of proteins. The objective is to recreate the space-time environment of the deposition and formation of the mineral structure. This review represents the state of the art of the mineralization process of dental tissues, providing new horizons and future opportunities for its regeneration and repair. Thus, it is essential to understand which components act during this process in order to be applied in new preventive approaches, new biomimetic materials, or even new therapeutic strategies for diseases that affect the development of enamel and dentin.

Keywords: mineralization, enamel, dentin, amelogenesis, dentinogenesis, extracellular matrix, hydroxyapatite

INDÍCE GERAL

I.	INTRODUÇÃO	13
II.	DESENVOLVIMENTO	17
1.	Cristais Hidroxiapatite	17
2.	Desenvolvimento embrionário do dente	18
3.	Dentinogênese	23
3.1.	Diferenciação e Polarização	23
3.2.	Formação da dentina do manto	24
3.3.	Formação da dentina intertubular.....	26
3.4.	Formação da dentina peritubular.....	32
3.5.	Dentina Pós-eruptiva	33
4.	Amelogênese	34
4.1.	Diferenciação e Polarização Ameloblastos	34
4.2.	Fases da amelogênese	36
4.3.	Fase Maturação	41
4.4.	Fase Pós-eruptiva	43
5.	Vias de sinalização	45
5.1.	Via de sinalização Wnt.....	47
5.2.	Via sinalização FGF	49
5.3.	Via sinalização super-família TGF- β	50
5.4.	Via sinalização HH	51
6.	Doenças Associadas	54
6.1.	Malformações da Dentina	55
6.2.	Malformações do Esmalte.....	56
7.	Considerações clínicas	57
III.	CONCLUSÃO	62
IV.	BIBLIOGRAFIA	64

V. ANEXOS	75
------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Secção transversal dente molar.....	19
Figura 2 - Estágios Odontogénese.....	20
Figura 3 - Mineralização Dentina Manto.	25
Figura 4 – Odontoblasto.	27
Figura 5 - Mineralização Intertubular.....	30
Figura 6 - Tipos de mineralização dentina	32
Figura 7 - Mineralização Peritubular.....	33
Figura 8 - Desenvolvimento Processos Tomes.	37
Figura 9 - Estrutura prismática e interprismática.	38
Figura 10 - Crescimento dos cristais durante fase de secreção	39
Figura 11 - Mineralização do esmalte.	41
Figura 12 - Trocas Iónicas durante crescimento do cristal na Fase de Maturação.....	42
Figura 13 - Estrutura HAp e FAp.....	44
Figura 14 - Desenvolvimento células ameloblasto e odontoblasto.	46

LISTA DE SIGLAS

ACP - fosfato cálcio amorfo

AE2 – proteína troca aniônica 2

ALP – fosfatase alcalina

AMBN - Ameloblastina

AMEL – Amelogenina

AI - Amelogénese Imperfeita

AICAR 5 - aminoimidazol-4-carboxamida-ribonucleosídeo

AMPK - proteína cinase AMP

ASARM - serina-aspartato ácido

Bcl9 – linfoma de células B proteína do tipo 9

BMP - proteína morfogénica do osso

BPM1 - metaloproteinase de zinco-1

BSP - sialoproteína óssea

CAMKII - proteína cinase dependente de calmodulina II

CFTR – regulação de condução transmembranar de fibrose cística

COL1a1 – colagénio do tipo $\alpha 1$

CDC42 – do inglês *cell division cycle 42*

CNNM4 - domínio de ciclina e CBS

CPIC – do inglês *calcium phosphate ion clusters*

Cpne7 - copine-7

DD-I - Displasia de Dentina Tipo I

DD-II - Displasia Dentina Tipo II

DGI-I - Dentinogénese Imperfecta do Tipo I

DGI-II - Dentinogénese Imperfecta Tipo II

DGP - dentinoglicoproteína

DHH – do inglês *desert hedgehog*

DI - Dentinogénese Imperfeita

DMP1 - proteína da matriz dentinária 1

DPP - fosfoproteína da dentina

DSPP - sialofosfoproteína da dentina

DSP - sialoproteína da dentina

ECM – do inglês *extracellular matrix*

EDA –ectodisplasia

ENAM - Enamelina

ERK1 - cinases reguladas por sinal extracelular

FAK - complexo adesão focal

FC - fibrose cística

FGF - fator de crescimento fibroblasto

Fzr - recetores Frizzled

GAG - glicosaminoglicanos

Gli – fator de transcrição oncogénese associado glioma

GRB2 – proteína 2 ligada ao recetor fator de crescimento

GSK3 β – glicogénio sintase cinase

HAp - hidroxiapatite

HERS - bainha da raiz epitelial de Hertwig

HH – do inglês *Heghog*

hPDL – células ligamento periodontal humano

IHH – do inglês *Indian hedghog*

JNK - cinase c-Jun N-terminal

Lef - fator de aumento linfoide

LV-Ctnnb – gene β -catenina 1

MAPK - proteína cinase ativada por mitogénio

MEPE - glicofosfoproteína extracelular da matriz

MMP - metaloproteinases

MMP3 – estromelisina

Msx – do inglês *Msh homeobox*

mTORC1 - complexo alvo mamífero da rapamicina

NCX – do inglês *sodium calcium exchanger*

Nfic - fator nuclear Ic

NT-4 - fator neutrófico 4

OCN – ocludina

OCP – fosfato de octacálcio

OHAp - hidroxiapatita de cálcio estequiométrica

OPN – osteopontina

ORAI - proteína canal de cálcio

OSAD - osteoaderina
Osx - Osterix
Panx3 - panexina 3
PCP – polaridade plana celular
PG – proteoglicano
PG (CS) - sulfato de condroitina
PG (DS) - sulfato de dermatanina
PG (KS) - sulfato de queratana
PHOSPHO1 - fosfatase Orfan 1
PI3K – cinase-3 fosfatidilinositol
PMCAs – membrana plasmática Ca-ATPase
PNC - proteínas não colagénicas
Ptch - recetor transmembranar do inglês *patched*
Pth1h - peptídeo relacionado à hormona da paratireóide
Pth1r – recetor peptídeo relacionado à hormona da paratireoide
PKC – proteína cinase C
PKP1 – placofilina
P21 – Inibidor 1 cínase dependente de ciclina
P38 – proteína cinase ativada por mitogénio
KLK4 - peptidase-4-relacionada-caliceína
Ras – vírus sarcoma rato
Resíduo R – arginina
Resíduo T - tirosina
RDG - arginina-glicina-ácido aspártico
Rheb - Homólogo de Ras enriquecido no cérebro
RhoA - Família Rho de pequenas GTPases
ROGDI - *Ziper* de leucina atípico *Rogdi*
RUNX – fator de transcrição relacionado Runt
RUNX2 – fator transcrição relacionado runt-2
SERCA2 – retículo endoplasmático Ca-ATPase,
SHH – do inglês *sonic hedgehog*
SHP2 - Proteína tirosina fosfatase-2 com domínio de homologia 2 de Src
SIBLING - do inglês, *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins*
SLC24A4 – canal de troca de Na/P /Ca 4

SLRP - do inglês *small leucine-rich proteoglycan*

Smads – do inglês um acrónimo da fusão *Caenorhabditis elegans Sma* e *Drosophila Mad*, Mothers against decapentaplegic

SMOC2 – Ligação modular de Ca²⁺ relacionada a SPARC

Snai2 - gene família *snail finger 2* de zinco

SOCE – do inglês *store-operated calcium entry*

SPARC – Proteína secretada ácida e rica em cisteína

STIM1 – do inglês *Atromal interaction molecule 1*

ssNMR - estado sólido da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR)

TAZ - coativador transcricional com motivo de ligação a

TA - amplificação transitória

TCF - Fator de células T

TEA - trietilamina

TGF- β - fator de crescimento transformador beta

TNAP - fosfatase alcalina tissular não-específica

TNF - fator de necrose tumoral

Traft6 – fator 6 associado ao recetor TNF

WIF1 – fator 1 inibidor de WNT

WNT – gene *wingless* integrado

I. INTRODUÇÃO

Ao longo da vida, a cavidade oral apresenta-se sujeita a agressões externas e internas que podem levar à vulnerabilidade das suas estruturas (1). Apesar das suas propriedades resistentes e protetoras, as doenças orais como a cárie dentária, a doença periodontal, a perda dentária, as lesões da mucosa oral, o cancro orofaríngeo, a doença oral relacionada com problemas de imunodeficiência humana como VIH/SIDA e o trauma dentário tornam-se num dos principais problemas de saúde pública no mundo (2). Uma saúde oral defeituosa prejudica tarefas simples como a mastigação, a comunicação, a alimentação, o sorriso, os aspetos sociais da vida cotidiana e o bem-estar pessoal, contribuindo para a redução da autoconfiança (2,3). Os dentes apresentam desgastes fisiológicos contínuos que, ao serem acentuados por fatores externos e internos, resultam em traumas dentários na forma de lesões não cariosas como abrasão, atrição, abfração e erosão (4). Estas lesões levam à perda dos tecidos mineralizados e respetivas estruturas (desmineralização), o que por sua vez pode levar à formação de uma dentina reacionária como resposta compensatória (2,3). A suscetibilidade à lesão de cárie encontra-se igualmente presente ao longo da vida da população mundial, correspondendo a um grande problema de saúde na maioria dos países industrializados. A um nível global, a prevalência da doença cárie em adultos é elevada, afetando quase 100% da população na maioria dos países (2,5). Pode ser interrompida e potencialmente revertida em estágios iniciais por meio da ligação de cálcio, fosfato e fluoreto, mas sem os devidos cuidados pode progredir levando à desmineralização dos tecidos duros e consequente destruição do dente (5,6).

A doença periodontal é caracterizada pela perda de estrutura de suporte do dente, devido a uma higiene oral deficiente ou fatores genéticos. A periodontite grave afeta mais de 700 milhões de pessoas (11% da população mundial), tornando-se numa das doenças inflamatórias crónicas mais prevalentes em todo o mundo, podendo levar à perda prematura dos dentes (7).

Para além das doenças orais, numerosos defeitos genéticos, e fatores ambientais podem afetar a formação, erupção, calcificação e maturação dos dentes, como a amelogénese imperfeita, dentinogénese imperfeita e agenesia dentária (9,10).

A compreensão do processo que leva à mineralização destes tecidos, permite demonstrar eventuais falhas que ocorreram, ou eventualmente demonstrar quais as

melhores formas de atuar. A desmineralização leva à perda de iões e consequente redução mineral, pode estar associada às fases orgânicas do mineral e ao aumento da porosidade do esmalte (11,13). Esta pode ser contrabalançada por uma deposição de minerais: remineralização. A magnitude relativa deste processo desmineralização-remineralização determina se ocorre a destruição ou o reparo do tecido. Atualmente vários agentes foram desenvolvidos de forma a compensar o desequilíbrio dos componentes do esmalte e da dentina (11,12)

Na formação do osso, vários componentes e interações moleculares são equiparados à formação dentária pois apresentam semelhanças na sua génese. Os parâmetros comuns entre ambos, facilitam a compreensão da biomineralização e dos processos bioquímicos envolvidos nos mamíferos (1).

A biomineralização é um processo dinâmico e complexo que se prolonga ao longo da vida. Os organismos vivos apresentam um mecanismo inerente, que atua na formação de nanocristais inorgânicos dentro das matrizes orgânicas para formar tecidos biológicos híbridos únicos, como o esmalte, dentina, cimento e osso (1,13). Logo, materiais compostos com minerais inorgânicos com potencial de mimetizar as propriedades mecânicas destes tecidos, promovem um reparo fisiológico mais natural dos tecidos (1). Os tecidos dentários têm pouca ou nenhuma capacidade de autorregeneração (10). O esmalte é um dos tecidos mais mineralizados, atuando como barreira protetora para a dentina e a polpa. Não contém colagénio e uma vez formado é desprovido de quaisquer células, logo não tem capacidade de ser remodelado, tornando-se numa grande limitação (10,14).

A regeneração da dentina também é muito limitada, ao estar vinculada ao complexo polpa-dentina, encontra-se regulada sob os mecanismos da polpa. A sua compreensão bioquímica, entre matriz extracelular (ECM) e interações com o colagénio são essenciais para a deposição, desenvolvimento e crescimento dos cristais minerais (15).

Como a dureza dos tecidos está diretamente relacionada com o conteúdo mineral, a formação dos cristais nos tecidos mineralizados torna-se um aspeto fulcral no desenvolvimento da mineralização. Os cristais de hidroxiapatite desenvolvem-se a partir de uma fase mineral de fosfato de cálcio (16,17). Ao serem depositados num local específico em cada tecido, interagem com o meio através de trocas iónicas, de interações com proteínas e outros componentes da matriz (18). A compreensão da forma do seu crescimento em soluções aquosas, em função da supersaturação pode indicar novas

informações quanto ao processo de mineralização (19). Estudos adicionais são necessários de forma a identificar quais os processos bioquímicos concretos, necessários à mineralização correta do esmalte e dentina, de forma a gerar novos horizontes (11,22).

A presente revisão na literatura visa perceber a formação dos tecidos esmalte e dentina, através de uma análise das modelações das vias de sinalização, nas interações entre enzimas e iões que levam à sua formação e desenvolvimento. De forma a identificar fontes adequadas de células dentárias adultas, malhas de colagénio, proteínas e combinações de fatores de crescimento que podem direcionar adequadamente a modelação destas estruturas levando à regeneração de dentes funcionais (11,23).

II. DESENVOLVIMENTO

1. Cristais Hidroxiapatite

A hidroxiapatite estequiométrica (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) é o componente base biológico estrutural inorgânico em todos os tecidos mineralizados em animais vertebrados, apresentando como principal característica o seu polimorfismo. Em condições fisiológicas, a apatite tem a solubilidade mais baixa entre os minerais de fosfato de cálcio, sendo a fase mineral quimicamente mais estável (35). A HAp estequiométrica tem uma estrutura do tipo P21/b. Devido a substituições inerentes ao meio as apatites biológicas são geralmente indexadas no grupo espacial hexagonal P63/m. É uma estrutura cristalina de simetria hexagonal, compreendendo tetraedros PO_4^{3-} coordenados com iões de Ca^{2+} . Os grupos tetraédricos apresentam fósforo no centro, e no topo são ocupados por 4 átomos de O₂. Cada tetraedro PO_4^{3-} é compartilhado por uma coluna, delimitando dois tipos de canais não conectados. Os iões H^+ em soluções aquosas apresentam a capacidade de difundir e serem substituídos por outros iões. O Ca^{2+} apresenta dois tipos de posições únicas, formando canais que permitem o movimento dos aniões ao longo do eixo c do cristal de apatite, servindo de hospedeiro para grupos OH^- no eixo, equilibrando a carga positiva da matriz. O primeiro canal é rodeado por iões Ca^{2+} (Ca (I), 4 por célula unitária). O segundo canal (Ca (II)) contém 6 iões de Ca^{2+} localizados na sua periferia. A existência de dois locais de Ca^{2+} diferentes é vantajoso na medida em que possibilita o ajuste de HAp por modificações específicas dos locais (36,37). As apatites biológicas são não estequiométricas devido à deficiência de Ca^{2+} e/ou substituições dos grupos de PO_4^{3-} e/ou OH^- . Atualmente, o modelo de calcificação biológica aplicado é de apatite carbonatada não estequiométrico, tanto no osso, como no esmalte e dentina. A preparação da hidroxiapatite não estequiométrica pode ser explicada pelo facto da perda do Ca^{2+} ser corrigida pela introdução de H^+ e depleção de OH^- . Assim, em solução aquosa os iões das apatites biológicas apresentam a capacidade de ser substituídos por outros equivalentes como por exemplo os iões de fluoreto, carbonato ou cloro (24,36,38). A HAp carbonatada tem reduzido teor de cálcio e de grupos hidroxilo em relação à HAp estequiométrica. Os iões carbonato apresentam dois sítios aniônicos na estrutura da apatite: nos sítios PO_4^{3-} e nos sítios OH^- . Outros iões também se encontram presentes parcialmente substituídos na estrutura cristalina: Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , SiO_4^{4-} e Cl^- numa camada superficial

hidratada. A presença de hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) em substituição dos iões PO_4^{3-} é igualmente possível e parece ocorrer concomitantemente com um déficit de Ca^{2+} na HAp. Esta forma de apatite biológica resulta na troca de iões bivalentes: CO_3^{2-} e HPO_4^{2-} (37,38).

O mineral da dentina é semelhante ao do osso. Geralmente estão intimamente associados à matriz de colagénio, amplamente dispostos com os seus eixos c paralelos ao colagénio. No entanto, o osso apresenta mais vestígios de carbonato (39). Estudos demonstram que matrizes semelhantes ao colagénio tipo I, podem promover o crescimento do mineral de apatite carbonatada, mesmo na ausência de outras moléculas da ECM (35).

A apatite é o principal componente inorgânico. A estrutura amorfa precipita numa solução de fosfato de cálcio altamente supersaturado, convertendo-se prontamente em fases cristalinas termodinamicamente estáveis, como fosfato de cálcio ou apatite. A teoria clássica defende o crescimento do cristal, a partir de precipitados de uma solução fisiológica aquosa para formar aglomerados de cristal e iniciaram a mineralização. Contudo acredita-se que exista uma fase percussora de fosfato de cálcio amorfo ou fosfato de octacálcio (35,41).

2. Desenvolvimento embrionário do dente

A biomineralização dos tecidos calcificados, é um processo pelo qual iões inorgânicos são acumulados em conformações coordenadas, juntamente com moléculas orgânicas (19). Este processo apresenta um alto nível de controlo espacial e hierárquico. O seu ambiente exige condições específicas de temperatura e de pressão ambiental de forma a originar interações necessárias ao seu desenvolvimento (19,20). Os processos nos quais resultam os tecidos mineralizados iniciam-se durante o desenvolvimento embrionário, prolongando-se após o nascimento. No dente envolvem interações entre o ectoderma e as células da crista neural, originando as células núcleo para a formação do esmalte (pelos ameloblastos) e da dentina (pelos odontoblastos). No osso envolvem mecanismos de ossificação endocondral, que possuem fases condrocíticas e osteogénicas, e hormonas de forma a impulsionar a formação óssea (21). Estudos *in vivo* com micromamíferos, culturas organótipo e modelos geológicos presentes na natureza permitiram examinar os mecanismos reguladores subjacentes à formação biológica e mineral. Vários destes componentes bioativos são expressos num padrão espaço-temporal,

durante o desenvolvimento dos tecidos dentários. Ao longo da literatura a descrição sobre a temática tem como base explicativa esses estudos (22,23).

A formação dos tecidos dentários, ou odontogénese, é um processo de eventos celulares que origina a formação do dente. A odontogénese é caracterizada pela formação da dentição decídua que posteriormente é substituída pela dentição permanente (13). O dente maduro é definido por duas regiões: a coroa – porção que se encontra em contacto com a cavidade oral localizada a cima da gengiva - e a raiz – porção inserida no osso alveolar – como detalhado na Figura 1 (24). Na coroa a camada mais externa é denominada esmalte, na raiz é denominada cimento. A dentina está presente em ambas, na sua superfície exterior na região da coroa, encontra-se em estreito contato com o esmalte e na raiz com o cimento. Na sua superfície interior encontra-se em extremo contato com a polpa dentária (13). A polpa dentária encontra-se na região central do dente, na câmara pulpar. É um tecido conjuntivo altamente vascularizado e innervado que acomoda células estaminais, odontoblastos, oxigénio e células inflamatórias, de forma a manter a viabilidade e vitalidade do dente (13,25).

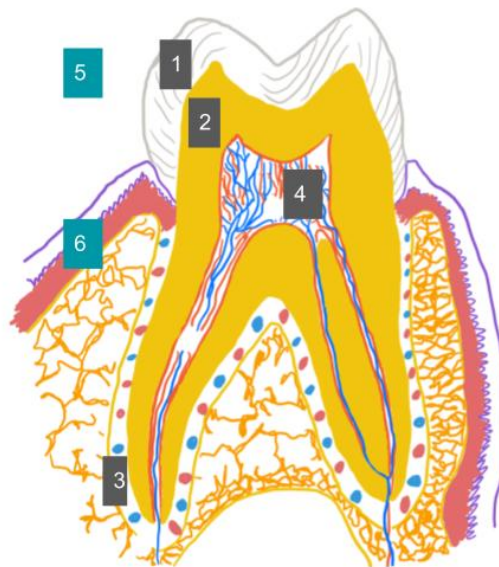


Figura 1 - Secção transversal dente molar.

