

La signalisation Wnt dans le cadre de la réparation dentinaire

V. NEVES, P.-T. SHARPE

Wnt signalling in dentine repair

VICTOR NEVES ET PAUL T SHARPE. Centre de Biologie Craniofaciale Régénérative. Institut Dentaire Kings College, Londres.

RÉSUMÉ

Depuis des millénaires, les matériaux synthétiques inertes biocompatibles avec l'organe dentaire sont utilisés dans le cadre des traitements bucco-dentaires. Une meilleure compréhension des moyens de mobilisation et de modulation des cellules souches au sein de la pulpe selon la restauration pourrait aider les patients à prolonger la durée de vie de leurs dents. Dans cet article, nous aborderons la logique qui sous-tend notre approche visant à comprendre et à moduler la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans le cadre de la restauration dentaire.

ABSTRACT

The use of inert synthetic materials that are biocompatible with the dental organ has been a trend in oral treatment for thousands of years. Further understanding of how to mobilise and modulate stem cells in the dental pulp according to the biology of dental repair can help patients to increase lifetime of their functional teeth. In this review we discuss the rationale behind our approach to understand and modulate the Wnt/ β -catenin pathway in dentine repair.

Demande de tirés-à-part : paul.sharpe@kcl.ac.uk

INTRODUCTION

Le traitement des lésions carieuses à l'aide d'un matériau de remplissage n'est pas nouveau : le concept remonte à la fin de l'ère Pléistocène, lorsqu'on plaçait du bitume à l'intérieur de la chambre pulpaire (Oxilla G et coll., 2017). Sous l'ère Holocène, on a retrouvé de la cire d'abeille dans les dents, placée là dans un but thérapeutique afin de soulager les douleurs dentaires (Bernardini et coll., 2012). Des milliers d'années se sont écoulés et pourtant, le traitement de référence pour soigner les caries dentaires repose toujours sur le même concept, à savoir l'utilisation de matériaux inertes (MTA, hydroxyde de calcium, ciment verre ionomère, etc.) pour remplir la cavité dentaire et protéger la pulpe (Sidhu & Nicholson 2016 ; Ha et coll., 2017 ; Kahler et coll., 2017). Bien que ces matériaux modernes soient efficaces en clinique dentaire, ils ne restaurent ni la structure normale de la dent ni sa vitalité.

De nombreuses voies jouent potentiellement un rôle actif dans la réparation dentaire après lésion, comme par exemple les voies de signalisation TGF- β , BMP, VEGF et FGF (Nakashima, et coll., 1994 ; Sloan et coll., 2001 ; Kitamura et coll., 2012 ; Zhang et coll., 2016). Plus récemment, nous avons montré que la voie Wnt/ β -caténine est un régulateur essentiel dans le processus de réparation dentaire : lorsque cette voie n'existe pas, les dents sont incapables de former la dentine réparatrice (Babb et coll., 2017). La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue également un rôle déterminant dans de nombreux processus biologiques tels que la préservation tissulaire (Logan et Nusse, 2004) et la réparation tissulaire à la suite d'une lésion (Whyte, Smith, Helms, 2012). Dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, les protéines Wnt produites par ou présentes à la surface des cellules se connectent aux récepteurs Frizzled/LRP (Fz/LRP). Si les protéines Wnt ne se lient pas à un récepteur Frizzled, la β -caténine est dégradée par un complexe composé d'Axine, d'APC et de GSK-3 β . Lorsque les protéines Wnt se couplent à leurs récepteurs, les protéines Dishevelled (Dsh) et Axine sont recrutées sur la paroi cytoplasmique de la membrane. Cette étape aboutit à une interaction entre le complexe inhibiteur et le Dsh/Axine conduisant à la stabilisation de la β -caténine qui s'accumule ensuite dans le noyau et interagit avec les facteurs de transcription TCF (Logan et Nusse, 2004).

On sait que les odontoblastes sont des cellules réactives à la Wnt au cours de l'homéostasie. Les cellules réceptrices de Wnt peuvent être identifiées comme des cellules souches pulpaires qui se transforment en cellules pseudo-odontoblastiques (« odontoblast-like ») responsables de la formation de la dentine réparatrice suite à une exposition pulpaire (Babb et coll., 2017). De plus, Babb et coll. ont montré que l'augmentation génétique de l'activité des Wnt chez des rongeurs génétiquement modifiés accroît la formation de la dentine réparatrice.

