

**Autores. Título. ISBN, DOI e pág a definir pela organização.**

## **VIAS DE BIOMINERALIZAÇÃO DO COMPLEXO AMELODENTINÁRIO: ESTRATÉGIAS E PERSPECTIVAS DA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Marvin do Nascimento, [mvnascimento@ime.eb.br](mailto:mvnascimento@ime.eb.br), 0000-0001-8010-7382  
Roberto H. Monteiro, [robertohmonteiro@hotmail.com](mailto:robertohmonteiro@hotmail.com), 0000-0003-4506-5820  
Naiara V. Le Sénéchal, [naiaravls@gmail.com](mailto:naiaravls@gmail.com), 0000-0003-4992-5656

### **RESUMO**

O complexo amelodentinário é formado pelos tecidos duros do dente, o esmalte e a dentina. O esmalte (97% material cerâmico) é composto, principalmente, por hidroxiapatita, proteínas (amelogeninas e não amelogeninas) e é um tecido frágil susceptível a fratura. A dentina (70% material cerâmico) é composta de hidroxiapatita, fibras colagenosas (tipo I) e proteínas não colagenosas, tem menor dureza e maior rigidez, resistência e tenacidade do que o esmalte. Assim, foram propostas diversas estratégias para obter a regeneração dos tecidos dentários, incluindo as tecnologias de biomateriais de terceira geração, como as técnicas biomiméticas. O objetivo desse trabalho é apresentar as principais metodologias biomiméticas (biomateriais de terceira geração) utilizadas na regeneração do esmalte e da dentina. Além de caracterizar as principais características e propriedades desses tecidos. Nesse sentido, dentro das rotas que tentaram promover uma reconstituição tecidual, se constituem por meio de classificação, dois grandes grupos: a via clássica de biomineralização (*top down*) e a via não-clássica biomineralização (*bottom up*). A primeira foca na reconstituição tecidual a partir da aposição dos elementos constituintes do próprio tecido (átomo a átomo e molécula a molécula), como nos enxertos ósseos. Enquanto o segunda enfatiza o crescimento com elementos pré-mineralizantes em sentido de partícula a partícula, assim como a utilização de grupos amorfos de fosfato de cálcio como precursores.

**Palavras-chave:** Biomineralização. Biomimética. Regeneração de tecidos. Tecidos dentários. Tecidos do complexo amelodentinário

### **1 Introdução**

O complexo amelodentinário é composto por dois tecidos dentários duros, a camada mais externa, o esmalte, e a camada subadjacente, a dentina. O esmalte, derivado do ectoderma, é o tecido mais duro do corpo e se caracteriza por ser um tecido acelular com 97% de conteúdo mineral. Enquanto, a dentina, derivada da crista neural, é um tecido menos duro que o esmalte, mas mais duro que o osso, e pode ser caracterizada como o tecido dentário mais abundante que tem 70% de conteúdo mineral (KIERSZENBAUM, 2016).

A composição inorgânica do esmalte e da dentina consiste, principalmente, em hidroxiapatita, não estequiométrica, com estrutura cristalina hexagonal e fator de empacotamento de 74%. Enquanto que a porção orgânica é constituída por proteínas. No esmalte, amelogeninas e não-amelogeninas, e na dentina, fibras colagenosas e proteínas não colagenosas (LACRUZ, *et al.*, 2017). Além disso, tanto o esmalte como a dentina têm propriedades microestruturais e anisotrópicas semelhantes. No entanto, enquanto o esmalte tem uma dureza elevada e é, altamente, friável (ZHANG *et al.*, 2014), a dentina tem uma organização mais complexa, tendo uma dureza mais baixa, alta resiliência e alta rigidez, resistência e tenacidade, ajudando à dissipação de cargas de mastigação, evitando assim a fratura do esmalte (KATCHBURIAN, 2017).

Diversos métodos de engenharia de tecidos têm tentado, utilizando biomateriais de terceira geração, regenerar e/ou biomimetizar esses tecidos dentários seguindo sempre as vias da biomineralização clássica e não clássica (ZHU *et al.*, 2016). A primeira corresponde à aposição de elementos essenciais para regular e estabilizar a mineralização, assim, essa via será permeada pela nucleação e logo após o seu crescimento, isso através da redução da energia livre de Gibbs (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2016). Enquanto a segunda se concentra em elementos pré-mineralizantes que interagem com a estrutura do tecido e estimulam a produção de tecido (partícula por partícula) (NIU *et al.*, 2014). Nesse sentido, análogos biomiméticos são incorporados como precursores líquidos induzidos por polímeros (PILP) de proteínas de esmalte ou de matriz de dentina. Esses análogos biomiméticos seriam agregados com grupos de fosfato de cálcio amorfo, e, subsequentemente, promoveriam a biomineralização (FANG *et al.*, 2021).

Assim, o objetivo desse trabalho é apresentar as principais metodologias biomiméticas (biomateriais de terceira geração) utilizadas na regeneração do esmalte e da dentina. Além de caracterizar as principais características e propriedades desses tecidos.

## **2 Materiais e métodos**

### **Fonte de Dados e Critérios de Elegibilidade**

A pesquisa foi realizada no PubMed, LILACS, Google Scholar, e Web of Science durante os últimos 20 anos, sem restrições de idiomas. Os seguintes termos foram utilizados para a pesquisa de dados: "*enamel histology*", "*dentin histology*", "*enamel composition*", "*dentin composition*", "*enamel matrix proteins*", "*amelogenins*", "*non-amelogenins*", "*dentin matrix proteins*", "*dentin collagenous proteins*", "*non-collagenous dentin proteins*", "*enamel mechanical properties*", "*dentin mechanical properties*", "*biomineralization*", "*classical mineralization pathway*", "*non-classical mineralization pathway*". Foram incluídos artigos que abordaram estudos *in vitro* e *in vivo* que seguiram a via clássica ou o não-clássica. Assim como artigos e livros que apresentavam uma descrição do tecidual, características atômicas/moleculares, cristalográficas e propriedades biomecânicas do complexo amelodentinário. Por outro lado, foram excluídos artigos que abordavam o dente como um todo, incluindo outras camadas de tecido para além do esmalte e da dentina, e que davam um grande enfoque à junção amelodentinária e que não estavam, especificamente, relacionados com algumas propriedades estruturais, histológicas, cristalográficas e mecânicas do esmalte e da dentina.