1 – esmalte; 2 – dentina; 3 – cimento; 4 – polpa; 5 – coroa; 6 – raiz, (Adaptado (102))

A odontogênese inicia-se por meio de interações epiteliaismesênquimais. O epitélio deriva da endoderme e o mesênquima deriva da crista neural. O epitélio oral embrionário, ou endoderme, é separado do tecido conjuntivo subjacente por uma lâmina basal que, através do seu espessamento, forma a banda epitelial primária, região específica onde se origina o desenvolvimento dentário. As atividades celulares mitóticas nesses espessamentos epiteliais induzem a migração de células para o mesênquima onde, a partir da banda epitelial primária, se forma a lâmina dentária. Na lâmina ocorrem interações moleculares que vão dar origem ao desenvolvimento do gérmen dentário. Assim, esta área precede a formação inicial de cada dente (24,26).

A formação dentária ocorre de forma sequencial através dos seguintes estágios: estágio de botão, chapéu e sino (ou campânula) - como representado na Figura 2. A sua morfogênese e desenvolvimento envolve distintos fenômenos que se complementam e relacionam. Vários inibidores e ativadores específicos de sinalização têm papéis centrais na modulação local das atividades destes sinais. As diferentes vias de sinalização são integradas em vários níveis, funcionando através de efeitos sinérgicos (25,27). As diferentes vias de sinalização incluem os fatores de crescimento BMP (proteína morfogénica do osso), os fatores de crescimento do fibroblasto (FGF), os fatores de transcrição *Hedgehog* (HH), os fatores da família do gene *wingless* integrado (WNT) e os fatores de necrose tumoral (TNF) (28).

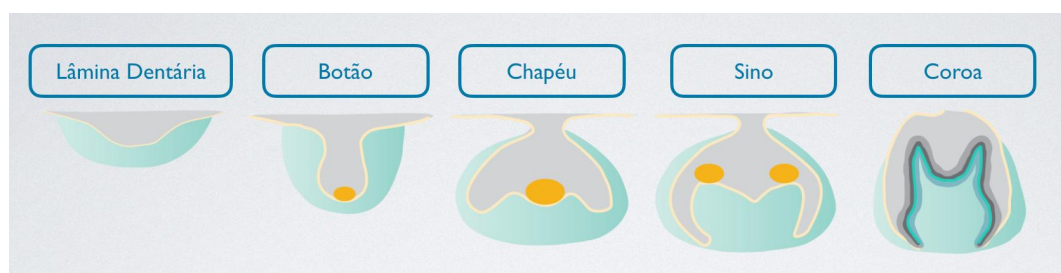


Figura 2 - Estágios Odontogênese.

Esquerda para a direita: inicialmente formação da lâmina dentária, estágio botão, estágio de chapéu, estágio de sino e formação da coroa, (Adaptado de (32)).

No estágio botão, é observado o início de uma invaginação epitelial. Os sinais necessários para a sua formação partem principalmente do epitélio oral para o ectomesênquima. As células ectodérmicas regulam o desenvolvimento do placódio dentário, permitindo o surgimento do epitélio (25,27). Os primeiros sinais epiteliais induzem no mesênquima a expressão de moléculas sinalizadoras recíprocas, que atuam novamente no epitélio regulando a formação do placódio dentário (27). Estas moléculas

apresentam uma regulação cruzada entre o epitélio e o mesênquima (29). No final deste estágio, o tecido epitelial ganha espessura e curva-se em torno do tecido mesenquimal, agregam-se formando o gérmen dentário, uma estrutura com formato semelhante a um botão (24,28). Nesta fase surge os centros de sinais de regulação da forma da cúspide, os nós de esmalte. Estes determinam os locais onde a folha epitelial se dobra e inicia o desenvolvimento da cúspide (28,30).

Durante a transição do estágio botão para chapéu na região distal do botão observa-se o nó de esmalte primário, responsável pela produção de várias moléculas sinalizadoras (24,29). Os sinais orquestrados nesta região promovem a continuidade das interações durante a morfogênese dentária nos subsequentes estágios de chapéu e sino. Os dentes que apresentam várias cúspides perdem o nó de esmalte primário e adquirem nós de esmalte secundários na localização futura de cada cúspide. Os nós de esmalte secundários expressam maioritariamente as mesmas moléculas que os primários (24,25).

No estágio de chapéu, os tecidos adquirem a conformação de gérmen dentário: as suas estruturas compreendem o componente epitelial, o órgão do esmalte e o componente mesenquimal ou papila dentária, os quais originam o esmalte e o complexo dentinopulpar, respetivamente (27). O órgão do esmalte é composto pelo epitélio externo (região convexa) e epitélio interno (região côncava). No seu interior, as células epiteliais apresentam uma morfologia estrelada, iniciando a síntese de glicosaminoglicanos, tornando-se células do retículo estrelado. Na zona de união entre o epitélio externo e interno, encontra-se a alça cervical, uma região epitelial proliferativa do dente (27,31). No epitélio interno, mais concretamente na região adjacente à sua concavidade, observa-se a papila dentária, onde ocorre a condensação do mesênquima. Na fase de chapéu, o ectomesênquima, que envolve todo o germe dentário, sofre igualmente uma condensação e as suas células, que constituem o folículo dentário, dão origem aos componentes do periodonto, através dos cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos (27). No final do estágio de chapéu, na transição para o estágio de sino, as células epiteliais acumulam-se no nó de esmalte. Os designados nós de esmalte sinalizam a proliferação das células adjacentes, contribuindo para o início da diferenciação celular (28,32).

As células do epitélio interno, estimuladas por via das integrinas à superfície das suas membranas, expressam e secretam para a matriz extracelular moléculas sinalizadoras e fatores de crescimento que atuam nas células não diferenciadas da papila (sinalização parácrina), induzindo a sua diferenciação em pré-odontoblastos. Reciprocamente, as células do epitélio interno são estimuladas a diferenciar-se em pré-ameloblastos. Nesta

fase, o epitélio interno e o mesênquima encontram-se ainda separados por uma membrana basal (27).

No estágio de sino, a invaginação do epitélio dentário interno aumenta adquirindo um formato de sino. Durante esta fase, ocorrem várias alterações histoquímicas no órgão do esmalte, papila dentária e folículo dentário. O estrato intermediário aparece no órgão do esmalte entre o retículo estrelado e o epitélio dentário interno (26,28). As células da papila dentária encontram-se aderidas às células epiteliais internas através de uma membrana basal, possibilitando a transmissão de sinais entre os dois tecidos. As moléculas de sinalização do epitélio interno induzem a diferenciação das células da papila dentária em odontoblastos. Por sua vez, estes induzem as células do epitélio interno a diferenciarem-se em ameloblastos, dando início à fase de mineralização da dentina e o do esmalte. A formação da dentina precede ligeiramente a formação do esmalte (33). Após a formação da coroa, a alça cervical das células epiteliais, alonga-se formando uma estrutura epitelial de camada dupla localizada entre o folículo dentário e a papila dentária, designada como bainha da raiz epitelial de Hertwig (HERS) (26,28). A HERS é considerada como o centro de sinal da formação da raiz. A HERS transmite estímulos às células mesênquimais da papila dentária induzindo a diferenciação em odontoblastos, os quais vão formar a dentina radicular, proporcionando o crescimento da raiz. Permite o contacto das células do folículo dentário com a superfície da dentina radicular, originando a deposição da primeira camada de cimento (25,27). O destino das células progenitoras do folículo dentário é mantido por meio da sinalização do péptido PTHrP, relacionado com a hormona paratireóide (também conhecido como Pthlh) e do seu recetor PPR (também conhecido como Pth1r). A perda de Pth1r causa diferenciação prematura em células semelhantes a cementoblastos, resultando em fixação periodontal defeituosa (34).

O processo de formação do esmalte e da dentina compreende uma interação complexa entre componentes. A mineralização do esmalte e da dentina inclui uma cascata complexa de eventos regulados por células que expressam proteínas da matriz. A abundância de proteínas da matriz sintetizadas por ameloblastos e odontoblastos retrata a complexidade envolvida durante a formação desses tecidos. A formação do esmalte dentário ocorre num ambiente extracelular confinado entre a dentina e as células ameloblásticas em movimento. A matriz extracelular rica em amelogenina é continuamente secretada e montada com não amelogeninas e o mineral resulta de uma "matriz mineralizada de formação". Na dentina, a mineralização é definida como "matriz pré-formada". O seu processo é mediado pela matriz, resultando na sua formação. As

fibrilhas de colagénio autoformadas servem de modelo para alocar proteínas não colagénicas, onde os núcleos cristal são inicialmente depositados, orientando o crescimento adicional do cristal, na dentina e no osso (17,20,35). Na natureza, a conversão de fosfatos de cálcio inorgânicos em apatites cristalinas requer condições rigorosas de temperatura, pressão e pH, sob controlo molecular restrito. Assim, materiais que procuram mimetizar estes componentes necessitariam de reproduzir as condições biológicas necessárias para a biomineralização da apatite de forma a originar um ambiente equivalente a alguns dos ambientes extremos que ocorrem durante a cristalização fisiológica da hidroxiapatite (14). A matriz extracelular proporciona uma estrutura física para manter a integridade estrutural de organismos multicelulares, serve como um reservatório para sinais bioquímicos e biofísicos de forma a apoiar a sobrevivência, organização e diferenciação celular (36). Define os locais onde a mineralização começa e o tamanho de crescimento dos cristais. No esmalte o modelo é estruturado por meio de automontagem mediada por moléculas de amelogenina resultando na formação de estruturas em forma de esferas, termodinamicamente estáveis, que constituem as unidades fundamentais da matriz extracelular (36).

3. Dentinogénese

3.1. Diferenciação e Polarização

Durante a odontogénese, no final do estágio de chapéu, as células da papila dentária indiferenciadas são estimuladas a sofrer divisão celular. Após a mitose, as células em contato com a membrana basal iniciam o processo de diferenciação, enquanto as mais afastadas, que não contactaram com a membrana, passam a fazer parte da camada celular de Höhl. As células associadas à membrana basal, aumentam de tamanho, desenvolvem saliências na membrana citoplasmática e aderem à superfície da membrana basal (37). Adicionalmente, à sua superfície contêm recetores designados por integrinas, os quais permitem receber sinais de ligandos extracelulares, proporcionando a adesão e a mudança da forma celular. A membrana basal atua como via de difusão de sinais e moléculas entre as células do epitélio interno e as células da papila dentária em diferenciação. A sinalização por via das integrinas é possibilitada por um complexo intracelular de proteínas, que se liga aos filamentos de actina e controla as cascatas de sinalização que regulam o rearranjo do citoesqueleto das células em desenvolvimento (38).

A membrana basal envolve diversas glicoproteínas como a laminina e a fibronectina, sulfato de heparina PG e alguns glicosaminoglicanos GAGs. A fibronectina, uma glicoproteína da ECM e molécula de adesão, está presente na junção epitélio-mesenquimal antes e após a diferenciação do odontoblasto, podendo interagir com colagénio do tipos I, III e IV presentes na junção, o que facilita adesão celular (39). A laminina α 2 interage com o proteoglicano de sulfato de heparina, regulando a adesão celular envolvida com a expressão do epitélio dentário. As ligações via integrina β 1 são cruciais para a indução da disseminação celular, polimerização e reorganização intracelular dos organelos (40). A panexina 3 (PANX3 - família de proteínas de junção *gap* panexina) é expressa nos pré-odontoblastos e está relacionada com a redução da proliferação celular e indução da diferenciação, através do aumento da expressão de p21 (inibidor 1 cinase dependente de ciclina) (41). A membrana basal sofre alterações de acordo com as fases de diferenciação dos pré-odontoblastos, apresentando-se, nesta fase, como uma rede fibrosa formada por ligações GAG-colagénio, fibronectina-colagénio e fibronectina-GAG. A fibronectina também pode servir como glicoproteína estrutural de reticulação nas membranas basais, desempenhando um papel importante na sua organização interna (39).

Na diferenciação de pré-odontoblastos a odontoblastos, os núcleos migram gradualmente para a região basal da célula (polarização celular) e sofrem uma alteração morfológica correspondendo a uma extensão citoplasmática tubular designada de processo. Os odontoblastos apresentam um corpo celular no polo basal (local próximo, no limite da câmara pulpar) e um processo celular no polo apical (local distal, em estreito contato com a membrana basal) (27).

3.2. Formação da dentina do manto

Durante a deposição da primeira camada dentinária, o colagénio do tipo III/ V é secretado pelo corpo celular do odontoblasto (19,33). As fibras de colagénio e a fibronectina promovem a adesão celular (33). O hemicanal Panx3 regula a sinalização de calmodulina-Smad (samd - principais transdutores de sinal para recetores da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β)), induzindo a expressão de *DSPP*. Panx3 também atua como um canal no retículo endoplasmático (ER) cálcio para aumentar os níveis intracelulares de cálcio para a diferenciação do odontoblasto. Nos osteoblastos, PANX3 funciona como o canal ER cálcio que ativa a sinalização CAMKII-SMAD

(proteína cinase dependente de calmodulina II) e a expressão de Osterix (Osx) necessária para a secreção de cálcio (41).

A mineralização da dentina do manto, é processada através de vesículas, relaciona-se com a mineralização da cartilagem calcificada e com o osso. As vesículas apresentam um conteúdo amorfo, estabelecendo uma relação próxima com proteoglicanos e glicosaminoglicanos que se ligam aos íons de cálcio – como detalhado na Figura 3 - (42,43).

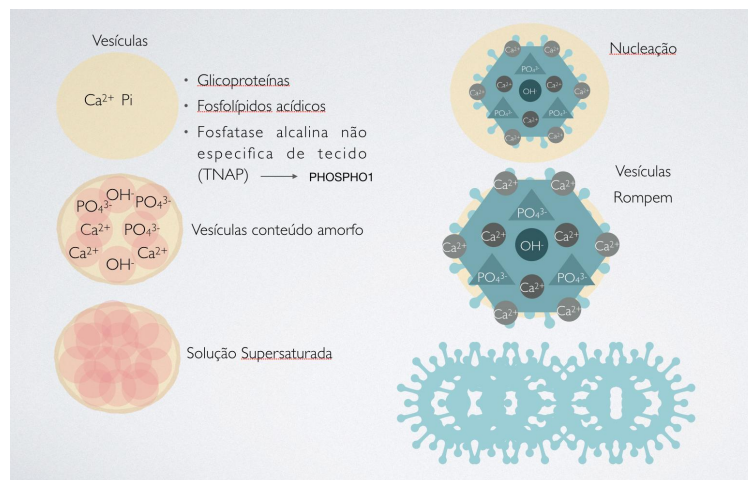


Figura 3 - Mineralização Dentina Manto.

Esquerda: conteúdo das vesículas Ca-P; vesículas com conteúdo amorfo; solução supersaturada. Direita: nucleação dos cristais; cristais rompem as vesículas; cristais contactam com adjacentes, mineralização, (Autoria própria).

Após a secreção da matriz extracelular os processos celulares libertam, na região apical vesículas com conteúdo mineral. Estas apresentam incorporadas glicoproteínas, fosfolípidos ácidos, fosfatase alcalina, metaloproteínases. O seu interior permite acumular altas concentrações de íons de cálcio e fosfato inorgânico. Por sua vez, é estabelecido uma relação próxima com proteoglicanos e glicosaminoglicanos pela sua alta afinidade aos íons de cálcio (42,43). A participação de fosfatase alcalina tissular não-específica (TNAP) codificada pelo gene *Alpl*, leva à modificação da matriz extracelular e expressão de fosfatase Orfan 1 (PHOSPHO1), o fator iniciador da deposição de HAp no interior das vesículas de matriz (1,28,43). O Ca^{2+} e PO_4^{3-} acumulam-se no seu interior, originando uma solução supersaturada, induzindo a nucleação cristalina. Com o crescimento do cristal dentro das vesículas, estas rompem depositando-se na matriz. Mais tarde os cristais fundem-se com os adjacentes e mineralizam - como representado na Figura 3. A membrana basal gradualmente dissolve-se exibindo descontinuidades pela secreção de enzimas tanto do esmalte e dentina (33,44). O colagénio remanescente

agrega-se com as fibras da matriz, perpendicularmente à membrana, formando uma malha, fortalecendo a futura formação da JAD (33,44).

3.3. Formação da dentina intertubular

A diferenciação celular é caracterizada pela amplificação da síntese de colagénio tipo I e de proteínas não colagénicas no interior celular dos odontoblastos. A presença da expressão de DMP1 regula diretamente a expressão de DSPP ligando-se ao seu promotor ativando a sua transcrição (20). A DSPP é considerada uma proteína precursora, ativada após o processamento proteolítico pela proteína morfogenética óssea de metaloproteinase de zinco-1 (BPM1) resultando em dois fragmentos de proteína: DPP e DSP. O DSP liga-se à integrina $\beta 6$ e causa a ativação de ERK1/2 e P38 (proteína cinase regulada por sinal extracelular / proteínas cinase ativação-mitogénio), atuando na fosforilação de Smad 1/5/8 induzindo a diferenciação do odontoblasto mediada pela expressão aumentada de DSPP e DMP1 (37). Numa fase terminal da diferenciação, as integrinas de superfície celular específicas $\alpha 4\beta 1$ ligam-se a DPP interagindo com domínios RGD. Este complexo de adesão permite a ativação de complexos focais (FAK-paxilina-integrina) que atuam na organização do citoesqueleto, onde a polimerização de actina impulsiona a extensão de protrusões na frente da célula levando a alterações na sua conformação, por sua vez permitindo a migração da celular (44).

Uma vez formada a dentina do manto, inicia-se a secreção de uma nova camada de matriz orgânica na região inferior interna, região esta denominada frente de mineralização. Esta camada corresponde a uma área entre a interface de dentina mineralizada e uma pré-dentina distal não mineralizada, que permite a interação entre componentes da matriz originando uma nova camada de dentina. Este processo ocorre de forma incremental pela deposição sucessiva de matriz e mineralização. Nesta fase, os corpos celulares apresentam-se fora do tecido mineralizado, numa direção considerada proximal, caracterizada como pré-dentina produzida centrípetamente, e constante ao longo da dentinogénese. A camada de pré-dentina é secretada pelos corpos celulares dos odontoblastos, apresentando como conteúdo o colagénio tipo I nativo e alguns proteoglicanos (decorina, biglicano, lumicano, fibromodulina) implicados na fibrilhação do colagénio (19,33). Simultaneamente, o corpo celular afasta-se em direção à câmara pulpar e os processos celulares estendem-se para a região distal. Na extensão da membrana celular, desenvolvem-se ramificações, que por sua vez originam estruturas

semelhantes secundárias. O seu citoesqueleto, apresenta microfilamentos, filamentos intermediários e microtúbulos, sem organelas de síntese, exceto algumas pequenas mitocôndrias na base dos processos próximos ao corpo celular. Apresenta também vesículas secretoras que envolvem os componentes da prédentina e vesículas endocíticas com fragmentos moleculares da maturação e degradação parcial desta mesma camada. Sucessivamente estes distanciam-se da dentina mineralizada onde os processos celulares mantêm-se incorporados formando os túbulos dentinários – como detalhado na Figura 4 (26,39).

