

*Aktuelne teme/
Current topics*

PRIMENA SKAFOLDA U STOMATOLOGIJI
APPLICATION OF SCAFFOLDS IN
DENTISTRY

Dragica Bulajić¹, Jovana Drljača¹, Aleksandra Rakovac²,
Dejan Miljković³, Ivan Čapo³, Slobodan Sekulić⁴,
Branislav Bajkin⁵

Correspondence to:

dr **Dragica Bulajić**

Univerzitet u Novom Sadu/Medicinski
fakultet
Hajduk Veljkova 3, 21000 Novi Sad
Kontakt telefon: 064/ 3810866
E-mail: dragica.bulajic@uns.ac.rs

¹ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet

² Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za fiziologiju,

³ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Katedra za histologiju
i embriologiju,

⁴ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Klinika za
neurologiju, Klinički centar Vojvodine

⁵ Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Klinika za
stomatologiju Vojvodine

Ključne reči

skafoldi, tkivno inženjerstvo, polimeri,
kompoziti, koštana regeneracija

Key words

scaffolds, tissue engineering, polymers,
composites, bone regeneration

Sažetak

Materijali u tkivnom inženjerstvu imaju dugu istoriju. Tradicionalno su za nadomešćavanje kosti korišćeni autogeni, alogeni, ksenogeni i aloplastični materijali. Međutim, napreci u kliničkoj praksi su napravljeni, i to kao rezultat poboljšanja već postojećih materijala. Tkivno inženjerstvo podrazumeva zasejavanje ćelija na skafolde, i nakon kultivacije *in vitro*, implantaciju u telo kao zamenu za nedostajće tkivo. Nakon toga nastupa proces regeneracije tkiva. Skafold omogućava ram i incijalnu podršku ćelijama da se pričvrste, proliferišu, diferentuju i stvore ekstracelularni matriks. Veoma je poželjno da skafold imitira strukturu i svojstva humanog tkiva, kako bi se proces regeneracije i resorpcije odvijao sinhrono. Mnogo je faktora koji definišu dobar skafold, a neki od njih su poroznost, karakteristike površine, mehaničke osobine, mogućnost inkorporacije ćelija i bioaktivnih molekula. U ovom radu, navedeni su skafoldi dostupni u kliničkom radu, istaknute su njihove prednosti i mane koje u budućnosti moraju da se poboljšaju.

Milioni pacijenata širom sveta pate od oboljenja kostiju ili koštanih defekata kao što su osteosarkom, osteoporoza i frakture kostiju (1). U cilju rešavanja problema izgubljenog koštanog tkiva, glavni akcenat se stavlja na tkivnu regeneraciju a ne na zamenu tkiva (2). Ključnu ulogu u procesu regeneracije koštanog tkiva zauzimaju skafoldi, materijali koji služe kao podloga za formiranje koštane ekstracelularne matrice, u cilju obezbeđivanja strukturne podrške novoformiranom tkivu. Jedna od najčešćih metoda korišćenih u tkivnom inženjerstvu podrazumeva izolaciju specifičnih ćelija iz pacijenta i njihovo uzgajanje na trodimenzionalnom skafoldu u kontrolisanim uslovima. Nakon toga, formirani skafold se ugrađuje na željeno mesto u telo pacijenta u cilju formiranja novog tkiva, unutar skafolda, koji se degradira tokom određenog vremena (3-5). Drugi, alternativni pristup podrazumeva direktnu ugradnju samog skafolda, bez ćelija, *in vivo*, kako bi se stimulisalo direktno formiranje tkiva *in situ*(4-6).