## **3 Resultados**

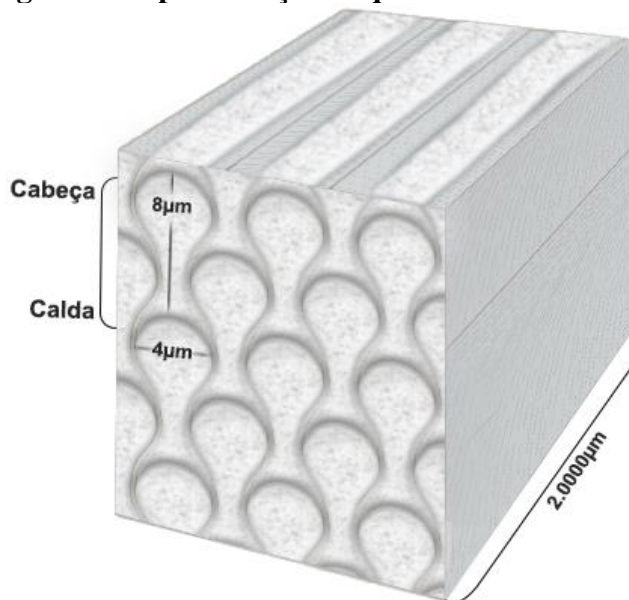
### **Histologia do Complexo Amelodentinário**

O esmalte, originário do ectoderma, é um tecido, maioritariamente, inorgânico que é mais superficial à estrutura dentária e cobre, completamente, a coroa dentária; a dentina, derivada da crista neural, é um tecido híbrido com porções orgânicas e inorgânicas, sendo mais abundante e compõe, completamente, a estrutura dentária. Esses tecidos têm composições semelhantes, mas com especificidades e arranjos que determinarão as características das suas propriedades (KIERSZENBAUM, 2016).

O complexo amelodentinário é estruturado histologicamente em esmalte, dentina e junção amelodentinária, que é a intersecção entre esmalte e dentina (Figura 1) (KIERSZENBAUM, 2016). O esmalte é o tecido mineral mais duro do corpo e é segregado por ameloblastos, que são células que só existem, exclusivamente, durante o período de formação do dente. Por conseguinte, é um tecido acelular (LACRUZ *et al.*, 2017). Esse tecido tem uma conformação prismática na direção vertical, organizando

uma sequência de prismas ondulados do esmalte e regiões interprismáticas. Cada prisma de esmalte é organizado por cristais de hidroxiapatita em fator de empacotamento máximo e tem uma camada de revestimento orgânico (bainha do prisma) (PANDYA & DIEKWISCH, 2019).

**Figure 1: Representação Esquemática do Esmalte**



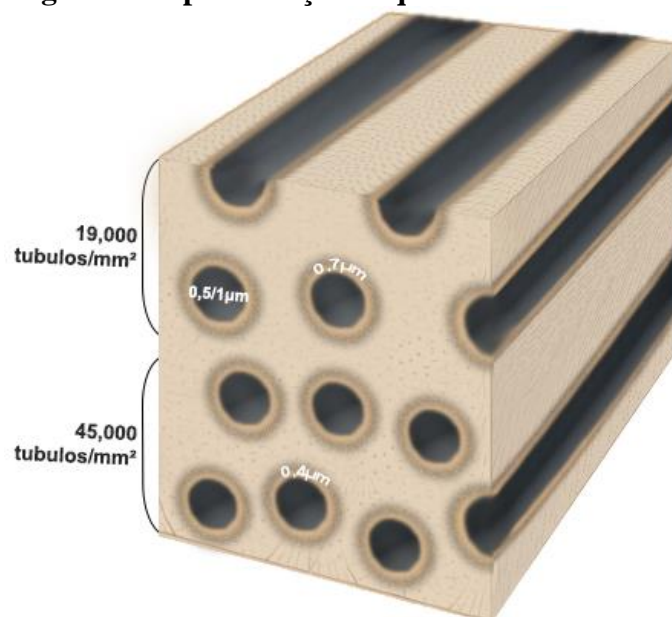
Adaptado de Wojciech & Pawlina (2021).

Não há diferença estrutural entre os prismas do esmalte e as regiões interprismáticas, ambos têm a mesma composição e o mesmo fator de empacotamento, o que diferencia estas estruturas é a ordem da direção desses prismas. A orientação dos prismas segue o longo eixo do dente, em direção longitudinal, mas ao se aproximar das periferias, as direções assumem uma inclinação, diretamente, proporcional ao limite da camada prismática (KATCHBURIAN, 2017).

Além disso, o esmalte tem uma espessura média máxima de 2,5 mm e tem como propriedade uma dureza elevada, mas é um tecido, altamente, friável. A estrutura cristalina hexagonal tem, aproximadamente, 20 a 60 nm de largura e 30 a 90 nm de altura, e existe uma distância de, aproximadamente, 4 µm entre as regiões prismáticas e interprismáticas (PANDYA & DIEKWISCH, 2019). Nesse sentido, a migração do esmalte para a dentina é mediada pela junção amelodentinária, que possui uma espessura de, aproximadamente, 10 a 12 µm (KATCHBURIAN, 2017).

A dentina é o tecido mais abundante do dente, tem um contacto íntimo, desde a sua formação, com a polpa que é um tecido conjuntivo não mineralizado, altamente, vascularizado e com a presença de plexos nervosos. Esse tecido tem uma dureza inferior à do esmalte, mas superior à do tecido ósseo. Além disso, a dentina tem uma grande resiliência que satisfaz um comportamento elástico e evita a fratura do esmalte (KIERSZENBAUM, 2016). A organização dos cristais de dentina pode ser dividida em túbulos dentinários, dentina peritubular e dentina intertubular (Figura 2).

**Figure 2: Representação Esquemática da Dentina**



Adaptado de Wojciech & Pawlina (2021).

Assim, os túbulos dentinários são estruturas não-retilíneas em direção tangencial/transversal que são permeadas por fluidos dentinários. Esses túbulos têm, aproximadamente, 0,5 a 1 µm diâmetro de lúmen, enquanto perto da junção amelodentinária um tamanho de área diferente do que na região mais próxima da polpa, 19.000 e 45.000 túbulos/mm<sup>2</sup>, respectivamente. Enquanto que a dentina peritubular é um tecido hipermineralizado com uma espessura de, aproximadamente, 0,7 µm perto da região amelodentinária e 0,4 µm perto da polpa. A dentina intertubular, por outro lado, é o tecido que se encontra entre um túbulo dentinário e outro (KATCHBURIAN, 2017).