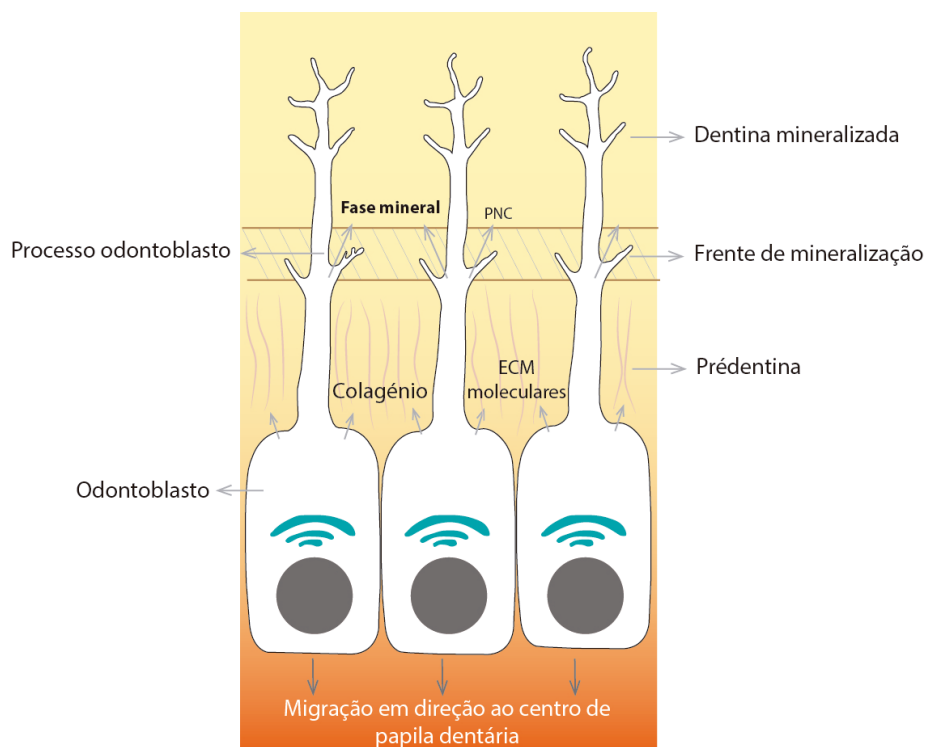


Figura 4 – Odontoblasto.

Representação migração odontoblasto; camadas da dentina; Corpo celular na porção proximal; processos celulares em direção à dentina mineralizada; dentina mineralizada; frente de mineralização; prédentina; componentes da matriz, (Adaptado de (47)).

Na matriz extracelular, a fibronectina é redistribuída, interagindo juntamente com a decorina na reorganização dos componentes intracelulares, acumulando-se no polo apical juntamente com colagénio do tipo I. A fibronectina e o colagénio tipo I formam um complexo via integrinas interligando-se aos microfilamento e microtúbulos no interior celular induzindo modificações citológicas – como detalhado na Figura 2 (19,33). O corpo celular, responsável pela síntese da matriz extracelular, secreta procolagénio, glicoproteínas, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, enzimas e PNC (proteínas não colagénicas) para o espaço extracelular (19,33). A principais PNC incluem DSPP que sofre clivagem imediata dando lugar a DSP e DPP, DMP-1, OPN, MEPE, BSP,

amelogenina. A DSP sofre clivagem do terminal-C pelas metaloproteinases MMP2 e MMP20 levando à libertação de um terceiro fragmento denominado glicoproteína dentinária (DGP), que possui forte afinidade pela hidroxiapatite (37). No limite entre o corpo e o processo do odontoblasto uma área de junções intercelulares separa o compartimento extracelular da zona subodontoblasto. Um local onde apresenta fibras sintetizadas pelas células pulpares. Essas fibras são compostas principalmente de colagénio tipo I e III e fibronectina (fibras de Von Korff). Esta região vai atuar como um filtro seletivo, permitindo a passagem de vesículas secretoras e endocíticas. Posteriormente os complexos juncionais desenvolvem-se para junções do tipo desmossomas, junções comunicantes e junções estreitas, mantendo a membrana plasmática do corpo celular unidas com os odontoblastos adjacentes, formando uma estrutura palhiçada (19,33). A proteína de membrana integral ocludina (OCLN) encontra-se associada às junções comunicantes em odontoblastos. O complexo está presente nos espaços intercelulares permitindo a regulação ativa de cálcio. O domínio de DSPaa interage com alça extracelular 2 de OCLNaa, fosforilando OCLN em Ser, ativando a fosforilação de FAK em Ser722 e Tyr576, proporcionando a entrada de cálcio. No entanto, o mecanismo como OCLN fosforila FAK em Ser722 e Tyr576 permanece desconhecido, pois existem vários locais potenciais de fosforilação Tyr, Ser e Thr em FAK. Estudos adicionais são necessários para esclarecer o mecanismo (38).

A dentina circumpulpar resulta de mudanças que ocorrem entre a pré-dentina distal não mineralizada dinâmica e a dentina localizada na região distal à frente de mineralização – como detalhado na Figura 4. Na pré-dentina proximal os corpos celulares dos odontoblastos incorporam prolina e hidroxiprolina nas cadeias pro-alfa 1 e pro-alfa 2, iniciando a síntese de fibrilhas de pro-colagénio nas vesículas de Golgi. Ao serem secretadas na matriz, as fibrilhas de pro-colagénio são hidrolisadas nos domínios N- e C-terminal, originando o tropocolagénio que, uma vez formado, tende a agregar-se imediatamente a outras moléculas, formando as fibras. Consequentemente, alongam e agregam-se influenciados pela ação de pequenos proteoglicanos ricos em leucina. As cadeias GAG do sulfato de condroitina (CS) e do sulfato de dermatanina (DS), atuam na inibição da mineralização, proporcionando a fibrilhação do colagénio (42,45). Por sua vez, o colagénio migra em direção à frente de mineralização e forma ligações cruzadas garantindo estabilidade às fibrilhas de colagénio, permitindo iniciar a mineralização de uma nova camada de dentina. O seu movimento da pré-dentina proximal para a distal é regulado por uma substância amorfa atuando como um gel viscoso permitindo a

translocação das fibrilhas. Estudos indicam que a matriz interfibrilar rica em glicosaminoglicano é amorfa, e como tal, pode cumprir esse requisito. Posteriormente os PG são alvo de substrato da enzima estromelina (MMP-3), sofrendo degradação (42). Numa zona próxima à frente de mineralização os GAG associados à família proteoglicanos pequenos ricos em leucina (SLRP) de classe II, sulfato de queratana (KS), atuam na organização da matriz e direcionam a ligação da hidroxiapatite e o crescimento do cristal. A osteoadherina (OSAD), um KS-SLRP, apresenta alta afinidade para hidroxiapatite, através do grande e ácido terminal-C. Esta liga-se às fibras de colagénio helicoidal tripla e estabiliza a arquitetura geral da ECM. Estudos (46) indicam que as proteínas não colagénicas podem funcionar como reticuladores não covalentes, ligando as fibrilhas de colagénio formando um molde ordenado, necessário para mediar a deposição mineral controlada (42,46).

Continuamente, o corpo celular do odontoblasto sintetiza moléculas da matriz extracelular, permitindo a sua secreção através do processo celular. Na frente de mineralização, o colagénio encontra-se organizado por unidades paralelas entre si. Apresentam regiões de sobreposição, que servem de guia para a deposição de cristais, e nas suas extremidades ocorrem espaços com orifícios, para alocar os cristais. O transporte de iões é facilitado pela atividade da fosfatase alcalina e bombas cálcio-ATPase. O cálcio é transferido da rede vascular na área subodontoblástica, para a extremidade proximal dos odontoblastos, ativamente transportados pelas vias intracelulares no citoplasma do corpo do odontoblasto, estes ligam-se a proteoglicanos com afinidade ao cálcio, como calmodulina, a calbindina de 28 kDa, a parvalbumina e as anexinas III a VI e são secretados na frente de mineralização para serem incorporado na fase mineral. O fosfato é incorporado por ação de várias enzimas, nomeadamente a TNAP, que atua na desfosforilação de algumas proteínas da ECM, hidrolisa o pirofosfato e fornece fosfato inorgânico para promover a mineralização (34,40). Quando incorporados nesta camada, a presença de PNC, proteoglicanos, e outras proteínas fosforiladas contribuem para a mineralização da dentina (34).

Na mineralização da dentina, a formação dos cristais de hidroxiapatite, depende dos locais onde ocorre a mineralização. A mineralização interfibrilar ainda levanta algumas questões, devido aos padrões de mineralização das fibrilas de colagénio altamente mineralizadas com os cristais HAp orientados ao longo dos eixos das fibrilhas de colagénio. Dois modelos possíveis foram propostos, ambos considerando a existência de uma fase amorfa. Um modelo propõe que a natureza polieletrólítica das proteínas

ácidas não colagénicas é fundamental para formar complexos que estabilizam o ACP transitório (47). Esses complexos amorfos ligam-se às zonas de orifício das fibrilhas, possibilitando a transformação de uma fase amorfa para uma fase cristalina – como representado na Figura 5. Segundo este modelo, o crescimento do cristal é controlado pela inibição de certos planos cristalográficos através de moléculas vizinhas do colagénio e adsorção preferencial de PNC a planos cristalográficos minerais da apatite específicos ao seu crescimento. O segundo modelo sugere que a cristalização seja promovida pela presença de um péptido aniónico cuja função é estabilizar à sua superfície um precursor mineral amorfo em fase líquida (pré-HAp). De acordo com este modelo, o carácter fluido do precursor amorfo facilita a mineralização intrafibrilar, pois a fase mineral pode infiltrar nas zonas de orifício e fibrilhares do colagénio por ação capilar. Após a perda de água de hidratação o precursor solidifica e cristaliza, formando cristais de HAp nas fibrilhas de colagénio – como representado na Figura 5 (41).

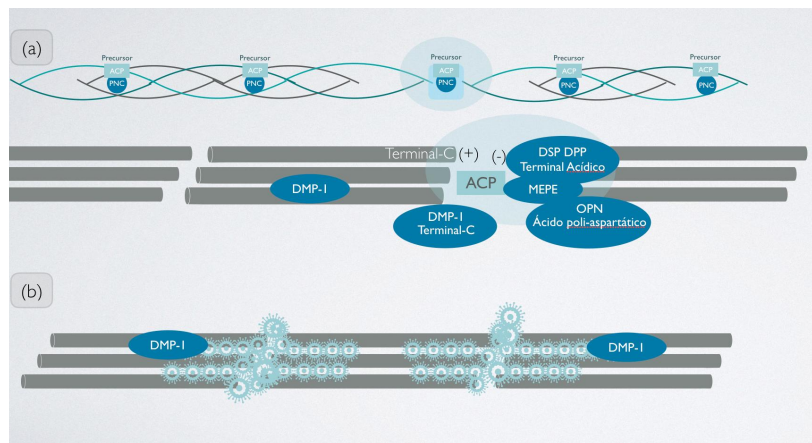


Figura 5 - Mineralização Intertubular.

(a) Mineralização zonas de orifício do colagénio. Estabilização estrutura amorfa pelos domínios polianiónicos PNC. (b) Mineralização dos Cristais de Hidroxiapatite (círculos azul claro), paralelamente às fibras de colagénio, (Autoria própria).

A matriz extracelular é crucial para a correta mineralização. A matriz de colagénio representa uma estrutura ideal para a deposição de Ca-P em locais específicos, facilitando a sua precipitação e expansão por toda a camada dos interstícios das fibrilhas. A deposição mineral dentro da zona de lacuna é considerada intrafibrilar e aquela que ocorre na superfície externa das fibrilhas é chamada de mineralização interfibrilhar ou extrafibrilhar (41). Os PG são os principais responsáveis pela estabilização das fibrilhas de colagénio. Estes são macromoléculas com uma série de cadeias laterais glicosiladas, glicosaminoglicanos (GAG), covalentemente ligado a um núcleo de proteína. A interação

dos PG/GAG com o colagénio é caracterizada por essa proteína do núcleo, principalmente pela decorina. A decorina e biglicano (membros da família de pequenas repetições ricas em leucina - SLRP), retêm um núcleo de proteína que adota uma configuração helicoidal dobrada estabilizada por ligações de hidrogénio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, possivelmente para se ligar a quatro ou mais microfibrilhas de colagénio por meio de uma matriz de ligações de hidrogénio. As cadeias GAG interagem entre si unindo as fibrilhas e expandindo a rede de colagénio. Os proteoglicanos formam um complexo supramolecular interfibrilhar nanoestruturado mantendo a rede colagénio unida. A participação de moléculas de água e outros meios iónicos é crucial para permitir a formação do complexo proteoglicano-glicosaminoglicano garantindo a separação entre as fibrilhas de colagénio, promovendo um grau significativo de pressão osmótica na matriz orgânica (42,43).

Desta forma, as PNC vão atuar, formando um complexo que interage com a extremidade terminal-C carregada positivamente do colagénio, promovendo a infiltração da fase mineral nas fibrilhas. Os aminoácidos carregados formam aglomerados que atuam nos locais de nucleação, controlando a orientação dos cristais de apatite, tanto nas regiões de lacuna como nas zonas de sobreposição. A estrutura do colagénio apresenta regiões candidatos putativos para Ca^{2+} e PO_4^{3-} . Os iões de Ca^{2+} interagem com os resíduos ácidos, combinam-se com PO_4^{3-} iniciando a nucleação. Estudos indicam que grupos carregados na estrutura do colagénio podem entregar locais de nucleação que induzem a nucleação da apatite – como detalhado na Figura 5 (41).

A DMP1 está envolvida na organização mineral fora da fibrilha de colagénio e na mineralização da dentina peritubular (41). Ao ser secretada pelo odontoblasto na frente de mineralização, a proteína DMP1 sofre clivagem proteolítica e, na presença de iões Ca^{2+} , altera a estrutura secundária na sua extremidade C-terminal para uma folha β , que lhe permite assumir uma conformação estereoespecífica favorável simultaneamente à nucleação de cristais e à estabilização transiente dos precursores de Ca-P, prevenindo a sua precipitação prematura. A região C-terminal das DMP1 é altamente ácida devido aos resíduos de ácido glutâmico abundantes ao longo com serinas que podem ser fosforiladas, aumentando a carga negativa. Logo propenso a direcionar-se aos locais de orifício nas fibrilas de colagénio. Na presença de colagénio tipo I, tanto a sua forma nativa como a sua forma fosforilada, através do terminal-C, permitem induzir a nucleação e crescimento de HAp, ao invés do terminal-N que inibe a nucleação (20,42).

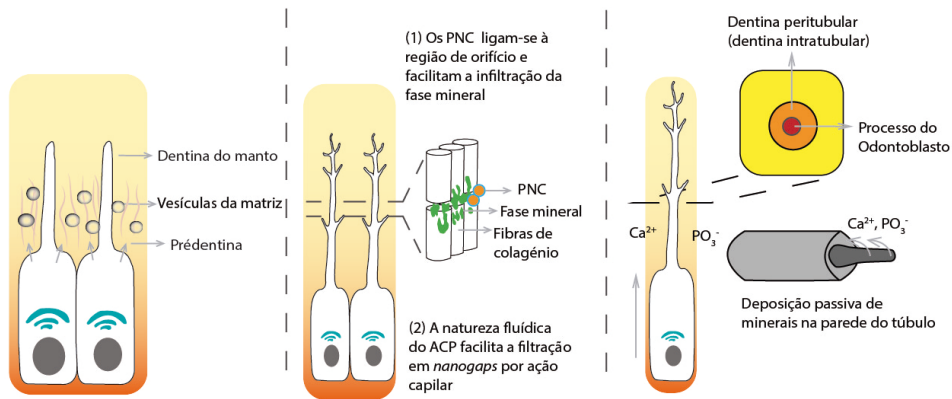


Figura 6 - Tipos de mineralização dentina (adaptado de Odontoblasto. Painel à esquerda: formação da dentina do manto; Painel central: formação da dentina peritubular; Painel à direita: mineralização dentina peritubular, (Adaptado de (47)).

3.4. Formação da dentina peritubular

A dentina peritubular é uma dentina hipermineralizada que se forma ao redor dos processos do odontoblasto, sensivelmente distanciada da frente de mineralização – conforme apresentado na Figura 6. Na frente de mineralização, a matriz mineralizada contrai o diâmetro do túbulo e o processo celular permanece incorporado cerca de 1/3 da distância da pré-dentina em direção ao JAD. As ramificações dos processos secretam moléculas da matriz extracelular ao longo das paredes dos túbulos. Simultaneamente os componentes do plasma sanguíneo, como albumina, difundem para dentro dos túbulos. A sua composição orgânica é uma mistura de ácido glutâmico contendo proteínas e fosfolipídios (ricos em colina), tais como fosfatidilserina, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina, juntamente com a presença de glicosaminoglicanos (glicoproteína alfa-2 HS) e alguns SIBLING. A sua estrutura é caracteristicamente desprovida de fibras de colagénio do tipo I. A matriz orgânica forma uma rede amorfa entre os cristais isodiamétricos ao longo do lúmen dos túbulos, onde posteriormente mineraliza apresentando uma forma de anel - como representado na figura 7. Os cristais permanecem em forma de placa dispostos em camadas de natureza porosa. Nos anéis são detetados ligeiras perfurações como canais pequenos, permitindo a passagem de componentes para a dentina intertubular e entre o fluido do túbulo e o processo celular (42,47). Estudos indicam que pode ocorrer um transporte ativo como atividades regulatórias relacionadas na manutenção do tecido vivo e vital ao longo da vida do dente - como indicado na figura 7 (48).

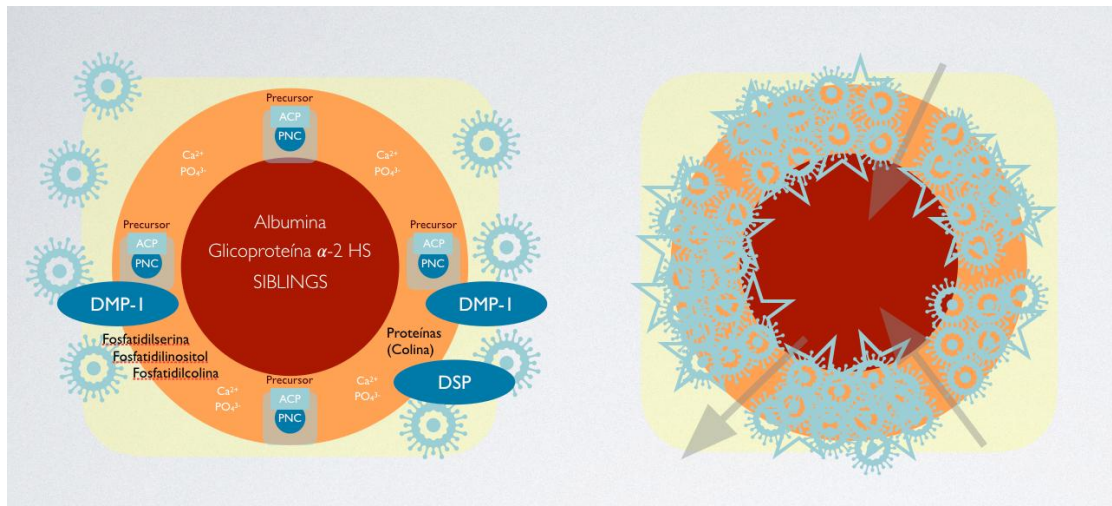


Figura 7 - Mineralização Peritubular.

Figura esquerda: componentes da matriz orgânica, desprovida de colagénio; rica em ácido glutâmico e proteínas ricas em colinas. Figura direita: mineralização em forma de anel; canais indicados pelas setas onde permite transporte ativo de componentes; permite manutenção de tecido vivo e vital ao longo da vida do dente, (Autoria própria).

3.5. Dentina Pós-eruptiva

A dentina pode ser considerada como um tecido conjuntivo calcificado em que o seu processo de formação compreende interações complexas entre vários fatores do tecido, celulares e extracelulares sendo reconhecido como equivalente ao do osso (25). É o tecido mais abundante no dente, apresenta 70% de matéria inorgânica (HAp), 20% de matriz orgânica e os restantes 10% de água. O colagénio tipo I é o principal componente da porção orgânica da dentina, correspondendo a cerca de 90%, com poucas quantidades de colagénio dos tipos III, IV e V (1). A porção não colagénica da matriz orgânica inclui proteínas fosforiladas e não fosforiladas, proteoglicanos, lipídios, fatores de crescimento e enzimas (1,26). Cerca de metade das proteínas não colagénicas desempenham funções como inibidores, promotores e estabilizadores da deposição do material mineral, encontrando-se envolvido nos poros de fibrilas (1,26). A porção inorgânica é composta maioritariamente por cristais de HAp com fisionomia de agulha (1,27).