POTENTIEL DE RÉGÉNÉRATION DE LA PULPE DENTAIRE

L'organe dentaire dispose d'un potentiel de régénération limité ; bien que la pulpe dentaire soit capable de mobiliser des cellules souches mésenchymateuses pour réparer la dentine endommagée, l'étendue de cette régénération demeure restreinte. Les odontoblastes sont des cellules

INTRODUCTION

The concept of treating tooth decay with a filler is not new and dates from the late Pleistocene era, with teeth being treated with bitumen purposely placed inside the pulp chamber (Oxilla G. et al., 2017). In the Holocene era, bees wax was found in teeth as an intentional therapeutic treatment aiming to alleviate dental pain (Bernardini et al., 2012). Thousand of years have passed and the current gold standard treatment for dental cavities still follows the same concept of using inert materials (MTA, Calcium Hydroxyde, Glass Ionomer, etc.) to fill the dental cavity and protect the dental pulp (Sidhu & Nicholson 2016; Ha et al., 2017; Kahler et al., 2017). Although these modern materials work in the dental clinic, they do not restore normal tooth structure or vitality.

Many pathways are suggested to play an active role in dentine repair after damage, including TGF- β , BMP, VEGF, and FGF (Nakashima, et al., 1994; Sloan et al., 2001; Kitamura et al., 2012; Zhang et al., 2016). More recently, we have shown that the Wnt/ β -catenin pathway is a key regulator of reparative dentine formation, and in the absence of this pathway, teeth fail to form reparative dentine (Babb, et al. 2017). The Wnt/ β -catenin signalling pathway plays a key role in many biological processes including tissue maintenance (Logan and Nusse, 2004) and tissue repair post injury (Whyte, Smith, Helms, 2012). In the Wnt/ β -catenin pathway, Wnt proteins released from or presented on the cell surface bind to Frizzled/LRP (Fz/LRP) receptors. If Wnt proteins do not bind to Frizzled receptor, β -catenin is degraded by a complex composed of Axin, APC and GSK-3 β . When Wnt proteins bind to their receptors, Dishevelled (Dsh) and Axin are recruited on the cytoplasmic side of the membrane. This culminates in an interaction between the inhibitory complex and Dsh/Axin, which results in stabilisation of β -catenin that subsequently accumulates in the nucleus and interacts with TCF transcription factors (Logan and Nusse, 2004).

It is known that odontoblasts are Wnt responsive cells during homeostasis and Wnt ligand receiving cells can be identified as dental pulp stem cells that become odontoblast-like cells forming reparative dentine, following pulp exposure (Babb, et al. 2017). In addition, Babb et al. (2017) showed that genetic elevation of Wnt activity using mutant rodents result in more reparative dentine formation.

DENTAL PULP REPARATIVE CAPACITY

The dental organ has a limited reparative capacity; although the dental pulp has the capability to mobilise mesenchymal stem cells to repair damaged dentine, the extent of this repair is limited. Odontoblasts are neural crest-derived mesenchymal cells responsible for secretion

dérivées de la crête neurale responsables de la sécrétion dentinaire (Arana Chavez & Massa, 2004). Ce sont des cellules post-mitotiques et par conséquent, à moins d'avoir été endommagée à la suite d'une lésion tissulaire, une cellule odontoblaste existera tout au long de la vie fonctionnelle de la dent. La dentine tertiaire désigne le tissu régénérable sécrété soit par les odontoblastes résidents soit par de nouvelles cellules pseudo-odontoblastiques formées à partir des cellules souches mésenchymateuses de la pulpe dentaire (Vishwakarma et coll., 2015 : 410).

La dentine tertiaire peut être soit de la dentine réactionnelle soit de la dentine réparatrice, selon l'étendue de la lésion. La dentine réparatrice est une matrice extracellulaire sécrétée par de nouvelles cellules pseudo-odontoblastes lorsqu'une dent subit des stimuli graves. Quant à la dentine réactionnelle, elle est sécrétée par les odontoblastes résidents dans des cas de stimuli modérés dans le but de prévenir l'exposition pulpaire et de prolonger la durée de vie de la dent.