### **A Composição e Arranjo Cristalográfico Molecular do Esmalte e Dentina**

Os componentes do esmalte e dentina podem ser organizados em inorgânicos e orgânicos. Ambos os tecidos têm composições inorgânicas semelhantes, mas em proporções diferentes. E as principais variações de composição, propriamente ditas, estão nas porções orgânicas (KIERSZENBAUM, 2016).

O complexo amelodentinário de composição inorgânica consiste em apatitas, sendo a principal delas a hidroxiapatita. A hidroxiapatita estequiométrica se apresenta com uma fórmula estrutural genérica  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  seguindo a razão Ca/P de 1,67 com estrutura cristalina hexagonal, grupo espacial P63/m, fator de empacotamento super compacto de 74%. No entanto, os constituintes dentários apatita não são estequiométricos, e por isso são extremamente permeáveis com defeitos, geralmente deficientes em cálcio, de modo que podem existir diferenças na relação Ca/P, por exemplo, no esmalte 1,63, na dentina 1,61, e no osso 1,71 (DOROZHUKIN & EPPLE, 2002; SENA, 2004).

A célula da unitária da hidroxiapatita corresponde à fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  e a sua forma cristalina exibe três tetraedros de agrupamentos de fosfatos coordenados com íons de cálcio formando uma estrutura hexagonal simétrica (LACRUZ, *et al.*, 2017). Assim, existe ainda a possibilidade de substituições iônicas dentro dos cristais de apatita, uma vez que as hidroxilas podem se difundir e ser substituídas por outros íons, o

que caracteriza o carácter adaptativo das apatitas biológicas (DOROZHUKIN & EPPLE, 2002).

Essas substituições podem gerar outras apatitas como a fluorapatita com fórmula estrutural de  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}$ , na qual o íon flúor ( $\text{F}^-$ ) substitui a hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). Há também a substituição da hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) pelo íon carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), formando a hidroxiapatita carbonatada tipo A (CHA-tipo A), e a substituição do grupo fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) pelo íon carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ), formando a hidroxiapatita carbonatada tipo B (CHA-tipo B). No complexo amelodentinário se encontram, principalmente, a fluorapatita e o CHA-tipo A (SENA, 2004).

A porção orgânica do complexo amelodentinário será diferente tanto para o esmalte como para a dentina. No esmalte, a matriz orgânica consiste em proteínas que compõem e fazem a ação de biomineralização (existem ainda pequenas quantidades escassas de carboidratos e lipídios). As principais proteínas da matriz do esmalte dentário são: as amelogeninas (90%), e as não-amelogeninas. Essas não-amelogeninas são formadas por dois grupos: as fosfoproteínas glicosiladas ácidas (Esmelina e Tufelina) e as glicoproteínas sulfatadas (Ameloblastina (8-10%), Amelina, Bainhalina, Amelotina, Apin) (PAINE & SNEAD, 2005; GRUENBAUM-COHEN, *et al.*, 2009). Essas proteínas têm um carácter transitório na formação do tecido de esmalte, o que torna difícil analisar os mecanismos de biomineralização nesse tecido (MORADIAN-OLDAK, 2012).

A composição da matriz orgânica da dentina é estabelecida por proteínas colagenosas (90%) e não colagenosas. As proteínas colagenosas correspondem a glicoproteínas que estão dispostas em fibras colagenosas híbridas do tipo I e pequenas porcentagens dos tipos III e V. Essas fibras colagenosas têm, aproximadamente,  $2,8 \times 10^2$  nm de comprimento e  $3 \times 10^6$  Da e são compostas por três tipos de aminoácidos representados pela fórmula geral  $[\text{Gly-X-Y}]_n$ , na qual, para a dentina, se referem a Glycina-Prolina-Hidroxiprolina (SILVA & PENNA, 2012; GITIRANA, 2013). Essa unidade de tripeptídeos (Gly-Pro-Hyp) forma longas cadeias  $\alpha$  que se associam com outras cadeias  $\alpha$  e se rearranjam em tripla hélice formando fibrilas colagenosas, de modo que o conjunto dessas fibrilas em bobinas helicoidais forma as fibras colagenosas, e, conseqüentemente, aumenta a resistência mecânica. Assim, essas fibrilas colagenosas de tipo I são formadas por duas cadeias de polipeptídeos  $\alpha 1$  e uma  $\alpha 2$ , formando a tripla hélice. Isso de modo que cada cadeia é estruturada com, aproximadamente, 1038 aminoácidos (SORUSHANOVA *et al.*, 2018).

As proteínas não colagenosas (NCP) se caracterizam por uma super família de proteínas - família SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*) - e são compostas por: Proteína da Matriz Dentinária 1, 2 e 3 (DMP1, DMP2, DMP3), Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP), Fosfoglicoproteína da Matriz Extracelular (MEPE), Osteopontina (OPN), Osteocalcina (OC), Osteonectina (ON) e Sialoproteína Óssea (BSP). A DSPP é clivada e subdividida em: Sialoproteína Dentinária-Glicoproteína Dentinária (DSP-DGP) e Fosfoproteína Dentinária (DPP). Assim, essas proteínas são, altamente fosforiladas, e participam no processo de mineralização da dentina (SUZUKI *et al.*, 2012).

Além disso, a proteína DSPP tem sinalização autocrítica, ou seja, produz a sua própria ativação sendo clivada em proteínas mais pequenas que fornecem e iniciam toda a cascata bioquímica da mineralização dentina. Assim, quando a DSPP é clivada e subdividida (DSP-DGP e complexo DPP), a DPP e as outras NCP guiam, em relação quantidade dependente do colágeno - *collagen guide* - o processo de mineralização da dentina (NANCI, 2008; PRASAD *et al.*, 2010).

Além disso, o DPP é a proteína mais abundante das NCP, tem um carácter ácido, e na sua estrutura tem sequências repetidas de ácido aspártico (Asp) e fosfoserinas (Pse) formando sequências repetidas de [Asp-Pse]<sub>n</sub>, [Pse-Asp-Asp]<sub>n</sub>, e [Asp-Pse-Pse]<sub>n</sub>. Assim, o seu papel na mineralização da dentina seria a sua ligação aos átomos Ca<sup>+2</sup>, atraindo-os, e os apresentando às fibras colagenosas que formam os cristais de hidroxiapatita (GULSEREN *et al.*, 2019).