Osobine skafolda

Primarna osobina koju skafold mora da poseduje je biokompatibilnost. Biokompatibilnost skafolda se opisuje kao mogućnost da ne ometa normalne celularne aktivnosti, uključujući i molekularne signale, i da ne vrši lokalni ili sistemski toksični efekat na tkivo domaćina (7). Idealan skafold mora biti osteokonduktivan, čime se dozvoljava koštanim ćelijama da adheriraju, proliferiraju i formiraju ekstracelularni matriks na površini i u porama skafolda. Osobinom osteoinduktivnosti skafold mora da indukuje stvaranje nove kosti biomolekularnim signalima i regrutovanjem okolnih koštanih ćelija. Nadalje, idealni skafold mora omogućavati formiranje krvne sudove, u ili oko njega, u periodu od par nedelja od implantacije, kako bi se obavljala ishrana i oksigenacija (8).

Mehaničke osobine koje treba da poseduje idealni skafold treba da se podudaraju sa osobinama recipijentnog mesta domaćina. Neophodna osobina skafolda je poroznost, gde veličina pora mora iznositi najmanje 100 μm u

dijametri, kako bi se difuzija esencijalnih nutrijenata i oksigenacija uspešno obavljala ⁽⁹⁾. Međutim, nađeno je da je optimalna veličina pora potrebna za koštani rast 200-350 µm ⁽¹⁰⁾. Neke studije pokazuju da se različite veličine pora u skafoldu (kombinacija mikro i makro pora) ponašaju bolje nego kada skafold u građi ima samo makro pore ⁽¹¹⁾. Nažalost, poroznost smanjuje mehaničke osobine skafolda.

Krucijalna osobina skafolda u koštanoj regeneraciji je resorptivnost ⁽⁷⁾. Skafold sa jedne strane treba da ima slične mehaničke karakteristike kao tkivo domaćin, a sa druge treba da bude razgradiv tokom vremena u *in vivo* uslovima. Poželjna osobina je da ima kontrolisanu stopu resorptivnosti, tako da smanjujući se, stvara mesta za novo koštano tkivo koje raste. Vreme degradacije skafolda varira, ali prosečno iznosi 3-6 meseci za skafolde u kranio-maksilofacijalnim defektima ⁽¹²⁾.

Vrste skafolda za koštanu regeneraciju u stomatologiji

Tri osnovne grupe biomaterijala se koriste kao ćelijski nosači u koštano-tkivnom inženjerstvu. To su: bioaktivni neorganski materijali (bioaktivna keramika, bioaktivno staklo), biološki ili sintetski polimeri, i kompoziti ovih materijala ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Svi ovi materijali bi trebalo da budu osteoinduktivni (sposobni da iniciraju diferencijaciju progenitornih ćelija u osteoblaste), osteokonduktivni (da podržavaju koštani rast i omogućavaju urastanje okolne kosti) i sposobni za osteointegraciju (da se integrišu u koštani defect) ⁽¹⁶⁾.

Bioaktivni neorganski materijali

Postoji širok spektar bioaktivnih neorganskih materijala koji su slični po sastavu mineralnoj fazi kosti. Oni koji su od kliničkog značaja su npr. trikalcijum-fosfat (TCP), hidroksiapatit (HA), bioaktivno staklo i njihove kombinacije ⁽¹³⁾. Ovi materijali imaju odličnu biokompatibilnost sa koštanim tkivom, visoku osteokonduktivnost i bioaktivnost uprkos njihovoj sporij brzini degradacije, slabijim mehaničkim potencijalom od kosti i nemogućnosti indukovanja ćelija ugrađenih u skafold da se diferenciraju ka osteoblastima. Oni nemaju citotoksično dejstvo i mogu biti proizvedeni u vidu porozne pene koja se koristi za nadohnadu kosti ili kao skafold. Međutim, njihova upotreba je limitirana zbog njihove krhke prirode i poteškoća u proizvodnji visoko poroznih struktura, koje imaju istu veličinu pora na svim presecima ⁽¹⁷⁾. Da bi se prevazišli ovi nedostaci, HA i TCP se kombinuju sa polimerima kao što su poli-L-laktička kiselina (PLLA), polilaktička kiselina (PLA) i kompozit da bi se napravili kompozitni skafoldi. Na ove materijale kost reaguje odličnom osteoklastičnom resorpcijom sa jedne strane i koštanim formiranjem sa druge strane, što je veoma slično reakciji pri transplantaciji autogene kosti ⁽¹⁵⁾.