4. Amelogénese

4.1. Diferenciação e Polarização Ameloblastos

Durante a odontogénese, na transição do estágio de chapéu para sino, o mesênquima induz o potencial odontogénico nas células do epitélio interno do esmalte. Na transição para o estágio de sino, as células do epitélio interno induzem a diferenciação das células da papila dentária em pré-odontoblastos, que por sua vez atuam na diferenciação dos pré-ameloblastos. O mesênquima emite sinais difusíveis que atravessam a membrana basal para promover a diferenciação dos ameloblastos (38). A diferenciação de ambas as células, está dependente de uma rede complexa de sinais, facilitada pela membrana basal e meio extracelular correspondente. Esta membrana atua como um reservatório de fatores de parácrinos e autócrinos, maioritariamente de origem epitelial, permitindo interações recíprocas. A sua rede fibrosa é resultado de interações entre várias moléculas. Vários estudos (53–55) indicam que a regulação da diferenciação ocorre por difusão a longo alcance de sinais, pela interação mediada pela matriz e pela interação mediada por células, refletindo assim a sua importância na diferenciação terminal de odontoblastos e ameloblastos (33,39).

Os pré-ameloblastos ao interagirem com a membrana basal, alongam-se gradualmente e aderem à matriz da membrana via integrina $\beta 1$ promovendo a disseminação celular, a polimerização e reorganização intracelular (acumulação de actina, c-actinina e vinculina nos pólos apical e basal), formando novas adesões integrina-substrato que vão contribuir para a diferenciação celular e início de síntese de proteínas da matriz. A laminina $\alpha 5$ ($\alpha 3\beta 3\gamma 2$) regula diferencialmente a ancoragem e a motilidade das células epiteliais por meio da integrina $\alpha 6\beta 4$ e $\alpha 3\beta 1$ (40). A sinalização via RhoA (Família Rho de pequenas GTPases) é crucial para a integridade estrutural dos ameloblastos, adesão celular e organização do citoesqueleto, permitindo a indução da expressão de amelogenina (56). Por sua vez, interação de fibronectina e integrina $\beta 1$ através do motivo RGD induz o fator neutrófico (NT-4) regulando a fosforilação de ERK1/2 e a expressão de ameloblastina. As integrinas $\beta 3$ e $\beta 6$ são expressas mais tarde, na fase de maturação (57). Entre os fatores derivados do epitélio dentário, a copine-7 (Cpne7 - família ubíqua de proteínas de ligação a fosfolipídios dependentes de cálcio) é expressa em pré-ameloblastos e secretada no meio extracelular, sendo internalizada nos pré-odontoblastos. Cpne7 liga-se à nucleolina da superfície celular pelos microdomínios

lipídicos (do inglês “rafts”) e entra no interior dos pré-odontoblastos por endocitose mediada por caveolae. De seguida o complexo Cpne7-nucleolina é translocado para o núcleo celular, induzindo a formação de cílios primários através da expressão de componentes ciliares Kif3a e Ift88. Ift88 atua como promotor na regulação positiva da expressão *DSPP* (58). Durante esta fase, as interações entre a membrana basal e os pré-ameloblastos induzem a sinalização de fatores de crescimento imobilizados na membrana basal interagindo com os pré-odontoblastos, induzindo a sua diferenciação (56).

Desta forma, os odontoblastos iniciam a secreção da primeira camada da matriz de dentina induzindo o alongamento nos pré-ameloblastos. Estes reorganizam os seus organelos intracelulares iniciando a fase de polarização. Estudos sugeriram que a laminina α 2 interage com as integrinas nas células epiteliais dentais e com proteoglicano de sulfato de heparina nas células mesenquimais dentais e regula a ligação celular envolvida com a expressão do epitélio dentário e da matriz dentinária numa fase inicial (38,40).

A membrana distal dos ameloblastos adquire projeções citoplasmáticas que se estendem em direção à dentina, segregando colagénio não mineralizado, seguido de perda gradual da membrana basal. Na matriz dentinária, a fibronectina permite a ligação dos ameloblastos ao colagénio do tipo I via integrina α 2 β , facilitando a sua adesão. Concomitantemente, inicia-se a mineralização vesicular da matriz de dentina (38). As membranas plasmáticas dos ameloblastos adquirem domínios apical, lateral e basal, o citoesqueleto sofre distribuição assimétrica e reposicionamento das organelas intracelular, permitindo a secreção de complexos de proteínas nomeadamente Amelogenina (Amel) (38).

Na regulação da adesão célula-célula mediada por caderina, a sinalização β -catenina/TCF (fator de células T) induz a expressão do gene família *snail*, *finger 2* de zinco (*Snai2*) e este reprime a expressão de E-caderina, atuando na diminuição da adesão celular, facilitando a migração celular do ameloblasto (59).

Várias possibilidades funcionais foram investigadas entre a relação dentina e o esmalte: onde a dentina pode servir como uma base estrutural sobre a qual a matriz e os cristais do esmalte são depositados, envolvendo uma ligação química entre as duas matrizes. Estas interações químicas podem servir para promover a nucleação dos cristais do esmalte, onde os componentes orgânicos e inorgânicos da dentina podem alterar a matriz do esmalte para promover a formação de cristais do esmalte. Estudos (61) relatam que durante esta fase, *DSPP* é transitoriamente expresso nos ameloblastos no momento

do estabelecimento da junção esmalte dentina (JAD), onde DSP atua como um nucleador dos cristalitos de esmalte, e está presente na estrutura interprismática (61). A exposição dos cristais de dentina diretamente na matriz do esmalte pode promover o crescimento epitaxial dos cristais do esmalte (62,63). Considerando que essas interações podem atuar em conjunto, uma com a outra, todos esses componentes formam uma delicada rede interativa molecular e contribuem para o estabelecimento da polaridade celular. A formação de junções celulares entre ameloblastos e células intermediárias do estrato é mediada por nectina, necessária para as funções de secreção e maturação (64).

4.2. Fases da amelogénese

Estabelecida a polarização do ameloblasto, este apresenta-se funcional para iniciar o processo de mineralização do esmalte. A sua formação ocorre através de uma série de eventos coordenados que englobam proteólise e interações mineral-proteínas (36). A matriz orgânica do esmalte resulta da conformação estrutural das proteínas intrinsecamente desordenadas, que regulam a matriz extracelular por meio de auto-montagem através de mecanismos hidrofóbicos de baixa energia, servindo de um esqueleto para deposição mineral que posteriormente sofre substituição pela fase mineral apatite do esmalte convertendo-se em HAp (36). A sua síntese envolve interações genéticas, moleculares e celulares que ocorrem ordenadamente através do estágio de secreção e maturação (65).

Inicialmente no estágio secretório, o ameloblasto, secreta proteínas da matriz, e regula o transporte de iões, através do seu polo apical. O ameloblasto começa a estender-se em direção ao polo basal e os fragmentos restantes da membrana basal são endocitados e posteriormente degradados por lisossomas (52,66). As saliências dos ameloblastos em forma de “dedo” iniciam a formação da estrutura mineral principalmente nas laterais e nas pontas das fibrilas de colagénio mineralizadas para formar a JAD. Os cristais alongam-se juntamente com o movimento dos ameloblastos incorporados como componente interno do esmalte (47,66). Esta primeira camada é aprismática de conteúdo mineral, onde os cristais se encontram alinhados perpendicularmente à superfície e paralelos uns aos outros. Esta camada ocorre como resultado da ausência dos processos de Tomes e possivelmente por apresentar-se livre de proteínas na zona basal (aprisimática), onde o conteúdo de resíduos inorgânicos aumenta em direção à JAD. Por sua vez, na camada de dentina, surgem pequenos focos de mineralização como ilhas de

mineral, onde estes se expandem e se fundem numa camada contínua de dentina. Desta forma, os ameloblastos migram num ângulo de 90° paralelo ao alinhamento das fibras de apatite aprismáticas. Isto resulta numa extremidade apical curva que leva a uma extensão o "processo de Tomes" (47,66).

A matriz orgânica contém os iões de cálcio e fosfato hidratados ligados por meio de água de forma a possibilitar a nucleação cristalina (36). As proteínas interagem com os aglomerados de nucleação de fosfato de cálcio líquido modulando a taxa de cristalização (36). Os canais de troca de Ca^{2+} tornam-se funcionais, permitindo a sua incorporação na matriz pela troca de Na^+ através das membranas distais/apicais. O Pi , que também é incorporado com Na^+ , juntamente com os iões de Ca^{2+} estabelecem os cristais de apatite – como representado na figura 10. Os iões de Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , e Ca^{2+} ligam-se às superfícies do cristal em equilíbrio como um reservatório solúvel no fluido do esmalte controlando e inibindo a sua expansão (51,73).

Os processos de Tomes permitem a organização espacial dos cristais, em estruturas prismáticas e inter-prismáticas, atuando na secreção de componentes da matriz – como detalhado na Figura 8. A angulação inicial é perpendicular e consoante a formação dos processos de Tomes. A estrutura prismática e interprismática deriva da deposição assimétrica das proteínas da matriz que ocorre em locais distintos, nas extremidades distais e proximais do processo. A matriz situada entre os processos de Tomes resulta na formação de zonas de lacuna, seguindo um padrão morfológico semelhante a uma fechadura – como detalhado na Figura 9. Este arranjo pode sofrer alterações, resultando em diferentes tipos de padrões. Nos limites dos prismas, os cristalitos desviam-se 40-60° daqueles dentro do prisma, resultando numa microporosidade na fronteira do prisma, propicia a receber mais matéria orgânica (47,66).

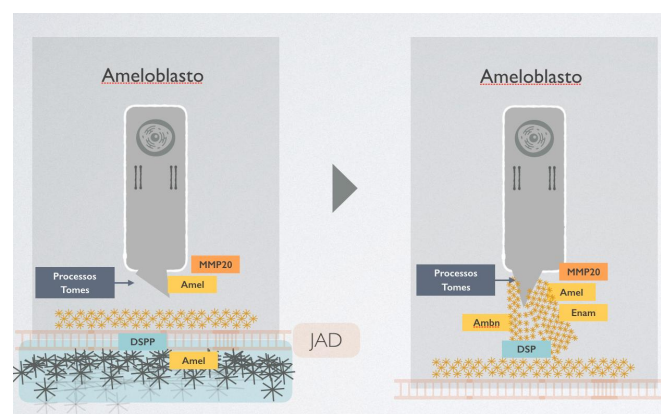


Figura 8 - Desenvolvimento Processos Tomes.

Secreção componentes da matriz e organização prismática e interprismática, (Autoria própria).

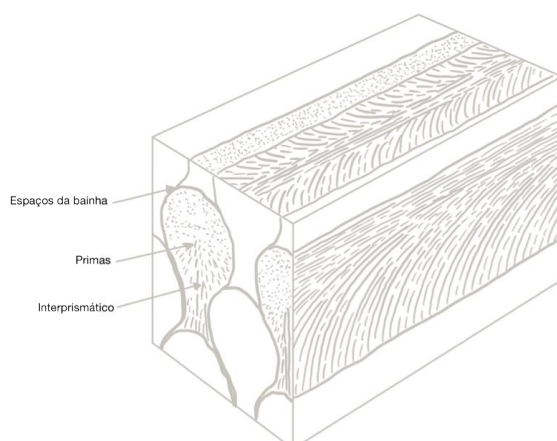


Figura 9 - Estrutura prismática e interprismática. Representação esquemática: prismas e interprismas, entre ambos encontra-se a bainha do esmalte, (Adaptado de (47)).

As principais PME, a Amel, a ameloblastina (Ambn), a enamelinina (Enam) e a tuftelina (Tuft1), ao serem secretadas agregam-se e sofrem imediata clivagem pela MMP20, resultando em produtos intermediários estáveis, que proporcionam espaço dentro da matriz mais profunda para o posterior crescimento dos cristais em largura e espessura (60,67). As amelogeninas fornecem os locais para a precipitação de fosfatos de cálcio, atuando também como inibidores da nucleação, dependendo da sua conformação estrutural, morfologia, concentração e ligações cooperativas com outras proteínas da matriz do esmalte em desenvolvimento (36). Estudos indicam um efeito sinérgico entre a amelogenina e enamelinina, mantendo a fase mineral amorfa estável. A porção 32KDa enamelinina, atua juntamente com a Amel para estabilizar a fase transitória amorfa (47).

As proteínas da matriz do esmalte apresentam-se como proteínas intrinsecamente desordenadas (IDP – do inglês *intrinsically disordered proteins*), com propriedades estruturais altamente variáveis, onde não assumem estruturas secundárias típicas (α -hélice, folha- β). A Amel ao ser fosforilada, o seu terminal-N (aminoácido rico-tirosina 45 com domínio N-terminal (TRAP), altera de conformação e aumenta a capacidade de estabilizar o fosfato de cálcio. Esta proteína circunda os prismas pelas laterais facilitando a formação dos cristais. O seu terminal-C hidrofílico contém resíduos ácidos carregados negativamente fornecendo locais de nucleação e guia de orientação para o crescimento de cristal. Este mecanismo mineral-proteína, atua como controlo de trocas iónicas da fase de solução. A Amel e a Ambn ligam-se às faces crescentes do cristal permitindo o seu crescimento ao longo do seu eixo c, perpendicularmente à junção amelo-dentinária (JAD)

(10,36). A Amel pode formar nanoesferas, oligómeros, nanocadeias e outras montagens alongadas. As nanoesferas formam-se via interações hidrofóbicas intermoleculares. As interações que participam na autojunção dos monómeros em oligómeros são principalmente mediadas pelo terminal N (potencialmente N-terminal para N-terminal) – como detalhado na Figura 5. No entanto, possibilitam a formação de nanosferas, pela ligação dos oligómeros regulados principalmente por interações hidrofóbicas da porção central (domínio central hidrofóbico, rico em histidina, glutamina e prolina) (68,69). As cadeias de nanosferas, impedem sequencialmente o crescimento do cristal nos eixos a e b, promovendo a formação no eixo c. Esta ligação pode ser necessária para prevenir o alargamento prematuro das fitas e a transformação prematura de cristal amorfo em HAp – como representado na figura 10 (70).

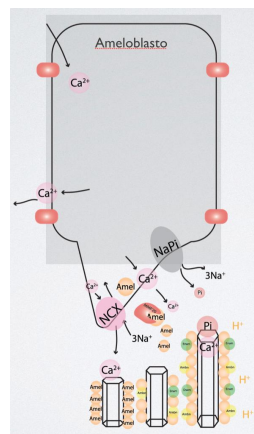
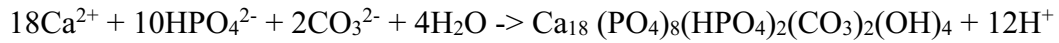


Figura 10 - Crescimento dos cristais durante fase de secreção
Entrada do Ca-P e incorporação na estrutura amorfa. Regulação do crescimento dos cristais pelas proteínas da matriz, (Adaptado de (73)).

Durante a formação do cristal, uma porção de prótons é secretada quando as amelogeninas se encontram ligadas à superfície do cristal. Os prótons são tamponados por bicarbonatos produzindo água e CO_2 . Adicionalmente, a ligação do Ca^{2+} à matriz origina um pH local, que permite a acumulação de PO_4^{3-} e OH^- facilitando a iniciação da nucleação do cristal. Durante esta fase o pH mantém-se em equilíbrio, maioritariamente devido à ação das amelogeninas. A alcalinidade do meio estimula a rápida transição de fase entre os estágios. Além do mais, o principal produto final do metabolismo celular é CO_2 , um ião solúvel em água, com capacidade de passar livremente pelas membranas fosfolipídicas. O CO_2 dissolvido reage com a água para formar ácido carbônico (H_2CO_3) que por sua vez dissocia-se em H^+ e bicarbonato (HCO_3^-) (51,73).

A ameloblastina, a enamelinina e as proteases junto com a sialofosfoproteína da dentina, articulam a ligação de fitas do esmalte incipientes ao colagénio da dentina. A MMP20 serve como um mediador crítico para produzir essa linha fina do esmalte hipermineralizado na JAD (36). Entre os ameloblastos, na membrana baso-lateral, encontram-se complexos juncionais intercelulares que formam uma barreira semipermeável permitindo a difusão intercelular dos iões minerais, da circulação para a matriz (10). Os ameloblastos secretores participam no transporte de cálcio passivamente ou por canais SOCE (*Store-operated calcium channels*) através das diferenças de concentrações. O cálcio no interior da célula é regulado pela bomba Ca^{2+} -ATPases da membrana plasmática (PMCA) onde os canais de troca de $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (NCX1 / NCX3) regulam a excreção para a matriz extracelular – conforme representado na Figura 10 (73). Desregulações ou defeitos moléculares durante este estágio resultam num alongamento insuficiente do cristal, onde a camada de esmalte se apresenta patologicamente fina ou hipoplástica (52).

Como o cristal se encontra propenso à incorporação de iões não desejáveis, estes devem ser posteriormente removidos, de forma a não afetar o comportamento físico-químico. A hidroxiapatite não estequiométrica ao perder o ião de Ca^{2+} é corrigida pela introdução de H^+ e depleção de OH^- . Assim, em soluções aquosas apresentam a capacidade de se difundir e serem substituídos por outros os iões como F^- , CO_3^{2-} ou Cl^- (18,73). O ião de CO_3^{2-} permite a formação HAp carbonatada, ocupando duas posições distintas: ou substitui PO_4^{3-} ou devido a altas pressões de CO_2 , ocupa locais hidroxilo. Devido à exigência do equilíbrio de carga é necessário intervir uma troca de iões. Se o CO_3^{2-} for substituído pelo PO_4^{3-} intervém outra substituição, do Na^+ pelo Ca^{2+} . Se o CO_3^{2-} ocupar um grupo OH^- ou se o ião Ca^{2+} for substituído por um catião de menor carga (como Na^+), um segundo local OH^- tem de ser deixado livre. Estas trocas resultam numa apatite mais porosa do que a hidroxiapatite, sendo mais suscetível à carie por apresentar uma maior solubilidade e alterações nas propriedades físicas dos cristais (75,76). Quanto ao Mg^{2+} , este apresenta a capacidade de inibir o crescimento dos cristais e diminuir a sua cristalinidade, podendo competir com o Ca^{2+} por locais de ligação na superfície dos cristais. O ião de Mg^{2+} altera o crescimento do cristal por meio de ligação às suas superfícies, particularmente após a perda de porções inibidoras orgânicas no estágio de transição (51,73). A formação da hidroxiapatite carbonatada, deficiente em cálcio traduz-se pela seguinte equação química:



4.3. Fase Maturação

Após a deposição de toda a espessura da matriz do esmalte segue-se o estágio de maturação, o material orgânico é removido, existe a perda de maior parte das proteínas e água da matriz, e adição de quantidades crescentes de minerais, deposição de fosfato de cálcio (54,71). Cerca de 25% dos ameloblastos sofrem apoptose, possivelmente devido às células apresentarem-se num estado metastável de sobrecarga de cálcio. Os restantes reduzem de tamanho e perdem os processos de Tomes adquirindo uma forma rasa (10,66,71). A expressão genética *Amel*, *Ambn* e *Enam* é regulada negativamente e aqueles que regulam a homeostase do pH e envolvidos no transporte de iões e proteólise são regulados positivamente (26,72,73).