### **Propriedades Mecânicas do Complexo Amelodentinário**

Os dentes, em geral, são órgãos que têm elevada dureza e resistência mecânica. Funcionalmente, os movimentos e cargas de mastigação podem atingir valores de, aproximadamente, 800 N. Além disso, esmalte e dentina são tecidos que, embora façam parte do mesmo órgão, têm propriedades mecânicas específicas que caracterizam a especificidade da sua composição (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2018).

Entre as propriedades mecânicas, podem se destacar, principalmente, as propriedades elásticas (como o módulo de elasticidade, o módulo de cisalhamento e o coeficiente de Poisson), que correspondem à forma como um material suporta uma carga e se recupera quando essa carga é removida, sem deformação; a dureza, que corresponde a uma medida em diferentes escalas, além de mostrar a capacidade deste dente de resistir à deformação elástica, plástica e à fratura (ZHANG *et al.*, 2014).

No esmalte e na dentina, o módulo de elasticidade, também conhecido como módulo do Young, representa a relação entre as forças normais e de cisalhamento, é, aproximadamente, 70 GPa e 18,3 GPa, respectivamente. Ambos os tecidos têm o mesmo coeficiente de Poisson que é de 0,30 (razão entre a tensão de contração transversal e a tensão de extensão longitudinal na razão entre a força de alongamento), e os valores de densidade para cada um, respectivamente, é de 0,25g/cm<sup>3</sup> e 0,31g/cm<sup>3</sup> (HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2018).

O esmalte apresenta propriedades anisotrópicas, de modo que dentro do mesmo prisma do esmalte há diferença, na direção cabeça-caudal do módulo de elasticidade e dureza. Estas propriedades são maiores na cabeça da haste do que na porção caudal (JENG *et al.*, 2010). O esmalte tem uma dureza máxima de 3,5 GPa na sua superfície, e à medida que migra para a região amelodentinária essa dureza diminui. Assim, a média é de, aproximadamente, 2 GPa a 2,5 GPa a uma distância de 100 µm a 600 µm da junção amelodentinária (ZHANG *et al.*, 2014).

Além disso, há variações de propriedades com a idade, uma vez que com o processo de envelhecimento o conteúdo mineral da dentina aumenta e a espessura do esmalte diminui (PARK *et al.*, 2007). A nanodureza e o módulo de elasticidade que diminuem da superfície para a junção amelodentinária mantendo uma relação proporcional com a quantidade de Ca<sup>+2</sup> e com a direção do prisma do esmalte (JENG *et al.*, 2010). Nesse sentido, a relação entre a dureza e a densidade diminui em direção do esmalte para a junção amelodentinária (HE *et al.*, 2010). No entanto, esses resultados podem ser obtidos em paralelo e na direção perpendicular. Assim, em testes de dureza, quando a direção de indentação é paralela às hastes, a dureza é 3,9 ± 0,3 GPa e o módulo de elasticidade é 87,5 ± 4,5 GPa, enquanto que quando a direção de indentação é perpendicular os valores mudam, respectivamente, 3,8 ± 0,4 GPa e 72,7 ± 4,5 GPa (HABELITZ *et al.*, 2001; IVANCIK *et al.*, 2012).

A dentina apresenta semelhanças em propriedades microestruturais e anisotrópicas como esmalte, mas tem uma organização mais complexa. Isso de modo em que não se trata apenas da conformação dos prismas apatita na sua localização em relação à superfície da junção amelodentinária, mas existe túbulos e direcionamento desses túbulos dentinários, e, portanto, essa morfologia é guiada pela direção das fibras

colagenosas, além de existir uma diferença de densidade da fase mineral e a localização da junção amelodentinária à camada mais superficial em direção à polpa (COHEN *et al.*, 2008).

A dentina peritubular tem um elevado grau de mineralização e um módulo de elasticidade de, aproximadamente,  $40 \pm 2$  GPa, enquanto a dentina intertubular tem um baixo grau de mineralização com um módulo de elasticidade de cerca de 17 GPa (ZISKIND *et al.*, 2010). Perto da junção amelodentinária, a dentina tem uma baixa microdureza, e à medida que se move em direção à polpa, a microdureza aumenta um pouco, e depois diminui novamente. Portanto, entende-se que a dureza e o módulo de elasticidade da dentina são mais elevados em região central interna da dentina (terço médio), e à medida que se avança em direção às áreas periféricas, essas propriedades diminuem. Além disso, comparando os tipos de dentina, pode-se observar que a dureza diminui, gradualmente, do túbulo dentinário para a dentina intertubular, o que corresponde, e é, diretamente, proporcional, à diminuição do conteúdo mineral (IVANCIK *et al.*, 2012).

Em ambientes húmidos, a dentina tem características anisotrópicas e um módulo de elasticidade, aproximadamente, 25,1 GPa perpendicular aos túbulos dentinários, enquanto que em ambientes secos, torna-se isotrópica e o módulo de elasticidade é de 28,1 GPa. Ainda nesta perspectiva entre ambiente seco e húmido, a dentina diminuiu o módulo de elasticidade em 35% e a dureza em 30% em ambiente hidratado. O que caracteriza que as propriedades mecânicas da dentina dependem do ambiente (ZHANG *et al.*, 2014).

Além disso, o complexo amelodentinário é um sistema muito heterogêneo, de modo que existe uma diferença na disposição e composição das apatitas entre as camadas do tecido dentário. O esmalte tem muito mais hidroxiapatita do que a dentina, pelo que é um tecido de elevada dureza, mas pouca ductilidade e tenacidade, o que o caracteriza como um tecido, altamente, friável e susceptível à fratura. Assim, de forma complementar, a dentina tem uma menor dureza e uma maior ductilidade e tenacidade, precisamente, para suportar e ajudar à dissipação das cargas sobre o esmalte (cargas mastigatórias), evitando a sua fratura. Isso explica porque existe essa diferença na composição apatita entre estas camadas de tecido (XUE *et al.*, 2013).

### **Vias de Biomineralização de Esmalte e Dentina da Engenharia de Tecidos**

O processo de biomineralização *in vitro* e *in vivo* do esmalte e da dentina passou por vários entendimentos e interpretações de como esses mecanismos funcionavam, e assim, várias metodologias foram aplicadas tentando regenerar estes tecidos e/ou biomimetizá-los (HE *et al.*, 2019). Essas perspectivas geraram duas vias metodológicas de biomineralização, a clássica e a não-clássica.