b) Biološki i sintetički polimeri

Kolagen je protein koji je glavna komponenta ekstracelularnog matriksa. Postoji dvadeset pet tipova kolagena, koji se razlikuju u hemijskom sastavu i molekularnoj strukturi. Pored svih njih, kolagen tipa I nudi pogodnu sredinu za indukovanje osteoblastične diferencijacije *in vitro* i osteogeneze *in vivo*. Kao prirodni polimer, kolagen tipa I je korišten za aplikaciju u tkivnom inženjerstvu, posebno za

reparaciju mekih tkiva, kao što je koža ⁽¹⁸⁾. Postoji zabrinutost zbog antigenosti i imunogenosti kolagena, kao i zbog potencijalne patogene transmisije, imunih reakcija, slabih mehaničkih osobine i nekontrolisane razgradivosti ⁽¹⁹⁾.

Želatin je prirodni biopolimer koji se takođe koristi u tkivnom inženjerstvu. Želatinske skafolde je moguće modifikovati dodavanjem poli-L-lizina (PLL) i minerala. *Fu* i *sar*.⁽²⁰⁾ su pokazali značajno formiranje mineralnih depozita na mestu apikacije ćelija sa kolagenim skafoldom obogaćenim PLL i CaCl₂. Skafold uronjen samo u PLL nije pokazao znake mineralizacije u *in vivo* modelu, dok je skafold sa ćelijama u kombinaciji sa CaCl₂ i PLL+CaCl₂ značajno mineralizovao subkutano tkivo gde je bio transplantiran.

Sintetički biopolimeri, kao materijali za skafolde, imaju prednosti u odnosu na prirodne materijale, zato što mogu biti napravljeni tako da daju širok opseg osobina koje su poželjne. Najviše istraživanja je usmereno ka sintetičkim biorazgradivim polimerima koji su već odobreni od strane Američke administracije za hranu i lekove (FDA). To su: polilaktička kiselina (PLA), poliglikolna kiselina (PGA), polikarbonati, poliortoestri, polifumarati ⁽²¹⁾.

Sintetički polimeri (PLA, PGA, PLLA, PLGA-polilaktička-ko-glikolna kiselina itd.) podležu razgradnji odmah nakon implantacije u ljudsko telo. Smanjenje molekularne težine je prisutno vrlo brzo nakon postavljanja u vlažno područje. Međutim, smanjenje mase skafolda ne počinje sve dok se molekularni lanci ne smanje do veličine koja im dozvoljava da difunduju slobodno van polimernog matriksa. Gubitak mase je praćen oslobađanjem kiselih bioprodukata. Ako je kapacitet eliminacije okolnog tkiva nizak, zbog slabije vaskularizacije ili niske metaboličke aktivnosti, masivno oslobađanje kiselih produkata može voditi ka priveremenim lokalnim poremećajima ili rezultatima inflamatornom reakcijom ⁽²²⁻²⁴⁾. Da bi se ograničili ovi neželjeni efekti važno je da konstrukcija skafold/ćelije bude izložena sve vreme neutralnom pH, pogotovo tokom perioda kada se javlja veliki gubitak mase ⁽²⁴⁾.