Grâce à nos connaissances du mode de fonctionnement de la voie de signalisation et du processus biologique des odontoblastes pendant l'homéostasie et la régénération, nous avons pu déduire que des petites molécules inhibitrices de GSK-3 (agonistes de la voie Wnt) pouvaient être utilisées pour moduler localement la voie Wnt/ β -caténine au niveau de la pulpe dentaire.

DENTINE RÉACTIONNELLE

Les lésions les plus fréquemment rencontrées en pratique dentaire sont les caries dentaires sans exposition pulpaire. Pour traiter de telles lésions, le praticien prépare la dent et place un matériau d'obturation visant à reproduire l'anatomie fonctionnelle de la dent. À l'intérieur de la pulpe, les odontoblastes résidents sécrètent de la dentine réactionnelle afin de consolider la fine couche de dentine ayant survécu à la lésion pour protéger de nouveau la pulpe dentaire (Smith et coll., 1995).

Dans le cadre de notre étude, nous recréons la lésion en perçant la cuspide centrale de la première molaire supérieure d'un rongeur afin d'exposer les tubules dentinaires tout en préservant la pulpe dentaire pour reproduire une lésion émail-dentine. La formation d'une nouvelle dentine est ainsi activée au niveau pulpaire.

On utilise dans ces cas précis des matériaux tels que les ciments verres ionomères (CVI) et l'hydroxyde de calcium qui libèrent du fluorure de calcium et le diffusent par les tubules dentinaires (Sidhu & Nicholson 2016 ; Tanomaru-Filho et coll., 2011). Les odontoblastes sont sensibles aux protéines Wnt dans l'homéostasie et la réaction est plus accentuée à la suite d'une lésion. Nous avons utilisé la capacité de diffusion des tubules dentinaires pour permettre aux petites molécules inhibitrices de GSK-3 d'atteindre les odontoblastes résidents ainsi que les cellules pulpaires (Neves et Sharpe, 2017). La réaction accrue des odontoblastes à la médication agoniste des Wnt a généré une augmentation de la dentine réactionnelle, en quantité suffisante pour permettre de restaurer la couche de dentine qui retrouve ainsi son épaisseur initiale. L'utilisation des petites molécules inhibitrices de GSK-3 pour stimuler la formation de dentine réactionnelle augmente la protection de la pulpe dentaire, allongeant la durée de vie de l'organe dentaire traité et évitant potentiellement un traitement endodontique.

of dentine (Arana Chavez & Massa, 2004). They are post-mitotic cells, therefore unless damaged as a result of tissue injury, an odontoblast will exist for the functional life of the tooth. The reparative tissue is called tertiary dentine and is secreted by either resident odontoblasts or new odontoblast-like cells formed from mesenchyme stem cells in the dental pulp (Vishwakarma et al., 2015:410).

The tertiary dentine can be either reactionary dentine or reparative dentine, depending on the extent of damage. Reparative dentine is an extracellular matrix secreted by new odontoblast-like cells when a tooth suffers severe stimuli. Whereas reactionary dentine is secreted by resident odontoblasts, in mild stimuli cases, to protect the inner pulp from exposure and prolong the life of the tooth.

Based on the knowledge of how the pathway works and the odontoblast biology during homeostasis and repair, we rationalised that small molecule GSK-3 inhibitor (Wnt agonists) could be used to modulate the Wnt/ β -catenin pathway locally in the dental pulp.

REACTIONARY DENTINE

The most common injuries seen in a dental practice are cavitated teeth without pulp exposure. For treating such conditions the dentist prepares the tooth and places a filling material to mimic the functional anatomy of the tooth. In the pulp, the resident odontoblasts secrete reactionary dentine to bulk up the thin layer of dentine left by the injury, so that the dental pulp becomes protected again (Smith et al., 1995).