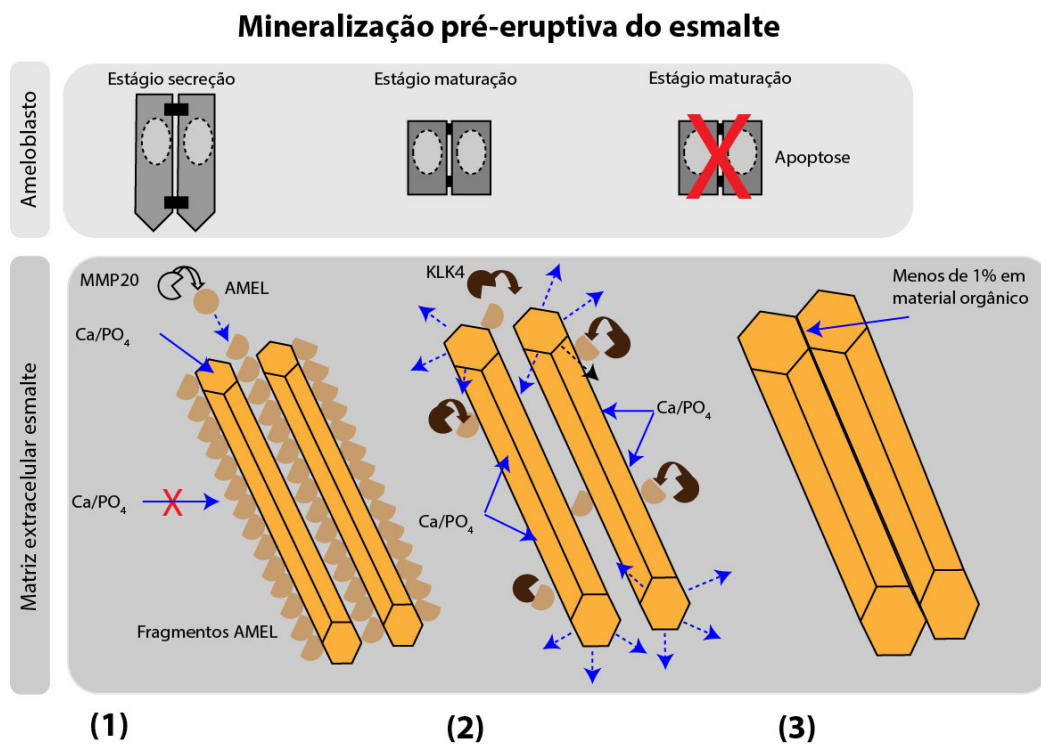


Figura 11 - Mineralização do esmalte.

(1) Fase de secreção; (2) Fase de maturação (3) Fase final de maturação crescimento dos cristais, (Adaptado de (66)).

A atividade da via de sinalização canónica Wnt/ β -catenina atua na função de maturação e mineralização dos ameloblastos. Permite a secreção de KLK4, degradação

das proteínas da ECM previamente secretadas e parcialmente hidrolisadas (por Mmp20) de modo a facilitar o crescimento dos cristalitos de hidroxiapatite promovendo a sua fusão (59,60). A KLK4 e MMP-20 atuam na clivagem e remoção do material orgânico, degradando gradualmente as PME da matriz do esmalte proporcionando o crescimento dos cristalitos em largura e espessura – conforme indicado na Figura 11 (67). Quando amelogenina é removida as fitas crescem em espessura e largura, e os seus produtos proteolíticos apresentam capacidade de formar nanobastões (68,69). As concentrações de CO_3^{2-} , Mg^{2+} e F^- diminuem significativamente e a taxa de mineralização aumenta. O transporte de Ca^{2+} aumenta resultando num efeito duplo, promove a precipitação do cristal através da força motriz gerada e promove o deslocamento dos iões de Mg^{2+} das superfícies do cristal, reduzindo o seu efeito inibitório facilitando o crescimento do cristal. Com o aumento dos iões na solução ocorre a precipitação do cristal. Os iões de Ca^{2+} , H^+ e HPO_4^{2-} estendem os cristais em largura e espessura, aumentando ainda mais o reservatório de Ca^{2+} , formando-se assim a HAp – conforme indicado na Figura 12. Durante este processo o cristal liberta protões, aumentando a acidez do meio para valores de 6,2 o que vai contribuir para a quebra de ligação dos iões inibidores (Mg^{2+}) da superfície do cristal. Nesta fase as nanosferas de AMEL dividem-se em oligómeros devido ao ambiente, sofrendo degradação pela KLK4. No entanto, se os valores se mantiverem baixos este processo não ocorre. De forma a neutralizar o meio, os ameloblastos sofrem mudanças cíclicas na sua morfologia entre extremidade distal rugosa (ER) e extremidade distal lisa (EL), participando no equilíbrio ácido-base e na remoção (10,54).

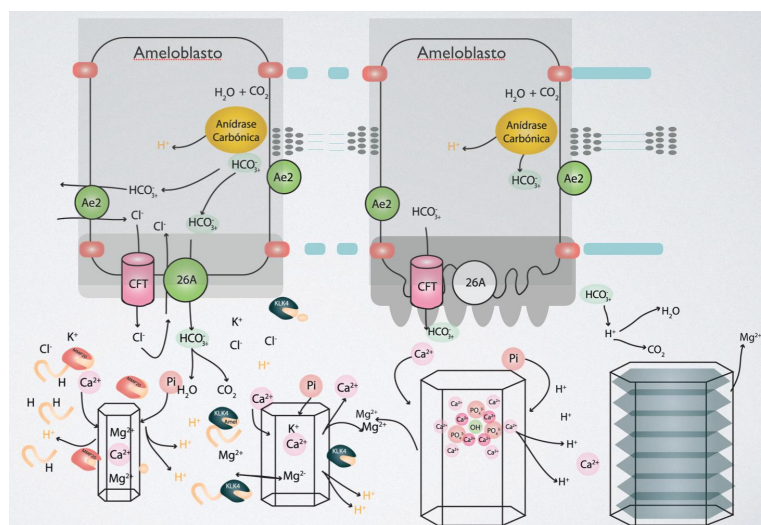


Figura 12 - Trocas Iônicas durante crescimento do cristal na Fase de Maturação.

Aumento de iões na solução, formação cristais com libertação de protões. Controle do pH através canais CFTR (regulador de condução transmembranar de fibrose cística), anidrase carbônica e mudanças cíclicas entre extremidade lisa e rugosa, (Adaptado de (73)).

As células ER atuam na troca aniônica, controle de pH e produção local de bicarbonato (via anidrase carbônica) (66,74). As células EL permitem a difusão de fluidos intercelulares e pequenas moléculas para dentro e para fora do esmalte em maturação permitindo a neutralização do pH local – conforme representado na Figura 12 (21).

Os ameloblastos de extremidade lisa libertam altas cargas de HCO_3^- via anidrase carbônica (AC), estabilizando os valores de pH. Durante esta fase a anidrase carbônica ganha expressão, catalizando a reação entre água e o dióxido de carbono, formando ácido carbônico. Este dissocia-se formando H^+ e HCO_3^- , o bicarbonato é excretado para o meio tamponando 1 próton – conforme representado na Figura 12 (10,73,78). Os cristais imaturos expandem em largura e espessura até entrarem em contato com os cristais adjacentes, levando a uma substância extremamente dura, rica em mineral (66,74). Defeitos no estágio de maturação, como uma inadequada degradação e reabsorção da matriz do esmalte, produzem uma camada de esmalte de espessura normal, mas patologicamente mole. Os defeitos do esmalte que não são herdados geralmente refletem um distúrbio sistêmico (52).

Numa fase final da amelogênese é formado um forro de ameloblastos na superfície do esmalte com função protetora do dente até à sua erupção. Quando este surge na cavidade oral, as células epiteliais morrem, exceto algumas que se tornam parcialmente incorporadas no epitélio juncional (26,74).

4.4. Fase Pós-eruptiva

O tecido de esmalte, é uma estrutura cristalina altamente mineralizada e acelular, apresentado uma organização única dos seus componentes. É caracterizado por propriedades estruturais, mecânicas e propriedades físico-químicas únicas e excepcionais (14,49). É composto principalmente de 96-97% de matéria inorgânica (hidroxiapatite, HAp), 3% de matriz orgânica (proteínas da matriz) e 1% de água (49). As suas principais estruturas são os prismas de esmalte – cristais de hidroxiapatite organizados numa forma prismática – as estruturas interprismáticas, e uma substância intermediária designada por a bainha do esmalte (49,50). Os prismas são formados linearmente por aposição sucessiva de incrementos de cristais de HAp. Os cristais de HAp apresentam uma grande relação comprimento-largura, estando dispostos paralelamente um ao outro (51). Esta porção mineral é composta por fosfato de cálcio cristalino na fase quimicamente mais estável apatite, formando uma rede cristalina de hidroxiapatite com simetria hexagonal em que

apresenta posições disponíveis para a ligação de outros aniões (OH^- , Cl^- , F^- e CO_3^{2-}). Estes aniões nas formas hidroxí, carbonatada ou fluoretada conformam-se ao espaço ou deformam a rede, potencialmente aumentando ou diminuindo sua solubilidade e força (36,49). O modelo estrutural no esmalte é considerado uma hidroxiapatite de cálcio carbonatada não estequiométrica, a sua estrutura molecular contém cerca de 2 a 3% de carbonato, responsável pela estabilidade química e estrutura física do cristal durante o seu desenvolvimento, tornando-o assim um pouco suscetível às perdas de minerais (49–51). Como base química os seus componentes principais englobam iões de cálcio e fosfato, apresentando variações secundárias como alumínio, bário, estrôncio, magnésio, chumbo e vanádio, podendo também ser incorporados aos cristais, quando presentes durante a sua formação (49,51).

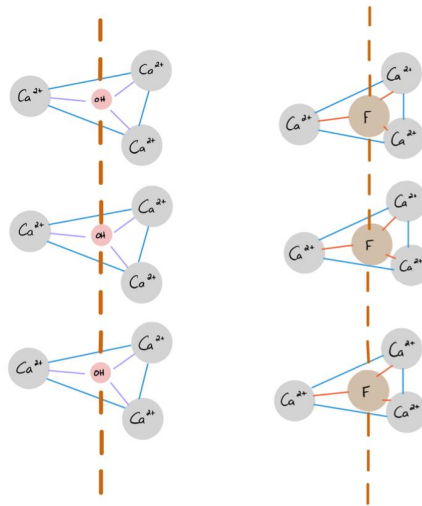


Figura 13 - Estrutura HAp e FAp.
Esquerda: estrutura hidroxiapatite; Direita: estrutura fluorapatite, (Adaptado de (36)).

Os iões de F^- podem substituir os iões H^- e HO^- , favorecendo a formação de fluorohidroxiapatite, uma estrutura cristalina altamente ordenada, e um potente mecanismo de proteção – como detalhado na Figura 13 (51,73). A fluoroapatite (FAp) consegue suportar um pH 4 sem dissolução, enquanto que a apatite carbonatada dissolve-se num pH próximo a 5. Estas substituições químicas afetam a estrutura cristalina na medida em que vão diminuir a sua simetria, originando energias de ligação baixa, e um aumento na solubilidade química da fase mineral. A perda de uma carga negativa pode ser compensada através de um local livre catiónico e um local livre aniónico sem sítios monovalentes. Conferindo assim uma carga elétrica neutra estrutural, pela substituição de iões bivalentes de fosfatos trivalentes (18,77).

Tanto HAp e FAp apresentam uma estrutura em hexágono de P63/ m. Os parâmetros cristalográficos das células unitárias a e c são semelhantes em ambos os minerais e totalizam a = 9,43, c = 6,88 para HAp e, respetivamente, a = 9,37, c = 6,87 para FA. Os parâmetros a e c são ligeiramente menores para FAp do que HAp, devido à maior razão do iões hidroxilo/ião fluoreto. Considerando que o HAp apresenta menor cristalinidade em relação ao FAp (77).

Os cristais formam-se pela adição e fixação de partículas que variam de complexos multiões a nanopartículas totalmente formadas. A cristalização por fixação de partículas envolve modelos clássicos e não clássicos de cristalização, sendo que ambos podem ser influenciados pela presença de proteínas. A via não clássica processa-se por meio de montagem de várias partículas sólidas primárias e a via clássica envolve a adição gradual de iões ou moléculas às superfícies do cristal em crescimento. O modelo não clássico governado pela presença de fosfato de cálcio amorfo em forma de fita (ACP) na frente de mineralização, realça a capacidade das proteínas do esmalte, através dos seus domínios, de estabilizarem a fase mineral ACP e inibir a transição para apatite cristalina. Assim evidências sugerem que o rápido crescimento do mineral em espessura e largura e aumento do conteúdo mineral de 30% para > 95%, facilitado pela remoção das proteínas da matriz durante o estágio de maturação, podem ser devidos a uma combinação de cristalização clássica e não clássica. Portanto, é plausível de se assumir que as vias clássicas e não clássicas de cristalização dominem durante os diferentes estágios da formação do esmalte (36).

5. Vias de sinalização

A especificidade do padrão espaçotemporal das principais vias de sinalização, permitem a expressão de sinais moleculares que regulam a comunicação celular através de fatores de crescimento - moléculas que se ligam a recetores específicos na superfície das células - e fatores de transcrição - moléculas responsáveis pela modulação da expressão genética através de interações em locais específicos do ADN: BMPs, FGFs, SHHs (*Sonic Hedgehog*), WNTs e TNFs (25,27,28). Na odontogénese, as células mesênquimais e epiteliais são estritamente reguladas por vários fatores. O sinal indutivo para a diferenciação do odontoblasto é conhecido por originar-se no epitélio interno do esmalte possibilitando a transmissão de sinais necessários entre esses dois componentes

do tecido, além de ser um marcador de diferenciação para pré-ameloblastos (82). Uma abordagem que permita conhecer quais os sinais ou as vias de sinalização que induzem a diferenciação celular, permite estabelecer um suporte nas terapêuticas na regeneração dos tecidos celulares. Seguidamente apresentam-se algumas vias envolvidas neste processo – como detalhado na Figura 14 (27,28).

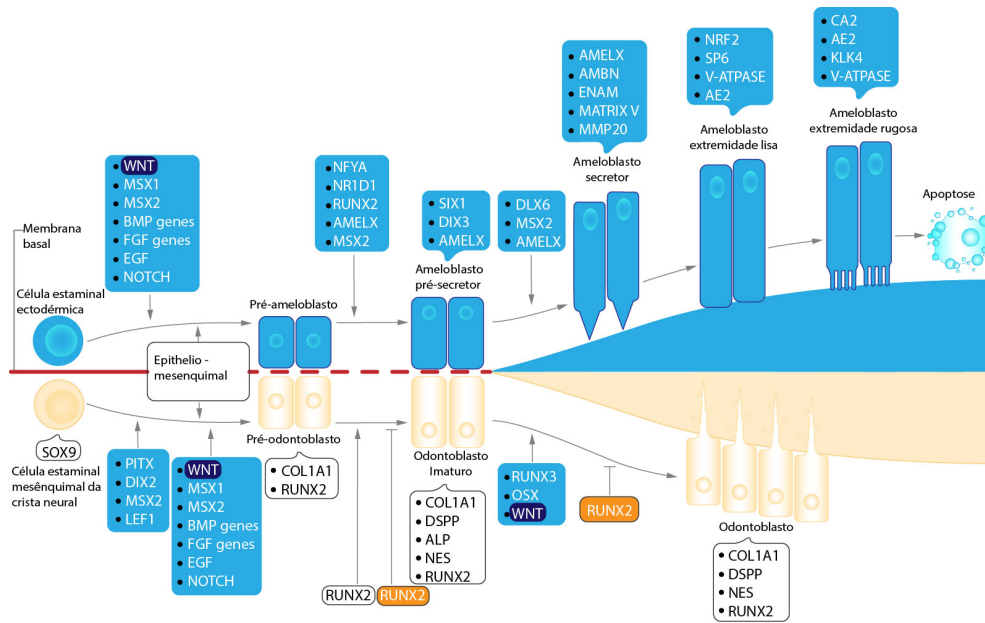


Figura 14 - Desenvolvimento células ameloblasto e odontoblasto.

Vias de desenvolvimento das células dentais. Ameloblastos e odontoblastos diferenciam-se separadamente das células-tronco ectodérmicas e da crista neural, respectivamente. Uma membrana basal separa as células iniciais do ameloblasto e do odontoblasto e permite a interferência entre as duas linhagens durante o desenvolvimento ocorre o contato entre os dois compartimentos celulares e as respectivas matrizes extracelulares. Os genes que governam a diferenciação das células são colocados em caixas azuis indicando funções estimulatórias e em caixas laranjas indicando as funções inibidoras. Os genes que são caracteristicamente expressos por diferentes estágios de desenvolvimento são indicados acima ou abaixo dos respectivos tipos de células e não são incluídos em caixas. AE2, proteína de troca aniônica 2; ALP, fosfatase alcalina; AMBN, ameloblastina; AMELX, amelogenina; ATF4, ativando o fator de transcrição 4; BGLAP, proteína γ -carboxiglutamato óssea ou osteocalcina; BMP, proteína morfogenética óssea; BSP / SPP1, sialoproteína óssea ou fosfoproteína 1 segregada; CA2, anidrase carbônica 2; COL1A1, colagénio tipo I α 1; COL2A1, colagénio tipo II α 1; COL10A1, colagénio tipo X α 1; DIX2 / DIX3, homólogo desgrenhado 2 ou 3; Homeobox 6 sem distal DLX6; DSPP, sialofosfoproteína dentinária; EGF, fator de crescimento epidérmico; ENAM, enamelina; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; HDAC4, histona desacetilase 4; IHH, *hedgehog* indiano; KLK4, peptidase 4 relacionada com calicreína; LEF1, fator de ligação do intensificador linfóide 1; MATRIX V, matriz de vesículas V; MEF2C / D, fator intensificador de miócitos 2C e D; MMP20, metaloproteínase 20 da matriz; MSX1 / 2, homeobox 1 e 2 de reparo de incompatibilidade de DNA; NES, nestina; NFYA, fator de transcrição nuclear subunidade- α ; NR1D1, subfamília 1 do recetor nuclear, membro do grupo D 1; NRF2, fator nuclear 2 relacionado ao eritroide; OSX, osterix; PHEX, endopeptidase neutra reguladora de fosfato, ligada ao X; PITX, homeobox hipofisário; PTH1R, recetor 1 da hormona paratireóide; PTHrP, proteína relacionada à hormona da paratireóide; RUNX2 / 3, fatores de transcrição relacionados a runt 2 e 3; SOST, esclerostina; SOX5 / 6/9, genes HMG-box relacionados com SRY tipos 5, 6 e 9; SP6, proteína de especificidade 6; TGF- β , fator de crescimento formador trans- β ; V- ATPASE, ATPase vacuolar; WNT, (fator *Wingless* integrado) (adaptado de 21).

5.1. Via de sinalização Wnt

A via de sinalização Wnt é classificada em três tipos: sinalização Wnt canônica, onde a β -catenina transforma o sinal num sistema de expressão de genes; o Wnt/PCP (polaridade plana celular), organiza as células no plano do tecido; e a via Wnt dependente da proteína cinase C (PKC), com função de aumentar os níveis de Ca^{2+} intracelular e ativação de efetores a jusante. Esta classe de glicoproteínas secretoras, apresenta 19 proteínas Wnt para ativar a via de sinalização em mamíferos: Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt7b e Wnt8a ativam a via canônica, enquanto Wnt4, Wnt5a e Wnt11 ativam a via não canônica. Apresenta como recetores *Frizzled* (Fzr) e co-recetores (Lrp5/6) (83,84). Na via canônica Wnt/ β -catenina, a ligação de ligantes Wnt aos seus recetores permite a acumulação citoplasmática de β -catenina, translocação nuclear e ativação transcricional por complexos de β -catenina e membro da família de fator de transcrição Lef/TCF (fator de aumento linfóide/fator de células T), ativando um programa de expressão genética altamente específico. A sinalização Wnt/ β -catenina é fundamental para os processos de desenvolvimento, incluindo organogênese, regeneração de tecidos e manutenção de células-tronco adultas (83). A via de sinalização Wnt/ β -catenina apresenta-se ativa durante os vários estágios de desenvolvimento do dente e desempenha um papel crucial na regulação da proliferação celular e diferenciação, durante o desenvolvimento do esmalte (28,60). Estudos realizados através da indução persistente da sinalização Wnt/ β -catenina relataram que pode induzir o potencial odontogênico no epitélio, ativando outros genes odontogênicos (85).