Uobičajeni način za zaobilazanje lokalne inflamacije je da se u sintetički biopolimerni matriks inkorporira keramika kao što je TCP ili HA, kako bi se dobio kompozitni skafold. Pored prednosti zbog poboljšane biokompatibilnosti, osnovni resorpcioni proizvodi hidroksiapatita i trikalcijum fostata neutrališu kisele resorpcione bioprodukte sintetičkih polimera, i pomažu da se izbegne neželjena kiselina sredina ⁽²⁵⁾.

c) Kompozitni skafoldi

Poslednjih godina su sve više prisutni skafoldi kompozitnog porekla. Na taj način se objedinjuju prednosti jednog ili više tipova materijala, i samim tim se dobija bolji odgovor okolnog tkiva na mestu primene skafolda. Naprimera, kalcijum fostatni polimerni skafold ima prednosti oba materijala. Polimer povećava čvrstinu i jačinu pritiska slično prirodnoj kosti, dok se dodavanjem kalcijum fostata postiže mehanički integritet i bioaktivnost polimera ⁽²⁶⁾.

Spoj matičnih ćelija sa skafoldom ima esencijalnu ulogu u stvaranju novog tkiva putem tkivnog inženjeringa. Skafold u tom spoju obezbeđuje mehaničku stabilnost i trodimenzionalni temelj za stvaranje novog tkiva, dok su ćelije zadužene za stvaranje ekstracelularnog matriksa ^(27, 28).

Rezultati dosadašnjih istraživanja

Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da su najviše proučavani skafoldi kolageni suđeri ili kolagene membrane (29-36) i granulirani HA/TCP ili keramički HA/TCP (1, 37-46).

Miura i sar.⁽¹⁾ su sproveli istraživanje na imunokompromitovanim miševima, implantirajući HA/TCP keramički skafold sa matičnim ćelijama zubne pulpe mlečnog zuba u kranijalni defekt, na period od osam nedelja. Iako matične ćelije nisu bile sposobne da se direktno diferenciraju u osteoblaste, one su indukovale okolne ćelije organizma u osteoblaste i osteocite. Transplantacija je kod 40 posto animalnih modela izazvala značajno koštano formiranje, dok je kod preostalih 60 posto miševa koštano formiranje bilo limitirano.

U studiji koju su sproveli Kang i sar.⁽⁴⁵⁾ poređen je potencijal HA-TCP skafolda sa granulama demineralizovanog dentinskog grafta (DDM). Skafoldi sa matičnim ćelijama zubne pulpe su transplantirani u imunokompromitovane miševе, a kontrolnu grupu su činili skafoldi bez ćelija. PCR analiza je pokazala veću ekspresiju kasnih osteogenih markera (kao što su osteonektin i osteokalcin) u DDM granulama, dok je u HA-TCP skafoldu bila veća ekspresija ranih osteogenih markera (kao što su osteopontin i koštani sijalofosfoprotein). Bez obzira na njihove razlike, oba materijala su pokazala odličan osteokonduktivni potencijal, bez značajne razlike u depozitima kalcijuma ili osteogenezi nakon osam nedelja od transplantacije.

Rađena su istraživanja i na ljudima, gde su u postekstrakcionu ranu trećih molara postavljeni kolageni suđeri sa matičnim ćelijama zubne pulpe stalnih zuba. Nakon tri meseca od implantacije formirano tkivo je pokazalo histološke karakteristike kosti, lamelarnu strukturu okruženu Haverzijanovim kanalima i pozitivnost na imunohistohemijske koštane markere-BMP2, VEGF, osteopontin, osteokalcin i osteonektin (30).

Sva *in vivo* istraživanja ukazuju na to postoji formiranje lamelarne kosti sa osteoblastima na površini biomaterijala, ali da je mineralizacija tkiva značajno veća kada su matične ćelije u asocijaciji sa skafoldima implantirane u defekt (32, 40, 41, 43).

Istraživači su stalno u potrazi za pomoćnim supstancama, koje će ubrzati stvaranje tkiva u koštanim defek-

tima. Rezultati istraživanja koje su sproveli Yuan i sar.⁽⁴⁷⁾ ukazuju da aspirin u koncentraciji od ≤ 100 $\mu\text{g/ml}$, u kombinaciji sa stem ćelijama zubne pulpe na Bio-Oss (Geistlich Pharma, Wolhusen, Switzerland) česticama znatno ubrzava mineralizaciju tkiva u kalvarijalnim defektima pacova. U netretiranim defektima je postojalo minimalno stvaranje nove kosti na rubovima defekta, dok je sam defekt bio ispunjen mekim fibroznom tkivom. U grupi tretiranoj skafoldom, ćelijama i aspirinom bilo je evidentirano statistički značajnije stvaranje koštanog tkiva na dnu defekta, u odnosu na grupu gde je postavljen samo skafold sa ćelijama.