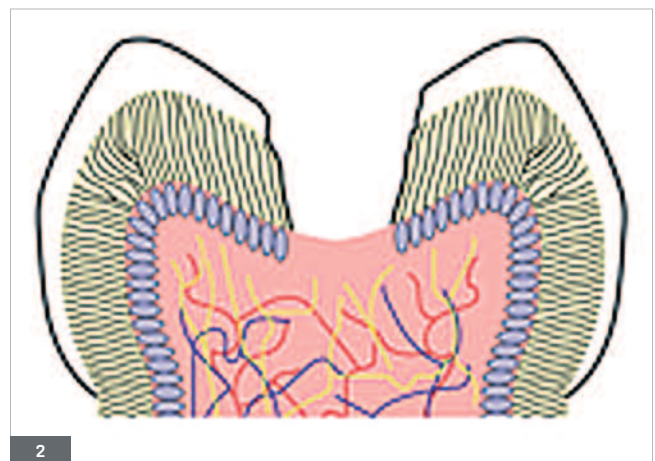
In our model, we recreate this injury by drilling off the middle cusp of the first upper molar in rodents, which exposes the dentinal tubules but not the dental pulp, in this way, we can mimic an enamel-dentine-only injury of a tooth and trigger the release of new dentine at the pulpal aspect of the tooth.

Current materials such as glass ionomer cement (GIC) and calcium hydroxide are used in these cases releasing fluoride and calcium ions through diffusion through the dentinal tubules (Sidhu & Nicholson 2016; Tanomaru-Filho et al., 2011). Odontoblasts are Wnt responsive in homeostasis and following damage there is an increased response. We used the diffusion capacity of the dentinal tubules to allow the small molecule GSK-3 inhibitor to reach the resident odontoblasts and pulp cells (Neves and Sharpe, 2017). The increased response of the odontoblasts to the Wnt agonist drugs resulted in an increase in reactionary dentine formation, sufficient to restore the dentine layer to its initial thickness. The use of small molecule GSK-3 inhibitors for reactionary dentine stimulation increases dental pulp protection, increasing the life of the dental organ treated and potentially avoiding root canal treatment.

DENTINE RÉACTIONNELLE - *REACTIONARY DENTINE*

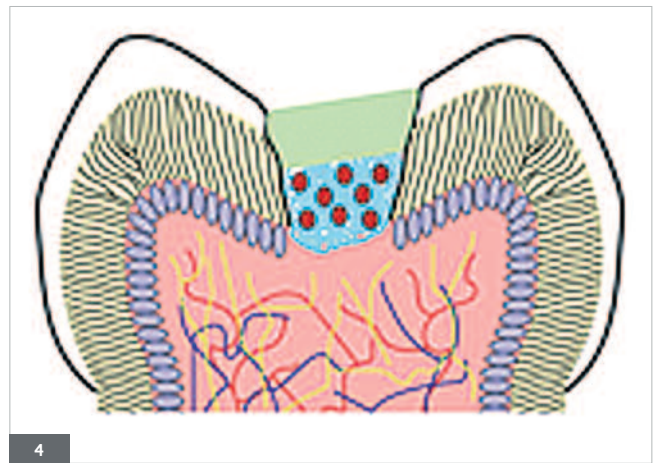


DENTINE RÉPARATRICE - *REPARATIVE DENTINE*





3



4



5

- ÉMAIL
ENAMEL
- DENTINE
DENTINE
- TUBULES DENTINAIRES
DENTINAL TUBULES
- PULPE DENTAIRE
DENTAL PULP
- ARTÈRES
ARTERIES
- VEINES
VEINS
- SYSTÈME NERVEUX
NERVOUS SYSTEM
- ODONTOBLASTES
ODONTOBLASTS
- ÉPONGE DE COLLAGÈNE AVEC INHIBITEUR DE GSK-3
COLLAGEN SPONGE WITH GSK-3 INHIBITOR
- MATÉRIAU D'OBTURATION
SEALER MATERIAL
- RÉACTION AMPLIFIÉE DES ODONTOBLASTES
INCREASED RESPONSE ODONTOBLASTS
- DENTINE RÉACTIONNELLE
REACTIONARY DENTINE
- ACTIVATION DES CELLULES SOUCHES PULPAIRES
ACTIVATED PULP STEM CELLS
- CELLULES PSEUDO-ODONTOBLASTIQUES DIFFÉRENCIÉES
DIFFERENTIATED ODONTOBLAST-LIKE CELLS
- DENTINE RÉPARATRICE
REPARATIVE DENTINE