Na odontogênese a via de sinalização Wnt participa no padrão cuspide e na calcificação da coroa dependendo da sua regulação espaço-temporal (28). O ligante Wnt10a sinaliza do epitélio para o mesênquima, permitindo a diferenciação dos pré-odontoblastos em odontoblastos, o efetor PKP1 controla o processo de diferenciação de ameloblastos regulando o complexo de adesão celular (84,85). Estudos *Knock-out* em micromamíferos observaram que a sinalização epitelial Wnt/ β -catenina desencadeia a expressão de Wnt10a e Wnt10b, e que esses ligantes potencialmente poderiam ativar a sinalização Wnt/ β -catenina no mesênquima subjacente, mas uma investigação mais profunda é necessária (85). Além do mais, estudos *in vitro* relataram que Wnt10a inibe a proliferação de células da papila dentária e promove a diferenciação. A sua diminuição resulta numa redução da deposição de dentina, com uma camada fina e câmara pulpar ampla (84). Curiosamente, a sinalização Wnt/ β -catenina pode ativar diretamente BMP4

e a via dependente de Smad4 envolvida na diferenciação de odontoblastos e ameloblastos, apesar de estudos adicionais sejam necessários para perceber o seu mecanismo. (85). Estudos através da indução persistente da expressão de Wnt/ β -catenina no epitélio, demonstraram uma diferenciação prematura dos odontoblastos e um atraso na diferenciação dos ameloblastos **via BMP/p-p38**. (85). Além disso, a via canónica dependente de Wnt/ β -catenina e MAPKs (proteína cinase ativada por mitogénio) estão envolvidas na diferenciação e proliferação de células da polpa dentária. β -catenina ativa Runx2 (fator transcrição relacionado runt-2) e induz a diferenciação. Foi relatado que o ligante canónico Wnt3a estimula a proliferação em células fibroblastos por meio da ativação das vias ERK e Wnt/ β -catenina parcialmente. A sinalização ERK1/2 foi relatada que induz a diferenciação e mineralização das células da polpa dentária (86).

Na via de sinalização não canónica, Wnt7b induz as células da papila dentária promovendo a secreção da matriz extracelular, através da fosforilação via ERK1/2 em vez da fosforilação de p38 e c-Jun N-terminal cinase (JNK), regulando positivamente a expressão de genes associados à diferenciação odontoblástica (*Dspp*, *Coll*) e aumentando os nódulos de mineralização. A sinalização Wnt/ β -catenina e a não canónica Wnt5a-Ror2 (receptor tirosina cinase) ambas atuam na modulação celular durante a dentinogénese (86).

Várias anomalias podem ser observadas pela desregulação ou deleção de ligantes nas vias Wnt. O *Kock-out* condicional de β -catenina no epitélio dos incisivos em micromamíferos resulta num tamanho diminuído, com o esmalte macio e irregular. A inibição da expressão de WIF1 (Fator 1 de inibição Wnt), um inibidor secretor de Wnt expresso restritamente no nó do esmalte, causa aumento da apoptose e interrupção do desenvolvimento do dente. Os fatores de co-transcrição da via de sinalização Wnt, Bcl9 e Bcl9l (linfoma de células B proteína do tipo 9) são altamente expressos no citoplasma de ameloblastos, a sua deleção leva à malformação do esmalte (84). A deleção específica no odontoblasto do gene *Wls*, proteína chaperona que regula a secreção do Wnt, leva à inibição da maturação do odontoblasto e alongamento da raiz, devido à redução da atividade do sinalizador canónico do Wnt. Por sua vez, a superativação da via canónica resulta na regulação positiva dos marcadores epiteliais *Shh*, *Efn* e *Fgf8* que sequentemente são expressos ectopicamente. Mutações em *Wnt10b*, *Wnt10a*, *Lrp6* e outros genes envolvidos nesta via, resultam em agenesia dentária com ou sem outras anomalias ectodérmicas (72).

5.2. Via sinalização FGF

A sinalização dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) atua maioritariamente pela ligação a quatro recetores tirosina cinases diferentes, iniciam a sinalização por meio de várias vias intracelulares a jusante, ligando-se a várias matrizes de proteínas adaptadoras, como proteína tirosina fosfatase-2 (SHP2) e proteína ligada ao recetor do fator de crescimento 2 (GRB2) ativando o domínio citosólico do recetor, por sua vez, regulam sinais Ras (vírus do Sarcoma de rato) para ativar as cascatas de sinalização a jusante, como fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e Akt/Proteína cinase B (AKT) e vias MAPK. Os genes *Sprouty*, codificam antagonistas da sinalização de FGF ligando-se a GRB2 (Proteína 2 ligada ao recetor fator de crescimento), evitando a ativação de Ras (32). Esta sinalização regula uma série de processos celulares como a proliferação, diferenciação, adesão celular e mobilidade celular. A sua expressão ganha importância no epitélio dentário no estágio botão e sequente controlo da invaginação do epitélio dentário no mesênquima subjacente. Posteriormente tornam-se críticos na formação da fisionomia do dente, no desenvolvimento e homeostase do nicho de células-estaminais e diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos. Mutações em genes que codificam ligantes ou recetores de Fgfs resultam em várias síndromes congénitos caracterizadas por alterações no número dentário, morfologia ou estrutura do esmalte (31).

Durante a odontogénese vários fatores são expressos. No estágio de sino a expressão de *Fgf4* e *Fgf9* apresentam-se no epitélio interno do esmalte e a expressão *Fgf2*, detetada em micromamíferos, no retículo estrelado. A expressão de *Fgf4* e *Fgf20* é restrita às cúspides em formação dos nós secundários do esmalte, enquanto que a expressão de *Fgf9* e *Fgf16* são detetadas no epitélio. A expressão do *Fgf3* e *Fgf10* é encontrada no mesênquima da papila dentária. Durante a diferenciação dos ameloblastos *Sp7* liga-se diretamente e regula positivamente a transcrição do promotor *Fgf3*, possibilitando a sua ação como mitogénio potente (32,87). Em culturas de molares embrionários demonstraram que o aumento de *Fgf2* diminui a expressão de amelogenina, enquanto que a sua inibição produziu um efeito oposto. Também demonstraram que *Fgf2* e *Fgf4* exógenos promovem o nível de expressão de *Tbx1* (Fator de transcrição da caixa T), que pode ser expresso no epitélio e codificar um fator de transcrição. Em micromamíferos cultivados *in vitro* com deficiência em *Tbx1* observou-se a falta de ameloblastos, onde o esmalte não se formava nos incisivos. Considerando que *Tbx1* é necessário para a diferenciação dos ameloblastos (32).

Os recetores de fator de crescimento *Fgfr1* e *Fgfr2IIIb* estão presentes nos ameloblastos. A inativação de *Fgfr1* resulta em ameloblastos disfuncionais, com um esmalte desorganizado (32). Curiosamente, estudos em micromamíferos com deleção de *Fgfr1* durante a osteogénese, demonstraram um aumento na proliferação de osteoblastos e atraso na diferenciação e mineralização da matriz. A expressão de *Fgfr1* durante o comprometimento com a linhagem dos osteoblastos indica ainda a importância do recetor na diferenciação e mineralização da matriz para formar o osso. Por sua vez, *Fgf8*, expresso nos osteoblastos pode regular a capacidade das células em diferenciarem em osteoblastos e a sua subsequente atividade osteoblástica (88).

No osso alvéolar em desenvolvimento, a expressão de *Fgf2* possibilita a diferenciação de osteoblastos, estimula a proliferação de condrócitos, osteoblastos e células periosteais e estimular a produção de colagénio tipo I (32). O *Fgf2* é conhecido por estimular a migração e proliferação de diferentes células, incluindo células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos, durante a consolidação óssea. Desempenha um papel crítico na angiogénese e mitogénese das células mesênquimais. Tanto *Fgf2* e BMP2 estão envolvidos no recrutamento e formação de osteoclastos, direta ou indiretamente por meio do aumento da angiogénese e osteogénese (89).

Evidências genéticas e funcionais demonstraram que as interações entre o FGF e a sinalização de Wnt/ β -catenina podem controlar o destino e a diferenciação de células estaminais mesênquimais (MSC) (32).

5.3. Via sinalização super-família TGF- β

A sinalização do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) apresenta um papel muito importante no controle de vários processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação, migração, desenvolvimento de tecidos e homeostase. Perturbações durante a sua sinalização foram associadas a doenças como cancro, fibrose e inflamação (90). As proteínas dímero homólogas multifuncionais BMP e activina são membros da superfamília TGF- β . A sinalização via BMP4 permite a formação dos centros de sinais de regulação da forma da cúspide, os nós de esmalte. Estes determinam os locais onde a folha epitelial se dobra e inicia-se o desenvolvimento da cúspide (28,30). A expressão de BMP4 apresenta potencial odontogénico na estimulação celular, atuando sinérgicamente com *Msx1* (*Msh homeobox 1*) na ativação do potencial mesenquimal, essencial para a formação dentária (91). A expressão de BMP7 é encontrada tanto no odontoblasto como

no ameloblastos e a expressão de BMP2 está presente principalmente nos odontoblastos no final do estágio de sino, atua na regulação da morfogênese dentária precoce e diferenciação tardia do odontoblasto, permitindo a orientação e polarização da célula e deposição inicial da matriz mineral. No osso, BMP2 atua no alvo ajusante *Runx2* promovendo a diferenciação dos osteoblastos (28,88). BMP9 apresenta um papel na regulação do desenvolvimento dentário promovendo a diferenciação dos odontoblastos e diferenciação osteogénica. Estudos *knock-out* de BMP9 em micromamíferos, observaram que as pontas dos incisivos encontravam-se desgastadas, as cúspides dos molares menores e raízes molares mais curtas (28).

A sinalização TGF β -1 e BMP apresentam um efeito sinérgico. Na diferenciação ameloblástica, BMP2 e BMP4 são secretados por odontoblastos mesênquimais e desempenham papéis fundamentais na expressão de proteínas da matriz extracelular (92,93). TGF β -1 e BMP ativam recetores via canónica intracelular smad2, smad3 e smad1, smad5, smad8, (samd - um acrónimo da fusão dos genes *Caenorhabditis elegans Sma* e *Drosophila Mad*, Mães contra decapentaplégico) que atuam através da fosforilação formando um complexo fosfo-R-Smads. Smad 4 regula a expressão de genes alvo no núcleo (93,94). Além do mais, a diferenciação dos ameloblastos induzida por GSK3 β (glicogénio sintase cinase 3 β) requer sinalização funcional de TGF- β , estudos indicam que pode existir uma interação cruzada antagonista entre Wnt e TGF- β através da função de GSK3 β na diferenciação de ameloblastos, mas investigações adicionais são necessárias para perceber o mecanismo (95)

Estudos nas polpas dentárias de incisivos, em micromamíferos, demonstraram que a expressão de BMP2, BMP4, BMP7, BMP8, GDF5 e GDF6 (fator de crescimento diferenciador 5/6), é crítica no desenvolvimento dentário e reparo pulpar. Os BMP (BMP2, BMP4, BMP7) desencadeiam eventos de sinalização que induzem o desenvolvimento de dentina. As vias de sinalização TGF- β e BMP estão envolvidas na formação e regulação da dentina reparadora, BMP2 regula a diferenciação de células pulpares em odontoblastos, enquanto o TGF- β 1 estimula a diferenciação e mineralização de odontoblastos (89,96).

5.4. Via sinalização HH

A via de sinalização *Hedgehog* (Hh) atua como mecanismo de sinalização parácrino e autócrino. Apresenta três homólogos: SHH, IHH e *desert hedgehog* (DHH).

O sinal SHH é o único ligante HH presente durante a odontogênese, considerado essencial para manter o tamanho, proliferação e polarização das células epiteliais, induzindo o crescimento das alças cervicais que circundam os nós de esmalte (24,30,88). A sua expressão no epitélio oral inicia-se antes da invaginação, e encontra-se presente durante o desenvolvimento dentário, onde mais tarde atua nas interações epiteliais-mesênquimais (28).

A sinalização de SHH permite atuar no recrutamento de células-estaminais no dente em crescimento funcionando como um modulador na sinalização WNT de forma a manter o número adequado e a conformação normal dos dentes (24,30,88). Por sua vez, a rede de sinalização BMP/SHH permite definir o destino diferencial de células-estaminais epiteliais em molares e incisivos de micromamíferos (28). Curiosamente, a expressão de *Shh* e *Bmp4* ativa o potencial odontogênico e sequente sinalização Wnt/ β -catenina ativando outros genes odontogênicos (85). Desregulações nos membros da família TNF- α , ectodisplasina (*Eda*) ou fator 6 associado ao recetor de TNF (*Traft6*), originam falhas nas vias de sinalização de SHH como de BMP e WNT, durante a formação do nó de esmalte primário. O que resulta num distúrbio do dobramento epitelial, da formação da alça cervical, afetando a formação dos nós secundários, consequentemente os dentes apresentam um tamanho reduzido e um menor número de cúspides (31).

As moléculas e recetores relacionados com a sinalização de SHH, como recetor transmembranar *patched* (Ptch), proteína transmembranar Smo, proteínas citoplasmáticas Gli1, Gli2 e Gli3 (Gli - fatores de transcrição oncogene associados a glioma) são expressas no mesênquima em torno do epitélio em espessamento, indicando a sua importância na proliferação e invaginação celular epitelial (97). Estudos em micromamíferos demonstram que no estágio inicial de sino, a via Shh-Ptch1-Gli atua no gene *RUNX* (fator de transcrição relacionado a *Runt*) resultando na proliferação e diferenciação de células estaminais do epitélio ativando ciclos de sinalização de FGF, mantendo a expressão de mRNA *SHH*. Mutações *Runx2* resultaram na regulação negativa da expressão de *SHH* no epitélio (23,88).

Estudos em micromamíferos (82), demonstraram que no início da formação da raiz de molares, HERS secreta SHH. As células positivas para Gli1 foram distribuídas no mesênquima ao redor de HERS e proliferaram à medida em que a raiz se alongava, diferenciando-se em odontoblastos, cementoblastos e fibroblastos na polpa dentária e no periodontal ligamento. As células Gli1-positivas apresentam ter potencial multilinhagem

e alta atividade de fibroblastos de unidades formadoras de colônias *in vitro*. Além disso, o alongamento da raiz não é observado no germe dentário sem células positivas para Gli1 durante o estágio de formação da raiz. Logo, as células positivas para Gli1 supram as células envolvidas na formação da raiz do dente. O que indica que Gli1 pode ser um marcador útil de células-estaminais mesênquimais no dente em desenvolvimento (82).

Numa fase tardia da odontogênese, o fator epitelial Shh atua como sinal parácrino na regulação da diferenciação do odontoblasto em cooperação com a sinalização BMP. Estudos em células mesênquimais isoladas de gérmen dentários bovino relataram que na sua presença, as células apresentavam capacidade para diferenciarem-se em odontoblastos e iniciar a expressão de marcadores de diferenciação como fosfatase alcalina, colagénio tipo I e DSPP. Além do mais, sua atividade demonstrou aumentar quando sujeito a co-tratamento com BMP2 e BMP4, sugerindo que SHH pode regular a diferenciação do odontoblasto junto com as BMPs *in vivo*. Esta noção é reforçada pela descoberta de que os transcritos de BMP2 e BMP4 são co-expressos em pré-odontoblastos em diferenciação onde SHH encontra-se presente (98). O sinal indutivo para a diferenciação do odontoblasto origina-se no epitélio interno, onde no mesênquima encontra-se o recetor Ptc1. Posteriormente SHH transmite o sinal necessário entre esses dois componentes do tecido, sendo considerado como um marcador para pré-ameloblastos. Estudos relatam (82), que no pré-ameloblasto a expressão de *SHH* regula o ciclo celular e exerce papel mitogénico, promovendo a transcrição de ciclina D1 controlando a transição de ciclina G1/S, permitindo a orientação e organização do citoesqueleto e arranjos dos complexos juncionais célula-célula. Os complexos juncionais especializados, juntamente com microtúbulos são importantes para estabelecer a polaridade celular e os domínios apical e basolateral. Foi demonstrado em micromamíferos que as células positivas para Gli1 no epitélio dentário proliferam e diferenciam-se em ameloblastos (82).

O fator de transcrição Runx2, é essencial para a diferenciação de osteoblastos, é expresso em células da linhagem osteogénica e odontogénica, logo as células mesenquimais dentais podem regular a expressão de SHH no epitélio. A sua inativação no epitélio resulta na formação de dentes pequenos com ausência de células Ptc1 e Gli1 positivas no mesênquima dentário. Estudos em incisivos de micromamíferos demonstram que a maioria das células originadas da crista neural craniana expressa Gli1 e estão localizadas no ápice posterior do mesênquima dentário. Essas células expandem e povoam toda a polpa dentária, bem como o ligamento periodontal. Foi sugerido que SHH

ao ser secretado pelos nervos sensoriais e não pelo epitélio dentário, é importante para a manutenção dessas células positivas para Gli1 no mesênquima e parece estar envolvido no suporte do nicho de células-estaminais no folículo capilar para desenvolvimento e regeneração (82).

Na formação óssea a diferenciação das células-estaminais epiteliais é definida pela rede de sinalização BMP/Shh. A redução da função Shh no epitélio, permite a regulação positiva da via de sinalização de WNT e FGF (28). O seu homólogo SHH, atua através de Gli2 e Gli3 regulando positivamente a transcrição de genes relacionados com a osteogénese como o *Runx2* e *OSX* (28,30). A ativação de *Runx2* é crucial, este atua como regulador mestre da diferenciação/maturação dos osteoblastos (88).

6. Doenças Associadas

Durante a formação do esmalte e dentina, alterações genéticas ou estímulos externos que perturbem o seu processo, podem ocasionar várias anomalias, patologias e síndromes. O fenótipo resultante depende de vários fatores. Os distúrbios nestes tecidos esmalte podem apresentar-se como defeitos na quantidade (hipoplasia) ou deficiências no conteúdo mineral (hipomineralização). Várias destas patologias foram aprofundadas anteriormente. As patologias ou síndromes relacionados com expressão genética apresentam um grande peso na formação destes tecidos (10,28). Várias condições hereditárias encontram-se associadas a um fenótipo de esmalte e da dentina. Diferentes genes são expressos durante a amelógenese e dentinogénese, que induzem respostas específicas que se traduzem na sua malformação. A fisiopatologia dessas alterações resulta numa disfunção das células núcleo, mais frequentemente resulta num fenótipo de hipoplásico. Algumas considerações vão ser apresentadas das condições genéticas conhecidas, relacionadas com a deleção ou desregulação na codificação de fatores de transcrição, fatores de crescimento, proteínas de matriz, canais iónicos e proteínases durante a formação do esmalte e dentina (10). As condições hereditárias não sindrómicas características são consideradas Amelogénese Imperfeita (AI) e Dentinogénese Imperfeita (DI). Os defeitos não herdados geralmente refletem um distúrbio sistémico e traduzem-se no momento de calcificação e erupção do dente (52).

6.1. Malformações da Dentina

A Dentinogênese Imperfecta do Tipo I (DGI-I) é uma manifestação oral da formação de colagénio deficiente, principalmente associada à osteogênese imperfeita. A DGI-I apresenta características semelhantes à DGI-II e DGI-III, onde a mineralização da dentina ocorre de forma defeituosa (33)

Na Dentinogênese Imperfecta Tipo II (DGI-II) as anomalias são tipicamente observadas pela coloração acastanhada-azulada da dentina, facilmente propensa a desgastes oclusais. A forma da coroa é bulbosa e na junção com a raiz apresenta uma constrição cervical. A câmara pulpar é estreita ou totalmente obliterada, as raízes são curtas, tanto nos dentes decíduos como permanentes e existe uma diminuição significativa no conteúdo mineral, pela redução do número de cristalitos. Estas alterações na dentina, são originadas por mutações no gene *DSPP*, presente em várias anomalias da dentina congénita (DGI-II e III). A ausência de *DSPP* afeta as funções dos odontoblastos, como a secreção de proteínas da matriz extracelular e o transporte de iões minerais, levando ao comprometimento da formação da dentina. Estudos em micromamíferos *knock-out* do gene *DSPP* observa-se uma área de pré-dentina aumentada e mineralização defeituosa (fenótipo semelhante a DGI-III). Tanto o *DSP* quanto o *DPP* contribuem para o início e maturação da mineralização, o *DPP* está principalmente envolvido na mineralização da dentina. Em DGI-I e II, a diferenciação de odontoblastos é comumente perturbada na fase inicial, apesar da diferenciação dos odontoblastos e informações dentárias são induzidas em DGI. Na Dentinogênese Imperfecta Tipo III (DGI-III) o fenótipo é mais grave do que DGI-II (33).