Kao dobar parameter za praćenje stvaranja koštanog tkiva koristi se nivo alkaline fosfataze (ALP) u serumu. Grupa istraživača iz Inodnežije implantrala je ćelije pulpe porekla humanog trećeg molara u koštani defekt femura novozelandskih zečeva. Evaluacija rezultata je pokazala histološki značajno stvaranje koštanog tkiva u modelu sa stem ćelijama, koje je koreliralo sa povšenim serumskim nivoima ALP-a (48).

Skafoldi, kao nosači, ne moraju nositi samo osteoprogenitorne ćelije. Rađena je studija gde su kolageni nosači sa neuroektodermalno diferenciranim ćelijama zubne pulpe implantirani u hiruški napravljen defekt bedrenog živca pacova. Rezultati su pokazali značajan funkcionalni oporavak hoda životinja kod kojih je ugrađen implantat sa ćelijama, u odnosu na one gde je ugrađen sam skafold, odnosno na one gde je defekt ostavljen prazan (49).

ZAKLJUČAK

Širok spektar biokompatibilnih materijala (biokeramika, sintetički i prirodni biopolimeri) je dostupan za tkivno inženjerstvo. Svaka grupa materijala poseduje svoje prednosti i mane. Pregledom literature može se zaključiti da je u novijim istraživanjima manji naglasak na pronalasku novih materijala, već je akcenat na kombinaciji postojećih. Odabir materijala zavisi od specifičnih zahteva koji su diktirani mestom aplikacije skafolda.

Zahvalnica

Ovaj tekst je proistekao iz rada u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja (rešenje broj 175006).

Abstract

Materials in tissue engineering have a long history. Traditionally, autogenic, allogenic, xenogenic and alloplastic materials have been used to replace bone defects, but advances in clinical practice have been made, as a result of the improvement of already existing materials. Tissue engineering is actually planting cells on scaffolds, and after cultivation in vitro, implantation into the body as a substitute for the missing tissue. After that, the tissue regeneration process occurs. Scaffolds allow the frame and initial support for cells to attach, proliferate, deferent, and create an extracellular matrix. It is highly desirable for scaffold to imitate the structure and properties of human tissue, because process of regeneration and resorption process should be synchronously. There are many factors that define a good scaffold, like porosity, surface characteristics, mechanical properties, the ability to incorporate cells and bioactive molecules. The mentioned scaffolds are available in clinic work, and their advantages and disadvantages are highlight in this paper. All disadvantages need to be improved in the future.