DENTINE RÉPARATRICE

Lorsque la lésion carieuse ou le traumatisme sont trop importants, l'exposition de la pulpe dentaire entraîne la disparition des odontoblastes résidents. Dans pareils cas, le processus naturel de régénération dentaire ne suffit plus à réparer les dégâts causés par de telles blessures et la pulpe dentaire se nécrose. Afin de prévenir la perte de vitalité de l'organe dentaire, la procédure clinique actuelle consiste à appliquer une couche de ciment pour éviter l'exposition de la pulpe aux bactéries et stimuler la formation de dentine réparatrice. Bien que ces ciments soient censés favoriser la formation de dentine réparatrice, leur formulation et leur action ne tiennent pas compte de la biologie du processus de régénération du tissu pulpaire. En outre, ils restent dans la dent durant toute la durée de vie de l'organe dentaire et nécessitent la mise en œuvre d'adhésifs qui peuvent échouer.

REPARATIVE DENTINE

When tooth decay or trauma are too extensive, exposing the dental pulp causes the resident odontoblasts to die. In these cases, the natural tooth repair process is not sufficient on its own to repair the damage caused by such injury, and the dental pulp undergoes necrosis. In order to prevent the loss of vitality of the dental organ, the current clinical approach is to place a cement to protect the dental pulp from being exposed to bacteria and stimulate reparative dentine formation.

Although these cements are believed to help reparative dentine formation, their formulation and action are not based on the biology of the dental pulp reparative process. In addition, they stay in the tooth for the lifetime of the dental organ and require adhesives that can fail.

On sait que les cellules souches sont recrutées dans la pulpe dentaire pour former de nouvelles cellules « pseudo-odontoblastes » afin de sécréter la dentine réparatrice (Feng et coll. 2011 ; Kakua et coll., 2014 ; Vidovic et coll. 2017). Babb et coll. (2017) ont montré que les cellules receveuses de Wnt se transforment en cellules pseudo-odontoblastes qui contribuent à la formation de la dentine réparatrice.

Toujours dans le cadre de notre étude, nous détruisons 30 % de la masse dentinaire de la couronne et exposons entièrement la zone centrale de la pulpe dentaire (en moyenne 0,1 mm de diamètre) (Neves et coll., 2017).

Les petites molécules inhibitrices de GSK-3 sont plongées dans une éponge de collagène biodégradable placée en contact rapproché avec la pulpe dentaire exposée, recouvrant ainsi la cavité exposée. La libération rapide des agents actifs de la médication contenue dans l'éponge de collagène en direction de la pulpe dentaire stimule fortement l'activité des Wnt à l'intérieur de la pulpe dentaire après lésion, ce qui a pour conséquence de moduler les cellules souches, d'augmenter la prolifération et de favoriser la formation d'odontoblastes sur le site de la lésion. Comme nous utilisons une éponge de collagène biodégradable, les cellules prolifèrent et se différencient sur toute l'étendue de la lésion, générant du même coup la formation de dentine réparatrice sur toute l'étendue de la lésion. Reposant sur la régénération naturelle de la pulpe dentaire, cette méthode aboutit à la formation d'une paroi dentinaire naturelle qui empêche la pulpe de se nécroser.

LES MATÉRIAUX DENTAIRES DU FUTUR

Selon les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé, quasiment 100 % de la population adulte européenne souffre de caries au cours de son existence (OMS, 2016). Il est donc indispensable de traiter les lésions carieuses, c'est une évidence, et les thérapies visant à reproduire les mécanismes biologiques de la régénération dentaire présentent un intérêt certain.

Récemment, Biodentine® est apparu sur le marché en mettant en avant sa capacité à stimuler le TGF- β dans les cellules de la pulpe dentaire (Laurent et coll., 2012). Neves et Sharpe (2017) ont démontré que le TGF- β et le BMP n'étaient pas nécessaires à la formation de la dentine réparatrice mais qu'ils étaient indispensables au bon fonctionnement de la matrice sécrétée par les odontoblastes. Il est clair qu'il nous faut encore approfondir nos connaissances sur les mécanismes d'activation de la régénération dentinaire si l'on veut mettre au point d'autres options thérapeutiques.