A Displasia de Dentina Tipo I (DD-I) é caracterizado pelo fenótipo de raízes curtas ou dentes sem raiz, com constrições apicais cónicas agudas e um aumento do crescimento irregular de dentina na câmara pulpar, o que pode induzir a obliterações pulpares totais. O esmalte e a dentina coronária são bem formados, mas a dentina radicular carece de organização histológica. Ambas as dentições são afetadas. O gene responsável é *SMOC2* (Ligação modular de cálcio 2 relacionada a SPARC (Proteína secretada ácida e rica em cisteína)) (33).

Na Displasia Dentina Tipo II (DD-II), a dentição decídua apresenta-se opalescente e as câmaras pulpares estão obliteradas, semelhante como DGI. No entanto os dentes permanentes no DD-II apresentam uma coloração normal e a configuração da câmara

pulpar apresenta-se em tubo com cálculos pulpare. Na DD-II prevalece uma mutação missense asp6-tyr no gene DSPP bicistrónico, característico das famílias DD-II (33).

Os Síndromes associadas a DGI apresentam características variáveis que também podem estar associadas a síndromes, como por exemplo: Síndrome de *Ehlers-Danlos* tipo I e tipo VIIc, displasia espondilometafisária associada à frouidão articular e dentinogénese imperfeita, síndrome de *Brachio-skeleto-genital* de *Elashy-Waters*, displasia imuno-óssea, tipo de *Schimke* e odontodisplasia (33).

6.2. Malformações do Esmalte

A AI apresenta uma variedade de malformações, distúrbios classificados com base no fenótipo clínico, modo de herança, e mecanismo conhecido que leva ao defeito do esmalte. Vários estudos e observações foram relatadas por muitos autores. Esta condição, apresenta-se condicionada ao espaço e tempo onde ocorre os distúrbios. Nomeadamente, falhas incorporadas durante a formação da JAD podem resultar numa camada de esmalte que se desintegra facilmente da dentina subjacente. Os defeitos durante o estágio secretor resultam em alongamento insuficiente do cristal e deixam a camada de esmalte patologicamente fina ou hipoplástica. Por sua vez, defeitos no estágio de maturação, como falhas na degradação e reabsorção da matriz do esmalte, produzem uma camada de espessura normal, mas patologicamente mole (10,52).

A síndrome de *Kohlschütter-Tönz* uma condição hereditária que apresenta um fenótipo distinto. Todos os dentes apresentam-se com uma descoloração amarelada no esmalte e com baixa mineralização. A identificação do gene *ROGDI* (zíper leucina atípico *rogdi*) relevou-se importante para a formação do esmalte. A sua expressão codifica uma proteína *zíper* de leucina, altamente expressa no cérebro e medula espinhal. Esta proteína apresenta uma característica estrutural comum a fatores de transcrição e outros tipos de proteínas implicados como reguladores de transcrição negativos (10).

Síndrome de Jalili, é uma condição hereditária, caracterizado por uma distrofia em bastonete cónico nos olhos e no esmalte, este apresenta uma coloração acastanhada e hipomineralizado. Esta condição é causada por mutações no gene 4 do mediador de transporte de catiões de metal divalente de domínio de ciclina e CBS (CNNM4).

A fibrose cística (FC) é uma condição hereditária causada por mutações no gene *CFTR* (regulador de condução transmembranar de fibrose cística), envolvido na

regulação do movimento iônico e na regulação do pH. Os defeitos de esmalte dependem da gravidade variável (10).

A condição hereditária associada aos genes envolvidos no transporte de iões resulta numa disfunção imunológica. Estes incluem os membros dos canais Ca^+ ativados pela secreção de Ca^+ como STIM1 (molécula de interação estromal 1) e ORAI1 (Proteína do canal de cálcio ativada para libertação de cálcio). Mutações no trocador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCKX4 (canal de trocas de sódio e cálcio - codificado por *SLC242* (transportador de soluto)) estão diretamente ligadas a AI (10).

7. Considerações clínicas

O desenvolvimento do esmalte e da dentina é um processo excepcionalmente complexo na natureza, onde abordagens científicas ainda carecem de elucidação (14). As particularidades celulares dos ameloblastos, os níveis iónicos necessários à mineralização e as variações de pH requeridos na amelogénese representam um grande obstáculo nos procedimentos baseados na regeneração do esmalte dentário. Para além disso, o esmalte é um tecido acelular que ao sofrer lesões de cárie dentária ou trauma, é incapaz de reparo ou renovação. Para alcançar um sucesso na sua restauração, o tratamento é limitado ao uso de técnicas de condicionamento ácido e materiais artificiais, como resina, amálgama e porcelana, que por vezes apresentam falhas devido à microinfiltração frequente, ao limite de vida útil ou incapacidade inerente de restaurar totalmente sua função (23,60). Várias tentativas para alcançar a sua remineralização foram realizadas, mas com pouco sucesso. No entanto, uma nova estratégia foi aplicada na sua regeneração. Esta terapêutica, investigou o crescimento epitaxial baseado na transformação de fase mineral, para reprodução biomimética de materiais com estrutura complicada. Partículas de ACP com cerca de 20 nm podem ligar-se e reunir-se em cristais de HAp do esmalte, mas falham na indução do seu crescimento epitaxial. No entanto, aglomerados de iões de fosfato de cálcio (CPICs), com tamanhos de alguns nanómetros, podem atuar como blocos básicos de ACP e HAp, se devidamente estabilizados por pequenas moléculas orgânicas removíveis como por exemplo um polímero como a trietilamina (TEA), facilmente removido com a evaporação do etanol. Os resultados demonstraram a reprodução mimética da fronteira amorfa-cristalina, com o desenvolvimento de uma camada fina de reparo, devido à competição entre a taxa de movimento da fronteira de cristalização biomimética e o tempo de vida do ACP. Adicionalmente o TEA pode gerar um efeito de

toxicidade, logo exige um algo controle de dosagem. Contudo, os resultados demonstraram no esmalte reparado uma textura morfológica semelhante ao esmalte nativo. No entanto, uma melhoria da camada pode ser induzida, aumentando a cristalização direcional ou aumentando a estabilidade do ACP. O que representa um futuro material promissor para aplicações clínicas (99). Além do mais, a aplicação da nanotecnologia também apresenta potencial na remineralização. Uma abordagem combinatória de engenharia de tecidos juntamente com o desenvolvimento de nanopartículas biomiméticas é promissora na remineralização do esmalte. Mais recentemente, uma estratégia à base de péptidos foi aplicada, onde a HAp guiada por glicina conjugada com nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo demonstrou remineralizar o esmalte (13).

Na dentina, as técnicas de remineralização aplicadas envolvem adesivos contendo NACP (nano partículas de ACP) onde a lesão desmineralizada é exposta a uma solução supersaturada de íons cálcio e fosfato, e a precipitação mineral inicia-se sobre as sementes de cristais existentes. Outros processos têm como base a via de cristalização não clássica, onde PNC ou análogos biomiméticos servem como regulação das fases de fosfato de cálcio. Estas fases incluem a captura de cálcio e fosfato com sequente transformação em ACP, onde o modelo de nucleação mineral e crescimento, ocorre em espaços intrafibrósos e interfibrósos, enquanto que a matriz de colagénio serve como um molde de deposição mineral. Os domínios polianiónicos dessas proteínas contêm grupos de função de ácido policarboxílico e fosfato que podem ajudar a ligarem-se a substratos de colagénio. Assim a ligação de cálcio e a nucleação mineral ocorrem através dos locais aniónicos das proteínas. Embora um estabilizador ACP seja difícil de aplicar ao adesivo, seria interessante adicionar um estabilizador ACP com NACP, em outras formas de aplicação em estudos futuros, para obter remineralização de arranjo de alta ordem (100).

A medicina de regeneração dentária apresenta vantagens inovadoras na terapêutica dos tecidos dentários comparativamente com as técnicas tradicionais de restauração dentária, onde são aplicados materiais artificiais. Diferentes áreas tecnológicas e científicas abrangem esta temática. A sua investigação depende do progresso da pesquisa em biomateriais, biologia de células-estaminais e outras tecnologias científicas. A terapêutica através da reativação de sinais indutores, encontra-se envolvida no conhecimento das vias de sinalização expressas durante o desenvolvimento dentário. Identificar potenciais fatores (sinais/"*cues*") com capacidade

de atuar na regeneração ou reparação de tecidos, torna-se um método promissor para aplicações clínicas. (28).

Atualmente os sistemas em estudo englobam, a libertação de fatores de uma forma controlada, sistemas de entrega espaçotemporal da expressão genética, transplantação genética de células modificadas, e por último a regeneração completa do dente (28).

No sistema de controlo de libertação de fatores secretores, os biomateriais, apresentam como princípio o controlo da taxa de degradação dos materiais onde os fatores são incorporados, num ambiente fisiológico específico (28).

Estudos (28,32), sobre os sistemas de biomateriais demonstraram que aplicação de malhas imobilizadas com heparina permite imobilizar as citocinas, possibilitando o controlo da sua libertação. O coacervato de FGF2 numa base de heparina, desempenha um efeito sinérgico com a proliferação celular. A tecnologia de auto-montagem em camadas e eletrofiação demonstraram sustentar a libertação de moléculas bioativas de uma maneira espaçotemporal (28,32).

Estudos sobre a libertação contínua de FGF2, na ausência de odontoblastos totalmente diferenciados, demonstraram a formação de partículas semelhantes à dentina e/ou osteodentina, dependendo da dose do fator de crescimento. As células que revestiam as partículas e a ligação calcificada expressavam DMP1, mas não a nestina, um marcador para odontoblastos maduros e diferenciados. O que indica que os efeitos da libertação de FGF2 em células da linhagem de odontoblastos está relacionado ao espaçotemporal de diferenciação (32)

No reparo da dentina, foi demonstrado que efeitos de exposição precoce e limitada na polpa dentária de FGF e níveis elevados de sinalização Wnt, podem estar associados a interações na dentinogénese reparativa e regeneração dentinária. Evidências genéticas e funcionais demonstraram que as interações entre o FGF e a sinalização de Wnt/ β -catenina podem controlar o destino e a diferenciação de células estaminais mesênquimais (MSC) (32).

Nos sistemas espaçotemporais do controlo da expressão genética, um modelo transgénico sob o controle do promotor WNT1 foi alcançado com sucesso e tem sido amplamente utilizado na regeneração dentária. A proteína DPM1 produzida por odontoblastos e osteoblastos é expressa tanto no osso e na dentina. Estudos indicam que TCF11, pode ligar-se especificamente ao promotor DMP1, regulando a sua transcrição em odontoblastos e osteoblastos, fornecendo assim uma maneira de regular espaço-temporalmente a expressão de DMP1 (28).

No sistema de transplantação de células geneticamente modificadas, denotou-se que as células do ligamento periodontal humano (hPDLs) transfectadas com lentivírus LV-Ctnnb (com efeito na sua superexpressão), ativaram a via de sinalização WNT canónica e induziram a diferenciação cementogénica *in vitro* e regeneração do cimento *in vivo*. O transplante de células-tronco/progenitoras da polpa dentária transfetadas com genes BMP, por eletroporação ou sonoporação, na polpa lesada pode aumentar a formação de dentina reparadora (28).

Os procedimentos endodônticos regenerativos têm como base os princípios da engenharia de tecidos compreendendo 3 componentes principais células-estaminais, matriz de colagénio e moléculas bioativas, com o objetivo de regenerar um complexo funcional dentina-polpa. As moléculas bioativas como BMP2, BMP4, BMP7 e o fator de TGF- β 1 apresentam-se promissores na modulação das funções celulares. Estudos em meios de cultura, demonstraram que a sua adição aumentava a síntese da matriz extracelular, estimulava a diferenciação semelhante ao odontoblasto, aumentava a expressão de marcadores odontogénicos e a formação de osteodentina (um tipo de dentina terciária). Ultraestruturalmente, foram observados fibroblastos ou odontoblastos aprisionados, onde exibiam ocasionalmente, túbulos dentinários. Estes efeitos demonstraram ser dependentes da concentração das moléculas bioativas individuais, bem como da célula alvo. As moléculas da matriz dentinária desempenham um papel fundamental em vários eventos que levam a alterações na reparação do complexo dentina-polpa (101).

III. CONCLUSÃO

O estudo do processo de mineralização é uma temática fundamental em vários aspectos, como foi referido ao longo desta revisão. Este fenómeno resulta na formação de tecidos duros como o osso e o dente. Várias interações ocorrem durante a formação e mineralização do esmalte e da dentina. O conteúdo bioquímico, molecular e genético envolvido no processo, permite ser aplicado em novas estratégias no campo da medicina dentária.

Além disso, a identificação de vias reguladoras de genes que permitem a indução e formação dentária, proporciona novos horizontes na regeneração dos tecidos dentários quando aplicados à bioengenharia. Devido à complexidade da regulação espaçotemporal do desenvolvimento dentário, a identificação de fatores essenciais para a regeneração dentária encontra-se intensamente explorada. No entanto algumas limitações ainda estão presentes no desenvolvimento destes sistemas.

Esta revisão da literatura visou contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na mineralização do esmalte e da dentina, para o apoio no desenvolvimento de novos materiais biomiméticos de uso clínico em medicina dentária e/ou de novos fármacos.

IV. BIBLIOGRAFIA

1. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016 Sep 19;11:4743–63. Doi: [10.2147/IJN.S107624](https://doi.org/10.2147/IJN.S107624)
2. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005 Sep;83(9):661–9. Doi: [10.1590/S0042-96862005000900011](https://doi.org/10.1590/S0042-96862005000900011)
3. Smith EE, Yelick PC. Progress in Bioengineered Whole Tooth Research: From Bench to Dental Patient Chair. *Curr Oral Health Rep*. 2016 Dec;3(4):302–8. Doi: [10.1007/s40496-016-0110-2](https://doi.org/10.1007/s40496-016-0110-2)
4. Alves M do SC, Lucena SC de, Araujo SG, Carvalho ALA de. Diagnóstico clínico e protocolo de tratamento do desgaste dental não fisiológico na sociedade contemporânea. *Odontol Clínico-Científica Online*. 2012 Sep;11(3):247–51.
5. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet Lond Engl*. 2007 Jan 6;369(9555):51–9. Doi: [10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)
6. Frencken J. Caries Epidemiology and Its Challenges. *Monogr Oral Sci*. 2018;27:11–23. Doi: [10.1159/000487827](https://doi.org/10.1159/000487827)
7. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci*. 2017;11(2):72–80. PMID: 28539867
8. Pan W, Wang Q, Chen Q. The cytokine network involved in the host immune response to periodontitis. *Int J Oral Sci*. 2019 Nov 5;11(3):1–13. Doi: [10.1038/s41368-019-0064-z](https://doi.org/10.1038/s41368-019-0064-z)
9. Barron MJ, McDonnell ST, MacKie I, Dixon MJ. Hereditary dentine disorders: dentinogenesis imperfecta and dentine dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Nov 20;3:31. Doi: [10.1186/1750-1172-3-31](https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-31)
10. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiol Rev*. 2017 Jul 1;97(3):939–93. Doi: [10.1152/physrev.00030.2016](https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2016)

11. Zhang KY, Wang S, Zhou C, Cheng L, Gao X, Xie X, et al. Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Res.* 2018 Dec 1;6. Doi: 10.1038/s41413-018-0032-9
12. Deng DM, ten Cate JM. Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilms grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res.* 2004 Feb;38(1):54–61. Doi: 10.1159/000073921
13. Sharma V, Srinivasan A, Nikolajeff F, Kumar S. Biomineralization process in hard tissues: The interaction complexity within protein and inorganic counterparts. *Acta Biomater.* 2021 Jan 15;120:20–37. Doi: 10.1016/j.actbio.2020.04.049
14. Pandya M, Diekwisch TGH. Enamel biomimetics—fiction or future of dentistry. *Int J Oral Sci.* 2019 Jan 5;11(1):1–9. Doi: 10.1038/s41368-018-0038-6
15. He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, et al. Biomineralization of dentin. *J Struct Biol.* 2019 Aug 1;207(2):115–22. Doi: 10.1016/j.jsb.2019.05.010
16. Aquilano D, Bruno M, Ghignone S, Pastero L. Theoretical equilibrium shape of hydroxyapatite, revised. *CrystEngComm.* 2020 Nov 23;22(45):7944–51. Doi: [10.1039/D0CE01121E](https://doi.org/10.1039/D0CE01121E)
17. Moradian-Oldak J, George A. Biomineralization of Enamel and Dentin Mediated by Matrix Proteins. *J Dent Res.* 2021 Sep 1;100(10):1020–9. Doi: 10.1177/00220345211018405
18. Fihri A, Len C, Varma R, Solhy A. Hydroxyapatite: A review of syntheses, structure and applications in heterogeneous catalysis. *Coord Chem Rev.* 2017 Jun 1;347. Doi: [0.1016/j.ccr.2017.06.009](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.06.009)
19. Sharma V, Rani K, Roychoudhury A, Chawla A, Nikolajeff F, Kumar S. Novel Insights into Regulation of Human Teeth Biomineralization: Deciphering the Role of Post-Translational Modifications in a Tooth Protein Extract. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 19;20(16):4035. Doi: 10.3390/ijms20164035

20. Boskey A. Mineralization of Bones and Teeth. *Elements*. 2007 Dec 1;3:385–91. Doi: 10.2113/GSELEMENTS.3.6.385
21. Kovacs CS, Chaussain C, Osdoby P, Brandi ML, Clarke B, Thakker RV. The role of biomineralization in disorders of skeletal development and tooth formation. *Nat Rev Endocrinol*. 2021 Jun;17(6):336–49. Doi: 10.1038/s41574-021-00488-z
22. Kreiborg S, Jensen BL. Tooth formation and eruption – lessons learnt from cleidocranial dysplasia. *Eur J Oral Sci*. 2018 Oct;126(S1):72–80. Doi: 10.1111/eos.12418
23. Gan L, Liu Y, Cui D-X, Pan Y, Wan M. New insight into dental epithelial stem cells: Identification, regulation, and function in tooth homeostasis and repair. *World J Stem Cells*. 2020 Nov 26;12(11):1327–40. Doi: 10.4252/wjsc.v12.i11.1327
24. Jernvall J, Thesleff I. Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Dev Camb Engl*. 2012 Oct;139(19):3487–97. Doi: 10.1242/dev.085084
25. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1647–8. Doi: 10.1242/jcs.00410
26. Olley R, Xavier GM, Seppala M, Volponi AA, Geoghegan F, Sharpe PT, et al. Expression analysis of candidate genes regulating successional tooth formation in the human embryo. *Front Physiol*. 2014;5:445. Doi: 10.3389/fphys.2014.00445
27. Mafra RP, Vasconcelos RG, Vasconcelos MG, Queiroz LMG, Barboza CAG. Desenvolvimento dental : aspectos morfogenéticos e relações com as anomalias dentárias do desenvolvimento. *Rev Bras Odontol*. 2013 Jun 19;69(2):232. Doi: 10.18363/rbo.v69n2.p.232
28. Huang D, Ren J, Li R, Guan C, Feng Z, Bao B, et al. Tooth Regeneration: Insights from Tooth Development and Spatial-Temporal Control of Bioactive Drug Release. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb 1;16(1):41–55. Doi: 10.1007/s12015-019-09940-0
29. Jia S, Kwon H-JE, Lan Y, Zhou J, Liu H, Jiang R. Bmp4-Msx1 signaling and Osr2 control tooth organogenesis through antagonistic regulation of secreted Wnt antagonists. *Dev Biol*. 2016 Dec 1;420(1):110–9. Doi: 10.1016/j.ydbio.2016.10.001