A via clássica de biomineralização enfatiza a mineralização em sentido "de fora para dentro/de cima para baixo" (*topdown*), uma vez que se concentra na reconstrução dos tecidos a partir da aposição dos constituintes essenciais, geralmente peptídeos ou proteínas, que regulam e estabilizam a mineralização (ZHU *et al.*, 2016). Assim, essa vertente se concentra na formação de cristais apatita a partir dos constituintes primários correspondentes de cada tecido (Figura3).

### **Figure 3: Representação da Via Clássica de Biomineralização**





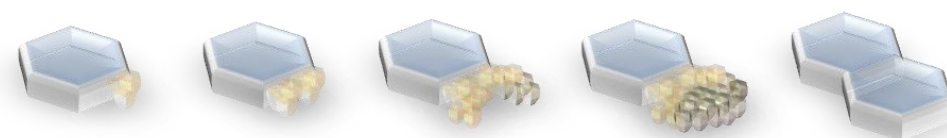
Fonte: elaborado pelo autor.

Nesse sentido, a biomineralização começa com a nucleação dos cristais, de modo que os componentes básicos, sob a forma de íons, átomos, ou moléculas que se agregam e formam núcleos de *clusters*. Assim, os núcleos começam a crescer, proliferar e formar a estrutura tecidual (FAN *et al.*, 2009; NUDELMAN *et al.*, 2013; HE *et al.*, 2019). A via clássica de cristalização acontece através de dois processos: uma nucleação de fase sólida e logo após o seu crescimento espontâneo, em que a força motriz da nucleação é o conjunto de redução de energia livre de Gibbs (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2016).

No esmalte, vários estudos *in vitro* descobriram que a amelogenina desempenha um papel fundamental no controle da mineralização, orientando a nucleação, a forma e a direção dos cristais apatita. Enquanto que na dentina, a biomineralização das fibras colagenosas foi concebida de modo em que a agregação de cristais de apatita sobre essas fibras promovesse a mineralização. Essa metodologia foi bem sucedida, mas foi limitada por alguns fatores, como a ausência de cristais de hidroxiapatita no tecido remanescente que pode propor um potencial regeneração tecidual (NUDELMAN *et al.*, 2013). Isso além da limitação de não poder propor uma deposição intrafibrilar, limitando-se apenas à mineralização interfibrilar (NIU *et al.*, 2014).

Depois disso, as perspectivas mudaram e novas pesquisas começaram a investir em outra estratégia de biomineralização em direção oposta à via clássica, uma rota "de dentro para fora/de baixo para cima" (*bottom-up*) que se concentrava em elementos pré-mineralizantes que interagem com o tecido remanescente e estimulam a produção tecidual - a via não clássica (Figura 4). Assim, em vez de se concentrar no crescimento através da aposição iônica, a via não-clássica é estabelecida enfatizando a via partícula a partícula para a formação de um único cristal apatita. Além disso, é um processo com um elevado nível de controle hierárquico e espacial, no qual a biomineralização ocorre no ambiente de reação (ZHU *et al.*, 2016).

**Figure 4: Representação da Via Não-Clássica de Biomineralização**



Fonte: elaborado pelo autor.

Essa via considera análogos biomiméticos da matriz do esmalte e proteínas não colagenosas da dentina como componentes ativos que podem desempenhar o papel de "*primer*" no processo de biomineralização. E sendo assim, considera fatores de pré-nucleação, em escala nanométrica, como aglomerados de cálcio e fosfato. Esses aglomerados seriam capturados por análogos de proteínas de matriz de esmalte e/ou proteínas não colagenosas chamados precursores líquidos induzidos por polímeros



(PILP), agregando ainda mais em nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo (ACP). E então, o agrupamento ACP seria capaz de entrar nos compartimentos dos tecidos e promover a biomineralização (NIU *et al.*, 2014; FANG *et al.*, 2021).

Os PILPs são biomoléculas anfifílicas que possuem grupos de ácido carboxílico e promovem assim locais ativos de interação com minerais de cálcio. Desta forma, acabam por controlar a cinética química, forma e direção, e os polimorfismos do fosfato de cálcio (NIU *et al.*, 2014).

A utilização de PILP surgiu com Gower (2008) com um sistema biomimético para a mineralização das fibras colagenosas do tipo I. Em que é identificada uma etapa de formação de nanopartículas atuando como nanoprecusores amorfos (grupos ACP já foram encontrados transitoriamente no esmalte e tecido ósseo) que poderiam atuar tomando a forma dos seus recipientes.

As características primárias da PILP consistem numa fase inicial de coalescência de gotículas precursoras que, em vez de crescerem átomo a átomo, agregam, fluindo como um líquido ligeiramente viscoso, partículas em crescimento. Isso significa que, em vez das nanopartículas formarem um aglomerado de várias partículas, elas coalescem para formar uma gotícula maior até se tornarem demasiado solidificadas para coalescerem completamente. Além disso, o progresso bem sucedido da PILP consiste em encontrar (carregados negativamente) polímeros que estabilizam nanopartículas precursoras amorfas (Gower, 2008).

Assim, utilizando a metodologia biomimética PILP, Gower e colaboradores foram capazes de propor modelos de biomineralização com várias matrizes orgânicas com carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), bem como, a biomineralização intrafibrilar de fibras colagenosas em apatitas carbonatadas. No entanto, esses PILPs não podem ser aplicadas ao esmalte, uma vez que se trata de um tecido quase inteiramente inorgânico, e a porção orgânica dos PILPs poderia comprometer a resistência mecânica do esmalte (KIM *et al.*, 2007; Gower, 2008; THULA *et al.*, 2011).

#### **4. Análise e discussão**

A caracterização do complexo amelodentinário mostra que diferentes estruturas embrionárias podem propor um arranjo de tecidos semelhante. Por exemplo, embora existam os mesmos cristais de hidroxiapatita em esmalte e dentina (razão estequiométrica diferente), ambos tiveram uma origem embrionária diferente e foram submetidos a um arranjo de tecido *in natura* para serem iguais e constituintes do mesmo órgão.