Exactement comme pour le développement dentaire, la régénération dentaire se produit grâce à une symphonie des voies de signalisation interagissant tout au long du processus de régénération (Balci et Thesleff, 2015). La voie initiale conduisant à la régénération est celle de la Wnt/ β -caténine (Babb et coll. 2017) et par conséquent, lorsque celle-ci connaît un dysfonctionnement, la régénération dentinaire est à son tour affectée. La compréhension de la biologie de la pulpe dentaire nous a conduits à utiliser des activateurs de cette voie indispensable à la formation de la dentine réactionnelle et réparatrice, débouchant sur un processus de régénération naturelle (Neves et coll., 2017 ; Neves et Sharpe, 2017).

It is established that stem cells are recruited from the dental pulp to form new odontoblast-like cells to secrete reparative dentine (Feng, et al. 2011; Kakua et al., 2014; Vidovic et al. 2017). Babb et al. (2017) showed that Wnt-receiving cells become odontoblast-like cells that participate in the reparative dentine formation.

In our model we damage 30% of the crown dentinal bulk and expose completely the middle horn of the dental pulp (average 0.1mm in diameter)(Neves et al. 2017).

Small molecule GSK-3 inhibitors are soaked in a biodegradable collagen sponge that is placed in deep contact with the exposed dental pulp, therefore covering the exposed cavity and its exposure to the outer environment. The rapid release of the drug from the collagen sponge into the dental pulp overstimulates Wnt activity in the dental pulp after injury; resulting in modulation of stem cells, increase in proliferation, and odontoblast formation at the injury site. Since we use a biodegradable collagen sponge, cells proliferate and differentiate at the whole extent of the injury site resulting in formation of reparative dentine through the whole extent of the damage. This method, based on the natural repair of the dental pulp, results in a wall of natural dentine, which protects the inner pulp from undergoing necrosis.

FUTURE MATERIALS FOR USE IN DENTISTRY

The World Health Organisation statistics show that nearly 100% of the European adult population have experienced dental caries in their lives (WHO, 2016). The need for treatment of decayed teeth is evident and therapies that mimic the biology of dental repair are of considerable interest.

Recently, Biodentine® was released on the market with the claim of stimulating TGF- β in dental pulp cells (Laurent et al., 2012). Neves and Sharpe (2017) showed that TGF- β and BMP are not required for dentine repair formation but for organisation of the matrix secreted by the odontoblasts.

It is evident that further understanding of what triggers dentine repair has to be gained, so further therapies can be developed.

As in tooth development, dental repair works through a symphony of pathways interplaying their roles throughout the reparative process (Balci and Thesleff, 2015).

The initial pathway that leads to repair is the Wnt/ β -catenin pathway (Babb, et al. 2017), therefore, once this pathway is disrupted, reparative dentine is impaired. Understanding the biology of the dental pulp led us to use activators of this key pathway in reparative and reactionary dentine formation, which rendered a natural reparative process (Neves et al. 2017, Neves and Sharpe, 2017).

Ces découvertes sont essentielles pour envisager une transition vers le concept de dentisterie translationnelle. En effet, elles montrent que l'association (facile et peu cher) d'une éponge de collagène avec une médication est capable de moduler la régénération dentaire en se basant entièrement sur la compréhension de la biologie du processus régénératif.

CONCLUSION

L'utilisation de petites molécules inhibitrices de GSK-3 associées aux éponges biodégradables est une méthode efficace et peu coûteuse permettant d'envisager la mise en œuvre d'une thérapie novatrice.

These findings are fundamental for a transition of concept for translational dentistry since this show that a simple and cost effective combination of drug and collagen sponge can modulate tooth repair fully based on the understanding of the reparative process biology.

CONCLUSION

The use of GSK-3 inhibitor small molecules in association with biodegradable sponges is a viable and cost effect method for a novel dental therapy.