30. Sagai T, Amano T, Maeno A, Kiyonari H, Seo H, Cho S-W, et al. SHH signaling directed by two oral epithelium-specific enhancers controls tooth and oral development. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):13004. Doi: 10.1038/s41598-017-12532-y
31. Li C, Procházka J, Goodwin A, Klein O. Fibroblast growth factor signaling in mammalian tooth development. *Odontology*. 2013; Doi: 10.1007/s10266-013-0142-1
32. Du W, Du W, Yu H. The Role of Fibroblast Growth Factors in Tooth Development and Incisor Renewal. *Stem Cells Int*. 2018 Mar 11;2018:7549160. Doi: 10.1155/2018/7549160
33. Kawashima N, Okiji T. Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenit Anom*. 2016;56(4):144–53. Doi: 10.1111/cga.12169
34. Yu T, Klein OD. Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Dev Camb Engl*. 2020 Jan 24;147(2):dev184754. Doi: 10.1242/dev.184754
35. Suzuki S, Haruyama N, Nishimura F, Kulkarni AB. Dentin Sialophosphoprotein and Dentin Matrix Protein-1: Two Highly Phosphorylated Proteins in Mineralized Tissues. *Arch Oral Biol*. 2012 Sep;57(9):1165–75. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.03.005
36. Ramadoss R, Padmanaban R, Subramanian B. Role of bioglass in enamel remineralization: Existing strategies and future prospects—A narrative review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2021 Jul 10;jbm.b.34904. Doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34904>
37. Lesot H, Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Mitolo V, Ruch JV. Epigenetic Signals during Odontoblast Differentiation. *Adv Dent Res*. 2001 Aug 1;15(1):8–13. Doi: 10.1177/08959374010150012001
38. He P, Zhang Y, Kim SO, Radlanski RJ, Butcher K, Schneider RA, et al. Ameloblast Differentiation in the Human Developing Tooth: Effects of Extracellular Matrices. *Matrix Biol*. 2010 Jun;29(5):411–9. Doi: 10.1016/j.matbio.2010.03.001

39. Thesleff I, Hurmerinta K. Tissue interactions in tooth development. *Differ Res Biol Divers*. 1981;18(2):75–88. Doi: [10.1111/j.1432-0436.1981.tb01107.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1981.tb01107.x)
40. Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, et al. Laminin $\alpha 2$ Is Essential for Odontoblast Differentiation Regulating Dentin Sialoprotein Expression *. *J Biol Chem*. 2004 Mar 12;279(11):10286–92. Doi: [10.1074/jbc.M310013200](https://doi.org/10.1074/jbc.M310013200)
41. Iwamoto T, Nakamura T, Ishikawa M, Yoshizaki K, Sugimoto A, Ida-Yonemochi H, et al. Pannexin 3 regulates proliferation and differentiation of odontoblasts via its hemichannel activities. *PLoS ONE*. 2017 May 11;12(5):e0177557. Doi: [10.1371/journal.pone.0177557](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177557)
42. Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Front Biosci Elite Ed*. 2011 Jan 1;3:711–35. Doi: [10.2741/e281](https://doi.org/10.2741/e281)
43. Kuzynski M, Goss M, Bottini M, Yadav MC, Mobley C, Winters T, et al. Dual role of the Trps1 transcription factor in dentin mineralization. *J Biol Chem*. 2014 Oct 3;289(40):27481–93. Doi: [10.1074/jbc.M114.550129](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550129)
44. Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res*. 2014 Jul 15;325(2):65–71. Doi: [10.1016/j.yexcr.2013.12.012](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.012)
45. Nikdin H, Olsson M-L, Hultenby K, Sugars RV. Osteoadherin Accumulates in the Predentin towards the Mineralization Front in the Developing Tooth. *PLOS ONE*. 2012 Feb 15;7(2):e31525. Doi: [10.1371/journal.pone.0031525](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031525)
46. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Apr 1;105(13):5266–70. Doi: [10.1073/pnas.0711119105](https://doi.org/10.1073/pnas.0711119105)
47. Giacaman R, Perez V, Carrera C. Mineralization processes in hard tissues. In 2016. p. 147–85. Doi: [10.1016/B978-1-78242-338-6.00006-5](https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00006-5)

48. Gotliv B-A, Veis A. Peritubular dentin, a vertebrate apatitic mineralized tissue without collagen: role of a phospholipid-proteolipid complex. *Calcif Tissue Int.* 2007 Sep;81(3):191–205. Doi: 10.1007/s00223-007-9053-x
49. Silva JMG da. Propriedades químicas e físicas do esmalte de dentes decíduos e permanentes [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2011 [cited 2021 Oct 15]. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/58/58135/tde-30112011-143333/> Doi: 10.11606/T.58.2011.tde-30112011-143333
50. Beniash E, Stiffler C, Sun C-Y, Jung GS, Qin Z, Buehler M, et al. The hidden structure of human enamel. *Nat Commun.* 2019 Sep 26;10:1–13. Doi: 10.1038/s41467-019-12185-7
51. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 1995;6(2):84–108. Doi: 10.1177/10454411950060020701
52. Simmer JP, Hu JC. Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ.* 2001 Sep;65(9):896–905. Doi: <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2001.65.9.tb03438.x>
53. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993 Oct 1;4(5):679–728. Doi: 10.1177/10454411930040050301
54. Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci.* 1998 Jan;106 Suppl 1:282–91. Doi: 10.1111/j.1600-0722.1998.tb02188.x
55. Zhong J, Yang Y, Liao L, Zhang C. Matrix stiffness-regulated cellular functions under different dimensionalities. *Biomater Sci.* 2020 May 19;8(10):2734–55. Doi:10.1039/C9BM01809C
56. Fukumoto S, Miner JH, Ida H, Fukumoto E, Yuasa K, Miyazaki H, et al. Laminin $\alpha 5$ Is Required for Dental Epithelium Growth and Polarity and the Development of Tooth Bud and Shape *. *J Biol Chem.* 2006 Feb 24;281(8):5008–16. Doi: [10.1074/jbc.M509295200](https://doi.org/10.1074/jbc.M509295200)

57. Saito K, Fukumoto E, Yamada A, Yuasa K, Yoshizaki K, Iwamoto T, et al. Interaction between Fibronectin and β 1 Integrin Is Essential for Tooth Development. PLOS ONE. 2015 Apr 1;10(4):e0121667. Doi: 10.1371/journal.pone.0121667
58. Seo Y-M, Park S-J, Lee H-K, Park J-C. Copine-7 binds to the cell surface receptor, nucleolin, and regulates ciliogenesis and Dspp expression during odontoblast differentiation. Sci Rep. 2017 Sep 12;7:11283. Doi: 10.1038/s41598-017-11641-y
59. Guan X, Xu M, Millar SE, Bartlett JD. Beta-catenin is essential for ameloblast movement during enamel development. Eur J Oral Sci. 2016 Jun;124(3):221–7. Doi: 10.1111/eos.12261
60. Fan L, Deng S, Sui X, Liu M, Cheng S, Wang Y, et al. Constitutive activation of β -catenin in ameloblasts leads to incisor enamel hypomineralization. J Mol Histol. 2018 Oct 1;49(5):499–507. Doi: 10.1007/s10735-018-9788-x
61. Hao J, Ramachandran A, George A. Temporal and Spatial Localization of the Dentin Matrix Proteins During Dentin Biomineralization. J Histochem Cytochem. 2009 Mar 1;57(3):227–37. Doi: 10.1369/jhc.2008.952119
62. Chang B, Svoboda KKH, Liu X. Cell polarization: From epithelial cells to odontoblasts. Eur J Cell Biol. 2019 Jan;98(1):1–11. Doi: 10.1016/j.ejcb.2018.11.003
63. Li W, Chen L, Chen Z, Wu L, Feng J, Wang F, et al. Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. Sci Rep. 2017 Mar 22;7:300. Doi: 10.1038/s41598-017-00339-w
64. Michon F, Tummers M, Kyyrönen M, Frilander MJ, Thesleff I. Tooth morphogenesis and ameloblast differentiation are regulated by micro-RNAs. Dev Biol. 2010 Apr 15;340(2):355–68. Doi: 10.1016/j.ydbio.2010.01.019
65. Robinson C, Kirkham J, Shore RC. Dental enamel: Formation to destruction. Dental Enamel Formation to Destruction. 2017. 1 p. Doi: 10.1155/2013/684607
66. Habelitz S. Materials engineering by ameloblasts. J Dent Res. 2015 Jun;94(6):759–67. Doi: 10.1177/0022034515577963

67. Brookes SJ, Barron MJ, Dixon MJ, Kirkham J. The Unfolded Protein Response in Amelogenesis and Enamel Pathologies. *Front Physiol.* 2017 Sep 8;8:653. Doi: 10.3389/fphys.2017.00653
68. Arachchige RJ, Burton SD, Lu J-X, Ginovska B, Harding LK, Taylor ME, et al. Solid-State NMR Identification of Intermolecular Interactions in Amelogenin Bound to Hydroxyapatite. *Biophys J.* 2018 Nov 6;115(9):1666–72. Doi: 10.1016/j.bpj.2018.08.027
69. Shaw W, Tarasevich B, Buchko G, Jayasinha R, Burton S. Controls of Nature: Secondary, tertiary, and quaternary structure of the enamel protein amelogenin in solution and on hydroxyapatite. *J Struct Biol.* 2020 Sep 23;212:107630. Doi: 10.1016/j.jsb.2020.107630
70. Cipitria A, Salmeron-Sanchez M. Mechanotransduction and Growth Factor Signalling to Engineer Cellular Microenvironments. *Adv Healthc Mater.* 2017;6(15):1700052. Doi: 10.1002/adhm.201700052
71. Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF, et al. Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. *Front Physiol.* 2017;8:435. Doi: 10.3389/fphys.2017.00435
72. Chavez MB, Kramer K, Chu EY, Thumbigere-Math V, Foster BL. Insights into dental mineralization from three heritable mineralization disorders. *J Struct Biol.* 2020 Oct 1;212(1):107597. Doi: 10.1016/j.jsb.2020.107597
73. Bronckers ALJJ. Ion Transport by Ameloblasts during Amelogenesis. *J Dent Res.* 2017 Mar;96(3):243–53. Doi: 10.1177/0022034516681768
74. Su J, Bapat RA, Visakan G, Moradian-Oldak J. An Evolutionarily Conserved Helix Mediates Ameloblastin-Cell Interaction. *J Dent Res.* 2020 Aug;99(9):1072–81. Doi: 10.1177/0022034520918521
75. Rey C, Combes C. Physical Chemistry of Biological Apatites. In 2016. p. 95–127. Doi: 10.1016/B978-1-78242-338-6.00004-1
76. Combes C, Cazalbou S, Rey C. Apatite Biominerals. *Minerals.* 2016 Jun;6(2):34. Doi: 10.3390/min6020034

77. Pajor K, Pajchel L, Kolmas J. Hydroxyapatite and Fluorapatite in Conservative Dentistry and Oral Implantology—A Review. *Materials*. 2019 Aug 22;12(17):2683. Doi: 10.3390/ma12172683
78. Yin K, Paine ML. Bicarbonate Transport During Enamel Maturation. *Calcif Tissue Int*. 2017 Nov;101(5):457–64. Doi: 10.1007/s00223-017-0311-2
79. Eckstein M, Lacruz RS. CRAC channels in dental enamel cells. *Cell Calcium*. 2018 Nov;75:14–20. Doi: 10.1016/j.ceca.2018.07.012
80. Nurbaeva MK, Eckstein M, Concepcion AR, Smith CE, Srikanth S, Paine ML, et al. Dental enamel cells express functional SOCE channels. *Sci Rep*. 2015 Oct 30;5(1):15803. Doi: 10.1038/srep15803
81. Eckstein M, Vaeth M, Aulestia F, Costiniti V, Kassam S, Bromage T, et al. Differential regulation of Ca²⁺ influx by ORAI channels mediates enamel mineralization. *Sci Signal*. 2019 Apr 23;12:eaav4663. Doi:10.1126/scisignal.aav4663
82. Seppala M, Fraser GJ, Birjandi AA, Xavier GM, Cobourne MT. Sonic Hedgehog Signaling and Development of the Dentition. *J Dev Biol*. 2017 May 31;5(2):E6. Doi:10.3390/jdb5020006
83. Söderholm S, Cantù C. The WNT/ β -catenin dependent transcription: A tissue-specific business. *WIREs Mech Dis*. 2021;13(3):e1511. Doi: 10.1002/wsbm.1511
84. Lu X, Yang J, Zhao S, Liu S. Advances of Wnt signalling pathway in dental development and potential clinical application. *Organogenesis*. 2019 Sep 4;15(4):101–10. Doi:10.1080/15476278.2019.1656996
85. Zhou N, Li N, Liu J, Wang Y, Gao J, Wu Y, et al. Persistent Wnt/ β -catenin signaling in mouse epithelium induces the ectopic Dspp expression in cheek mesenchyme. *Organogenesis*. 2018 Dec 20;15(1):1–12. Doi:10.1080/15476278.2018.1557026

86. Chen D, Yu F, Wu F, Bai M, Lou F, Liao X, et al. The role of Wnt7B in the mediation of dentinogenesis via the ERK1/2 pathway. *Arch Oral Biol.* 2019 Aug 1;104:123–32. Doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.05.009
87. Bae J-M, Clarke JC, Rashid H, Adhami MD, McCullough K, Scott JS, et al. Specificity Protein 7 Is Required for Proliferation and Differentiation of Ameloblasts and Odontoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2018 Jun;33(6):1126–40. Doi: 10.1002/jbmr.3401
88. Salhotra A, Shah H, Levi B, Longaker M. Mechanisms of bone development and repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Sep 8;21. Doi: 10.1038/s41580-020-00279-w
89. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *Eur J Oral Sci.* 2017 Oct;125(5):315–37. Doi: 10.1111/eos.12364
90. Li Y, Lee M, Kim N, Wu G, Deng D, Kim JM, et al. Spatiotemporal Control of TGF- β Signaling with Light. *ACS Synth Biol.* 2018 Feb 16;7(2):443–51. Doi: 10.1021/acssynbio.7b00225
91. Gao Z, Wang L, Wang F, Zhang C, Wang J, He J, et al. Expression of BMP2/4/7 during the odontogenesis of deciduous molars in miniature pig embryos. *J Mol Histol.* 2018 Oct 1;49(5):545–53. Doi: 10.1007/s10735-018-9792-1
92. Aurrekoetxea M, Irastorza I, García-Gallastegui P, Jiménez-Rojo L, Nakamura T, Yamada Y, et al. Wnt/ β -Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:25. Doi: 10.3389/fcell.2016.00025
93. Tummers M, Thesleff I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009 Jun 1;312B(4):309–19. Doi: 10.1002/jez.b.21280

94. Hyun S-Y, Mun S, Kang K-J, Lim J-C, Kim S-Y, Han K, et al. Amelogenic transcriptome profiling in ameloblast-like cells derived from adult gingival epithelial cells. *Sci Rep.* 2019 Mar 6;9(1):3736. Doi: 10.1038/s41598-019-40091-x
95. Yang Y, Li Z, Chen G, Li J, Li H, Yu M, et al. GSK3 β regulates ameloblast differentiation via Wnt and TGF- β pathways. *J Cell Physiol.* 2018 Jul;233(7):5322–33. Doi: 10.1002/jcp.26344
96. Birjandi AA, Sharpe P. Wnt Signalling in Regenerative Dentistry. *Front Dent Med.* 2021;2:59. Doi: <https://doi.org/10.3389/fdmed.2021.725468>
97. Hosoya A, Shalehin N, Takebe H, Shimo T, Irie K. Sonic Hedgehog Signaling and Tooth Development. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 26;21(5):1587. Doi: 10.3390/ijms21051587
98. Shimo T, Koyama E, Kanyama M, Kurio N, Okui T, Yamamoto D, et al. Sonic Hedgehog Positively Regulates Odontoblast Differentiation by a BMP2/4-dependent Mechanism. *J Oral Tissue Eng.* 2009;7(1):26–37. Doi: 10.11223/jarde.7.26
99. Shao C, Jin B, Mu Z, Lu H, Zhao Y, Wu Z, et al. Repair of tooth enamel by a biomimetic mineralization frontier ensuring epitaxial growth. *Sci Adv.* 2019 Aug 30;5(8):eaaw9569. Doi: 10.1126/sciadv.aaw9569
100. Tao S, He L, Xu HHK, Weir MD, Fan M, Yu Z, et al. Dentin remineralization via adhesive containing amorphous calcium phosphate nanoparticles in a biofilm-challenged environment. *J Dent.* 2019 Oct;89:103193. Doi: 10.1016/j.jdent.2019.103193
101. Shrestha S, Kishen A. Bioactive Molecule Delivery Systems for Dentin-pulp Tissue Engineering. *J Endod.* 2017 May;43(5):733–44. Doi: 10.1016/j.joen.2016.12.020
102. Swift EJ, Sturdevant CM, Roberson TM, Heymann H. *Sturdevant's art and science of operative dentistry.* Elsevier Health Sciences; 2006. ISBN: 9780323478335

V. ANEXOS

Colagénio 90%		Colagénio tipo I (89%) + Trímero tipo I (11%)	+ 1-3% Colagénio tipo III e tipo V
Proteínas no colagénicas (PNC) 10%	Proteínas Fosforiladas	SIBLINGS (do inglês - <i>Small Integrin- Binding Ligand, N-linked Glycoproteins</i>)	DSPP (Sialo-fosfo-proteína da dentina) (155-95KDa): <ul style="list-style-type: none"> DSP (sialo-proteína da dentina) (proteoglicano forma dímeros terminal-N): 100-280KDa DGP (glico-proteína dentina): 19KDa DPP (fosfo-proteína da dentina ou fosforina da dentina)(terminal-C): 94KDa, nucleador mineralização DMP1 (Proteína matriz dentina 1): 61KDa proteoglicano, nucleador BSP (Sialo-proteína do osso): 95KDa, proteoglicano, nucleador crescimento do cristal OPN (Osteopontina): 44KDa glicoproteína (inibidor mineralização) MEPE (fosfo-glico proteína da matriz extracelular): 66KDa, glicoproteína (inibidor da mineralização)
		SLRPs (do inglês Small Leucine-Rich Proteoglycans)	Decorina (possivelmente outras SLRPs)
		Amelogenina	As formas resultam de <i>splicing</i> alternativo: <ul style="list-style-type: none"> A +4: 81Kda A -4 (LRAP): 6.9KDa
		Outras proteínas esmalte	Ameloblastina
		Proteolipídios	Fosfolípidos da matriz
	Proteínas não fosforiladas	*Osteocalcina e DPG: proteína-gla dentina (proteína carboxil rica-glutamico ácido gama)	<ul style="list-style-type: none"> 5.7KDa inibidor mineralização 14KDa não inibidor da mineralização
		Osteonectina ou proteína SPARC	43KDa
		Proteínas de origem da corrente sanguínea	* Albumina *Glicoproteína alfa ₂ -HS (encontrada só nos tecidos mineralizados) *Fetúina, envolvida na mineralização derivada corrente sanguínea (nucleador HA)
		SLRPS	PGs CS/DS: decorina, biglicano 42DKa PGs KS: lumicano, fibromodulina, osteoaderina 50KDa
		Fatores de crescimento	FGF2, TGF-beta, BMPs, ILGF I e II, PDGF
		Enzimas	Serina protéases, fosfatases ácidas e alcalinas Colagenases: MMP-1, -8, -13 Gelatinases A: MMP-2 B: MMP-9 Estromelisinina 1: MMP-3 MT1-MMP, enamelinina ou MMP-20 Trombospondina ! ADAMS e ADAMTS
		Poliaminas	Espermina, espermidina, putrescina
		Proteínas ligação ao cálcio	Calmodulina, Calbidina, anexina, nucleonidina