Assim, é possível verificar que diferentes folhetos embrionários conseguiram propor uma espécie de "biomimetismo" do mesmo constituinte em tecidos com diferentes especificidades. A partir disto, a engenharia de tecidos propôs, com várias estratégias, tentar mediar a reconstituição e/ou biomimetismo destes tecidos por meios que sigam as vias de biomineralização, principalmente, a não-clássica. Para apoiar este conceito, esta revisão determinou a caracterização do complexo amelodentinário e evidenciou os mecanismos da biomimética do esmalte e da dentina.

Alguns pesquisadores exploraram a via não clássica da biomineralização do esmalte combinando a indução da remineralização com análogos biomiméticos, principalmente, na estabilização da reação, e, portanto, do composto principal. Shao *et al.*<sup>39</sup> propuseram a regeneração *in vitro* do esmalte utilizando trietilamina (TEA) como estabilizador de *clusters* de fosfato de cálcio (álcool como solvente). Isso a fim de formar uma camada precursora de íons de fosfato de cálcio imitando a fase amorfa cristalina da biomineralização *in natura*, para induzir o crescimento de hidroxiapatita

pura. Entretanto, Fang *et al.*<sup>8</sup> estruturaram um microambiente com uma matriz de proteínas de esmalte biomimético, sendo uma delas uma estrutura de amelogenina modificada rica em leucina (mLRAP) e outra biomimética não-amelogenina (NAA) análoga.

Isso enquanto Elsharkawy *et al.*<sup>40</sup> fizeram uma biomineralização do esmalte mediada pela interação ordem-desordem da elastina recombinante (ELR) (estrutura hidrofóbica (VPGIG), um segmento com carga positiva (VPGKG) com o aminoácido lisina (K) para a ligação cruzada ELR), e assim conceberam uma matriz supramolecular (semelhante a uma molécula compreendendo regiões intrinsecamente desordenadas e domínios com carga negativa) associada a um análogo biometálico altamente ácido derivado de estaterina DDDEEKFLRRRRIGRFG (SNA15).

Kwak *et al.*<sup>12</sup> elaboraram sobre a regeneração do esmalte, com base nos seus próprios estudos anteriores, utilizando uma combinação de pirofosfato inorgânico (PPi) e peptídeo amelogenina rico em leucina (LRAP) (um peptídeo alternativo não fosforado de 56 aminoácidos da amelogenina). O primeiro para controlar o início e a taxa de regeneração e o segundo para regular a forma e orientação dos cristais de hidroxiapatita.

Em relação à dentina, a investigação centrou-se em encontrar análogos biomiméticos de proteínas não colagenosas, especialmente a DPP, para compreender os mecanismos e promover a biomineralização dentinária. Além disso, testaram a diferença do processo de remineralização da dentina integral e desmineralizada, e estabeleceram estratégias que poderiam promover a remineralização intrafibrilar das fibras das fibras colagenosas.

Zhao *et al.*<sup>41</sup> conceberam a remineralização da dentina desmineralizada com ácido aspártico (Asp) (abundante em proteínas não colagenosas) e ácido poliacrílico (PAA) (estabilizador de Asp). Foi feita uma solução remineralizante com esses dois constituintes, explorando os mecanismos de regulação do Asp promovendo a cinética de cristalização do fosfato de cálcio amorfo puro em hidroxiapatita. Além disso, o tempo de mineralização foi reduzido de 7 para 2 dias.

Gulseren *et al.*<sup>42</sup> elaboraram um peptídeo que induz a biomineralização da dentina, isso a fim de biomimetizar a DPP da matriz dentinária. Esse é um sistema de nanofibras que interage com as enzimas e facilita a deposição apatita (também induzida pela adição de íons de cálcio). Essa DPP biomimética realiza uma automontagem a partir da desfosforilação por fosfatase alcalina (ALP) (uma enzima que participa na mineralização da matriz dentária e do osso). Assim, a matriz extracelular mineralizada foi gerada pelo processo de gelificação, no qual as propriedades do meio mediarão as reações químicas.

Villarreal-Ramirez *et al.*<sup>43</sup>, por outro lado, selecionaram o peptídeo Ace-SSDSSDSSDSSDSSD-NH<sub>2</sub> (P5) e a sua forma fosforilada (denominada P5P) a partir da investigação de possíveis domínios de ligação (especificamente selecionados) de DPP em hidroxiapatita por meio de dinâmica molecular atomística. Verificaram que o P5 era capaz de inibir o crescimento de cristais de hidroxiapatita, enquanto que o P5P era capaz de estimular este crescimento, sugerindo assim que a fosforilação controla a mediação da biomineralização. Isto é apoiado uma vez que a fosforilação coordena a formação transitória da estrutura secundária e terciária dos peptídeos de DPP, que por sua vez induz o crescimento de hidroxiapatita em solução, e muito provavelmente também em tecidos mineralizados.

Na mesma perspectiva, Chien *et al.*<sup>44</sup> descobriram que os danos dos tecidos ou a desmineralização utilizando ácidos polianiónicos em vez de NCP comprometiam o processo de remineralização, principalmente no que diz respeito às propriedades mecânicas. A partir disto, propuseram um pré-tratamento com peptídeos anfífilicos

(polímeros semelhantes a peptídeos constituídos por glicinas N-substituídas que definiram sequências monoméricas) para melhorar a organização e biomineralização das fibras colagenosas, para além de induzir a remineralização funcional das lesões dentinárias *in vitro*. Isso para que os nanocristais apatita sejam coalescidos com o eixo c paralelo à periferia dos túbulos dentinários, e a recuperação dos tecidos seja mantida com uma elevada resistência mecânica.

Contudo, embora haja esse sucesso de regeneração e/ou biomimética do esmalte e dentina, e em ambos os estudos, os tecidos remineralizados apresentaram morfologia e estabilidade semelhantes à camada de tecido natural. O grande problema continua a ser o tempo de reação para reproduzir isso *in vivo* em tempo clínico. Alguns destes métodos levam dias para que a reação de biomineralização tenha lugar. Além disso, a taxa de crescimento dos tecidos é ainda muito pequena.

Além disso, alguns pesquisadores tentaram mediar a remineralização do complexo amelodentinário sozinhos usando bases de quitosanas. Isso para que o carboximetilquitosa peptídeo quimérico fosse capaz de estabilizar os grupos de fosfato de cálcio amorfo, formando assim os complexos carboximetilquitosa/fosfato de cálcio amorfo (CMC/ACP), bem como de ser processado em *scaffolds* por liofilização.