LITERATURA

1. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 May 13;100(10):5807-12.
2. Miao X, Tan DM, Li J, Xiao Y, Crawford R. Mechanical and biological properties of hydroxyapatite/tricalcium phosphate scaffolds coated with poly(lactic-coglycolic acid). *Acta Biomater.* 2008 May;4(3):638-45.
3. Williams D. Benefit and risk in tissue engineering. *Mater Today.* 2004 May;7:24-9.
4. Mano J.F, Sousa R.A, Boesel L.F, Neves N.M, Reis R.L. Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. *Compos Sci Technol.* 2004 May;64:789-817.
5. Drotleff S, Lungwitz U, Breunig M, Dennis A, Blunk T, Tessmar J. Biomimetic polymers in pharmaceutical and biomedical sciences. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004 September;58:385–407.
6. Suchanek W, Yoshimura M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J Mater Res.* 1998 January;13:94–117.
7. Williams, D.F. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials.* 2008 July;29(20):2941–2953
8. Olszta M.J, Cheng X, SooJee S, Kumar R, Kim Y.Y, Kaufman M.J, Douglas E.P, Gower L.B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R:Rep.* 2007 November; 58:77–116
9. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol.* 2008 August; 26(8): 434–441.
10. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010 January; 31(3):461–466.
11. Woodard JR, Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JAC, Clark SG, Wheeler MB, Jamison RD, Wagoner Johnson AJ. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007 January; 28(1):45–54.
12. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischeret H. Scaffolds for bone healing: concepts, materials and evidence. *Injury.* 2011 June; 42(6):569–573.
13. Hench LL, Polak JM. Third-Generation Biomedical Materials. *Science.* 2002 February; 295(5557): 1014-17.
14. Kretlow JD, Mikos AG. Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Eng.* 2007 May; 13(5):927-944.
15. Liu CZ, Czernuszka JT. Development of biodegradable scaffolds for tissue engineering: a perspective on emerging technology. *Mater. Sci. Technol.* 2007; 23(4): 379-391.
16. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today.* 2008 May;11(5):18-25.
17. Liu DM. Fabrication of hydroxyapatite ceramic with controlled porosity. *J Mater Sci Mater Med.* 1997 April; 8(4): 227–232.
18. Kose GT, Korkusuz F, Ozkul A, Soysal Y, Ozdemir T, Yildiz C, Hasirci V. Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biomaterials.* 2005 September; 26(25):5187–5197.
19. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials.* 2004 July; 25(15): 2997–3004.
20. Fu Q, Ren H, Zheng C, Zhuang C, Wu T, Qin J, Wang Z, Chen Y, Qi N. Improved osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in a layer-by-layer-modified gelatin scaffold. *Journal of Biomaterials Applications.* 2018 September; 33(4):477-487.
21. Vail NK, Swain LD, Fox WC, Aufdemorte TB, Lee G, Barlow JW. Materials for biomedical applications. *Mater Des.* 1999 June; 20(2-3): 123–132.
22. Peter SJ, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG. Polymer concepts in tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 1998; 43(4): 422–427.
23. Anderson JM. Biological Responses to Materials. *Ann Rev Mater Res.* 2001;31:81–110.
24. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials.* 2000; 21: 2529–2543.
25. Kempen DHR, Lu L, Kim C, Zhu X, Dhert WJA, Currier BL, Yaszemski MJ. Controlled drug release from a novel injectable biodegradable microsphere/scaffold composite based on poly(propylene fumarate). *J Biomed Mater Res.* 2006 January; 77A(1):103–111.
26. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in biotechnology.* 2012 October;30(10):546-54.
27. Sittisak H, Vinai P. Tissue engineering for bone regeneration: stem cells and growth factors in biomaterial scaffolds. *Asian Biomedicine.* 2007 October 2007;1(3):229-38.
28. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cellbased tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Jul;86-A(7):1541-58.
29. De Mendonça Costa A, Bueno DF, Martins MT, Kerkis I, Kerkis A, Fanganiello RD, Cerruti H, Alonso N, Passos-Bueno MR. Reconstruction of large cranial defects in non-immunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg.* 2008 January; 19(1): 204–210.
30. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, Desiderio V, Laino G, Papaccio G. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge bio-complexes. *Eur Cell Mater.* 2009; 18(7): 75–83.
31. Pisciotta A, Riccio M, Carnevale G, Beretti F, Affiliation Department of Surgical, Medical, Dental and Morphological Sciences with interest in Transplant, Oncology and Regenerative Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy Gibellini L, Maraldi T, Cavallini GM, Ferrari A, Bruzzesi G, De Pol A. Human serum promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE.* 2012 November; 7(11): e50542.
32. Maraldi T, Riccio M, Pisciotta A, Zavatti M, Carnevale G, Beretti F, La Sala GB, Motta A, De Pol A. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. *Stem Cell Res Ther.* 2013 May; 4(3): 53.

33. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, d'Aquino R, Tirino V, Papaccio G. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cell Transl Med.* 2013 March; 2(4): 316–324.
34. Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, Saghafi S, Ali Raisolsadat M. Success of maxillary alveolar defect repair in rats using osteoblast-differentiated human deciduous dental pulp stem cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016 April; 74(4): 829.e1–9.
35. Monti M, Graziano A, Rizzo S, Perotti C, Del Fante C, d'Aquino R, Redi CA, Baena RR. In vitro and in vivo differentiation of progenitor stem cells obtained after mechanical digestion of human dental pulp. *J Cell Physiol.* 2017 June; 232(3): 548–555.
36. Behnia A, Haghighat A, Talebi A, Nourbakhsh N, Heidari F. Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. *World J Stem Cell.* 2014 September; 6(4): 505–510.
37. Otaki S, Ueshima S, Shiraishi K, Sugiyama K, Hamada S, Yorimoto M, Matsuo O. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. *Cell Biol Int.* 2007 January; 31(10): 1191–1197.
38. Zhang W, Walboomers XF, Van Osch GJ, Van den Dolder J, Jansen JA. Hard tissue formation in a porous HA/TCP ceramic scaffold loaded with stromal cells derived from dental pulp and bone marrow. *Tissue Eng Part A.* 2008 February; 14(2): 285–294.
39. Kraft DC, Bindslev DA, Melsen B, Abdallah BM, Kassem M, Klein-Nulend J. Mechanosensitivity of dental pulp stem cells is related to their osteogenic maturity. *Eur J Oral Sci.* 2010 February; 118(1): 29–38.
40. Chen B, Sun HH, Wang HG, Kong H, Chen FM, Yuet Q. The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars. *Biomaterials.* 2012 July; 33(20): 5023–35.
41. Asutay F, Polat S, Gül M, Subaşı C, Kahraman SA, Karaöz E. The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography and histomorphometric analysis. *Arch Oral Biol.* 2015 December; 60(12): 1729–1735.
42. Cao Y, Liu Z, Xie Y, Hu J, Wang H, Fan Z, Zhang C, Wang J, Wu CT, Wang S. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. *Stem Cell Res Ther.* 2015 August; 6(1): 249.
43. Qian J, Jiayuan W, Wenkai J, Peina W, Ansheng Z, Shukai S, Shafei Z, Jun L, Longxing N. Basic fibroblastic growth factor affects the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in a treatment-dependent manner. *Int Endod J.* 2015 August; 48(7): 690–700.
44. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, Kukita T, Nonaka T, Shi S, Yamaza T. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PLoS ONE* 2012 December; 7(12): e51777.
45. Kang KJ, Lee MS, Moon CW, Lee JH, Yang HS, Yang YJ. In vitro and in vivo dentinogenic efficacy of human dental pulp-derived cells induced by demineralized dentin matrix and HA-TCP. *Stem Cell Int.* 2017; 2017: 2416254.
46. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuir T, Akiyama K, Lee JS, Shi S. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Dis.* 2008 June; 14(5): 428–434.
47. Yuan M, Zhan Y, Hu W, Li Y, Xie X, Miao N, Jin H, Zhang B. Aspirin promotes osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *International Journal of Molecular Medicine.* 2018 October; 42(4): 1967–1976.
48. Bachtiar EW, Fatma D, Yusuf AA, Ulfiana R. Transplantation of Dental Pulp Stem Cells in Experimental Bone Defect. *Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering.* 2017; 34: 94–100.
49. Carnevale G, Pisciotta A, Riccio M, Bertoni L, De Biasi S, Gibellini L, Zordani A, Cavallini GM, La Sala GB, Bruzzesi G, Ferrari A, Cossarizza A, de Pol A. Human dental pulp stem cells expressing STRO-1, c-kit and CD34 markers in peripheral nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018 February; 12(2): 774–785.