Traduction : Marie Chabin

BIBLIOGRAPHIE

- ARANA-CHAVEZ V.E. & MASSA L.F. (2004). – Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol.* Aug;36(8):1367-73.
- BABB R., CHANDRASEKARAN D., NEVES V.C.M., SHARPE P.T. 2017. – Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/ β -catenin signaling in response to tooth damage. *Sci Rep.* 7: 3102.
- BALIC A., THESLEFF I. (2015). – Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Curr Top Dev Biol.* 115:157-86. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.006.
- BERNARDINI F., TUNIZ C., COPPA A., MANCINI L., DREOSSI D., EICHERT D., ET AL. (2012). – Beeswax as dental filling on a neolithic human tooth. *PLoS One.* 7(9):e44904. doi: 10.1371/journal.pone.0044904.
- FENG J., MANTESSO A., DE BARI C., NISHIYAMA A. & SHARP, P.T. (2011). – Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 6503–8.
- HA W.N., NICHOLSON T., KAHLER B., WALSH L.J. (2017). – Mineral Trioxide Aggregate-A Review of Properties and Testing Methodologies. *Materials* (Basel). Nov 2:10(11). pii: E1261. doi: 10.3390/ma10111261.
- KAHLER B., CHUGAL N., LIN L.M. (2017). – Alkaline Materials and Regenerative Endodontics: A Review. *Materials* (Basel), Dec 5:10(12). pii: E1389. doi: 10.3390/ma10121389.
- KAUKUA N. ET AL (2014). – Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature* 255, 551–4 (2014).
- KITAMURA C., NISHIHARA T., TERASHITA M., TABATA Y., WASHIO A. (2012). – Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of fgf-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. *Int J Dent.* 2012:190561. doi: 10.1155/2012/190561.
- LAURENT P., CAMPS J., ABOUT I. (2012). – Biodentine (TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* 45(5):439–48.
- LOGAN C.Y., NUSSE R. (2004). – The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:781-810.
- NAKASHIMA M., NAGASAWA H., YAMADA Y., REDDI A.H. 1994. – Regulatory role of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol.* 162(1):18–28.
- NEVES V.C.M., BABB R., CHANDRASEKARAN D., SHARPE P.T. 2017. – Promotion of natural tooth repair by small molecules GSK3 antagonist. *Sci Rep.* 7:39654.
- NEVES V.C.M., SHARPE P.T. (2017). – Regulation of Reactionary Dentine Formation. *J Dent Res.* Nov 1:220345 17743431. doi: 10.1177/0022034517743431.
- OXILIA G., FIORILLO F., BOSCHIN F., BOARETTO E., APICELLA S.A., MATTEUCCI C., ET AL., (2017). – The dawn of dentistry in the late upper Paleolithic: An early case of pathological intervention at Riparo Fredian. *Am J Phys Anthropol.* Jul;163(3):446–461. doi: 10.1002/ajpa.23216.
- SIDHU S.K., NICHOLSON J.W. (2016). – A Review of Glass-Ionomer Cements for Clinical Dentistry. *J Funct Biomater.* 2016 Jun 28;7(3). pii: E16. doi: 10.3390/jfb7030016.
- SLOAN A.J., COUBLE M.L., BLEICHER F., MAGLOIRE H., SMITH A.J., FARGES J.C. 2001. – Expression of TGF- β receptors I and II in the human dental pulp by in situ hybridization. *Adv Dent Res.* 15:63–67.
- SMITH A.J., CASSIDY N., PERRY H., BÈGUE-KIRN C., RUCH J.V., LESOT H. (1995). – Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* Feb;39(1):273–80.
- TANOMARU-FILHO M., SAÇAKI J.N., FALEIROS F.B.C., AND GUERREIRO-TANOMARU J.M. (2011). – pH and calcium ion release evaluation of pure and calcium hydroxide-containing Epiphany for use in retrograde filling. *J Appl Oral Sci.* Jan-Feb; 19(1): 1–5. doi: 10.1590/S1678-77572011000100002
- VIDOVIC I., BANERJEE A., FATAHI R., MATTHEWS B.G., DYMENT N.A., KALAJZIC I., MINA M. (2017). – α SMA-Expressing Perivascular Cells Represent Dental Pulp Progenitors In Vivo. *J Dent Res.* Mar;96(3):323–330. doi:10.1177/0022034516678 208.
- VISHWAKARMA A., SHARPE P., SHI S., RAMALINGAM M. (2015). – Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dentistry. Elsevier, p. 410.
- ZHANG J., LIU X., YU W., ZHANG Y., SHI C., NI S., ET AL., (2016). – Effects of human vascular endothelial growth factor on reparative dentin formation. *Mol Med Rep.* Jan;13(1):705–12. doi: 10.3892/mmr.2015.4608.
- WORLD HEALTH ORGANISATION. 2016. ACCESSED 26 FEBRUARY 2018. – <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/oral-health/data-and-statistics>