Xiao *et al.*<sup>45</sup> elaboraram uma solução do nanocomplexo quimérico mediado pelo peptídeo de CMC/ACP. Esse peptídeo tem a função de orientar, organizar e ligar o ACP na superfície do esmalte desmineralizado, além disso, pode ser mantido por muito tempo sem precipitar. Desse modo, a partir da degradação do NaClO e da orientação dos peptídeos quiméricos, o nanoACP foi disposto e orientado antes de se transformar em cristais apatita, e pouco depois, quando foi transformado em hidroxiapatita, foi fortemente ligado à superfície do esmalte.

Isso enquanto, Chen *et al.*<sup>46</sup> utilizavam os mesmos nanocomplexos CMC/ACP mas num modelo de cárie profunda em dentina desmineralizada, contudo com uma base biomimética simulando o efeito estabilizador do DMP1 no ACP. Assim, a partir de *scaffolds*, as nanopartículas de ACP são libertadas dos nanocomplexos CMC/ACP dissolvidos, permeando as frilas colagenosas através das zonas de fenda, realizando a biomineralização intrafibrilar das fibras colagenosas.

Considerando que Muşat *et al.*<sup>47</sup> associaram quitosana com agarose num hidrogel à base de biopolímero. Neste sentido, a partir deste biopolímero realizaram a remineralização biomimética da superfície do esmalte desmineralizado (condicionada a ácido) durante a imersão em saliva artificial, de 4 a 10 dias, com ou sem flúor (grupo de controle).

Campodoni *et al.*<sup>48</sup> conceberam *scaffolds* híbridos semelhantes às características físico-químicas dos tecidos mineralizados naturais. Nesse sentido, tentaram promover a nucleação de nanocristais de hidroxiapatita de magnésio (MgHA) na matriz de gelatina (Gel) gerando flocos híbridos (Gel/MgHA) (proporção 20:80/tamanho 50-70µm). O Gel/MgHA foi homogeneizado com uma mistura polimérica de quitosana e Gel para obter uma estrutura polimérica porosa 3D (MgHA 40:60), e depois caracterizado por uma estrutura porosa alinhada tal como obtida por um processo de liofilização controlado.

De toda esta investigação experimental, pode-se ver que os cristais de esmalte e dentina recentemente formados estavam quase bem organizados e equipados com fortes propriedades mecânicas.

## 5. Conclusões

Nesse trabalho, as estruturas histológicas e cristalográficas do esmalte e da dentina foram apresentadas em ligação com os mecanismos biomiméticos do complexo

amelodentinário. Assim, tanto em relação à composição como em relação às propriedades mecânicas. Entre as vias de biomineralização, a não-clássica é ainda a estratégia mais eficiente, uma vez que considera que os tecidos dentários não possuem células ou a capacidade de promover a regeneração a nível celular. No entanto, mesmo com todos esses resultados da engenharia de tecidos, é ainda necessário mais investigações, uma vez que a quantidade de tecido que pode ser remineralizada é ainda muito limitada. Além disso, o tempo necessário para promover esta biomineralização está longe de ser reproduzível no tempo de aplicação clínica.

## Referências

1. Kierszenbaum AL. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. 4 ed. Rio De Janeiro: Elsevier Science - Contents Direct, 2016.
2. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. DENTAL ENAMEL FORMATION AND IMPLICATIONS FOR ORAL HEALTH AND DISEASE. *Physiol Rev.* 2017;97(3):939-993. doi:10.1152/physrev.00030.2016
3. Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. *Int J Oral Sci.* 2014 Jun;6(2):61-9. doi: 10.1038/ijos.2014.21. PMID: 24743065; PMCID: PMC5130056.
4. Katchburian E. Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas / Eduardo Katchburian, Victor Arana. 4. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. ISBN 978-85-277-3222-2
5. Zhu G, Yao S, Zhai H, Liu Z, Li Y, Pan H & Tang R. Evolution from Classical to Non-classical Aggregation-Based Crystal Growth of Calcite by Organic Additive Control. *Langmuir.* 2016 32(35), 8999–9004. doi:10.1021/acs.langmuir.6b01594
6. Rodríguez-Navarro C, Ruiz-Agudo E, Harris J & Wolf SE. Nonclassical crystallization in vivo et in vitro (II): Nanogranular features in biomimetic minerals disclose a general colloid-mediated crystal growth. 2016.
7. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater.* 2014 Jan;30(1):77-96. doi: 10.1016/j.dental.2013.07.013. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23927881; PMCID: PMC3867526.
8. Fang Z, Guo M, Zhou Q, Li Q, Wong HM & Cao CY. Enamel-like tissue regeneration by using biomimetic enamel matrix proteins. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2021; 183, 2131–2141. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.06.028
9. Pandya M, Diekwisch TGH. Enamel biomimetics-fiction or future of dentistry. *Int J Oral Sci.* 2019 Jan 5;11(1):8. doi: 10.1038/s41368-018-0038-6. PMID: 30610185; PMCID: PMC6320371.
10. Wojciech & Pawlina. Ross Histologia - Texto e Atlas. Guanabara. Koogan: Grupo GEN, 2021. 9788527737241.
11. Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. St. Louis, MO: Mosby Elsevier, 2008
12. Kwak SY, Litman A, Margolis HC, Yamakoshi Y, Simmer JP. Biomimetic Enamel Regeneration Mediated by Leucine-Rich Amelogenin Peptide. *J Dent Res.* 2017 May;96(5):524-530. doi: 10.1177/0022034516688659. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28113034; PMCID: PMC5453497.
13. Sena LA. Produção e caracterização de Compósitos Hidroxiapatita-Colágeno para Aplicações Biomédicas. [Rio de Janeiro] 2004 XII, 95 p. 29,7 cm

- (COPPE/UFRJ, D.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2004) Tese - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE
14. Dorozhkin SV, Eppler M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2002 Sep 2;41(17):3130-46. doi: 10.1002/1521-3773(20020902)41:17<3130::AID-ANIE3130>3.0.CO;2-1. PMID: 12207375.
  15. Paine ML, Snead ML. Tooth developmental biology: disruptions to enamel-matrix assembly and its impact on biomineralization. *Orthod Craniofac Res.* 2005 Nov;8(4):239-51. doi: 10.1111/j.1601-6343.2005.00346.x. PMID: 16238604.
  16. Gruenbaum-Cohen Y, Tucker AS, Haze A, Shilo D, Taylor AL, Shay B, Sharpe PT, Mitsiadis TA, Ornoy A, Blumenfeld A, Deutsch D. Amelogenin in cranio-facial development: the tooth as a model to study the role of amelogenin during embryogenesis. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009 Jul 15;312B(5):445-57. doi: 10.1002/jez.b.21255. PMID: 19097165.
  17. Moradian-Oldak J. Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jun 1;17:1996-2023. doi: 10.2741/4034. PMID: 22652761; PMCID: PMC3442115.
  18. Silva TF, Penna ALB. Colágeno: características químicas e propriedades funcionais. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, n. 3, p. 530-539, 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/122273>>.
  19. Gitirana LB. Coleção Conhecendo. *Histologia dos tecidos*. 1ª. ed. Rio de Janeiro: PUBLIT Soluções Editoriais, 2013. v. 1.
  20. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, Zeugolis DI. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Advanced Materials.* 2018 31(1), 1801651. doi:10.1002/adma.201801651
  21. 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. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22534175; PMCID: PMC3517212.
  22. Prasad M, Butler WT, Qin C. Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res.* Outubro de 2010; 51 (5): 404-17. doi: 10.3109 / 03008200903329789. PMID: 20367116; PMCID: PMC2933432.
  23. Gulseren G, Tansik G, Garifullin R, Tekinay AB, Guler MO, Macromol. Dentin Phosphoprotein Mimetic Peptide Nanofibers Promote Biomineralization. *Biosci.* 2019, 1800080. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800080>
  24. Hernández-Vázquez RA, Romero-Ángeles B, Urriolagoitia-Sosa G, Vázquez-Feijoo JA, Marquet-Rivera RA, Urriolagoitia-Calderón G. Mechanobiological Analysis of Molar Teeth with Carious Lesions through the Finite Element Method. *Appl Bionics Biomech.* 2018 Oct 14;2018:1815830. doi: 10.1155/2018/1815830. PMID: 30405747; PMCID: PMC6204180.
  25. Jeng YR, Lin TT, Hsu HM, Chang HJ, Shieh DB. Human enamel rod presents anisotropic nanotribological properties. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2011 May;4(4):515-22. doi: 10.1016/j.jmbbm.2010.12.002. Epub 2010 Dec 15. PMID: 21396600.
  26. Park S, Wang DH, Zhang D, Romberg E, Arola D. Mechanical properties of human enamel as a function of age and location in the tooth. *J Mater Sci Mater*

- Med. 2008 Jun;19(6):2317-24. doi: 10.1007/s10856-007-3340-y. Epub 2007 Dec 23. PMID: 18157510.
27. He B, Huang S, Jing J & Hao Y. Measurement of hydroxyapatite density and Knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them. *Archives of Oral Biology*. 2010 55(2), 134–141. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.12
  28. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW Jr, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. *Arch Oral Biol*. 2001 Feb;46(2):173-83. doi: 10.1016/s0003-9969(00)00089-3. PMID: 11163325.
  29. Ivancik J, Majd H, Bajaj D, Romberg E, Arola D. Contributions of aging to the fatigue crack growth resistance of human dentin. *Acta Biomater*. 2012 Jul;8(7):2737-46. doi: 10.1016/j.actbio.2012.03.046. Epub 2012 Apr 3. PMID: 22484693; PMCID: PMC3367091.
  30. Cohen, S.R., Apter, N., Jesse, S., Kalinin, S., Barlam, D., Peretz, A.I., Ziskind, D. and Wagner, H.D. (2008), AFM Investigation of Mechanical Properties of Dentin. *Isr. J. Chem.*, 48: 65-72. <https://doi.org/10.1560/IJC.48.2.65>
  31. Ziskind D, Hasday M, Cohen SR, Wagner HD. Young's modulus of peritubular and intertubular human dentin by nano-indentation tests. *J Struct Biol*. 2011 Apr;174(1):23-30. doi: 10.1016/j.jsb.2010.09.010. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20850543.
  32. Xue J, Zavgorodniy A, Kennedy B, Swain ME, Li W. Microdifração de raios-X, TEM caracterização e análise de textura de dentina e esmalte humanos. *Journal of Microscopy*. 2013; 251: 144-153. <https://doi.org/10.1111/jmi.12053>
  33. He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, van Loveren C. Biomineralization of dentin. *Journal of Structural Biology*. 2019. doi:10.1016/j.jsb.2019.05.010
  34. Fan Y, Sun Z & Moradian-Oldak J. Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride. *Biomaterials*. 2009; 30(4), 478–483. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.019
  35. Nudelman F, Lausch AJ, Sommerdijk NAJM & Sone D. In vitro models of collagen biomineralization. *Journal of Structural Biology*. 2013; 183(2), 258–269. doi:10.1016/j.jsb.2013.04.003
  36. Gower LB. Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chemical Reviews*. 2008; 108(11), 4551–4627. doi:10.1021/cr800443h
  37. Kim YY, Douglas EP, Gower LB. Patterning inorganic (CaCO<sub>3</sub>) thin films via a polymer-induced liquid-precursor process. *Langmuir*. 2007;23:4862–4870
  38. Thula TT, Svedlund F, Rodriguez DE, Podschun J, Pendi L, Gower LB. Mimicking the nanostructure of bone: Comparison of polymeric process-directing agents. *Polymers (Basel)* 2011;3:10–35.
  39. Shao C, Jin B, Mu Z, Lu H, Zhao Y, Wu Z, Yan L, Zhang Z, Zhou Y, Pan H, Liu Z, Tang R. 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. PMID: 31497647; PMCID: PMC6716959.
  40. Elsharkawy S, Al-Jawad M, Pantano MF, Tejeda-Montes E, Mehta K, Jamal H, Agarwal S, Shuturminska K, Rice A, Tarakina NV, Wilson RM, Bushby AJ, Alonso M, Rodriguez-Cabello JC, Barbieri E, Del Río Hernández A, Stevens MM, Pugno NM, Anderson P, Mata A. Protein disorder-order interplay to guide the growth of hierarchical mineralized structures. *Nat Commun*. 2018 Jun 1;9(1):2145. doi: 10.1038/s41467-018-04319-0. PMID: 29858566; PMCID: PMC5984621.

41. Zhao L, Sun J, Zhang C, Chen C, Chen Y, Zheng B, Gu X. Effect of aspartic acid on the crystallization kinetics of ACP and dentin remineralization. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2021; 115, 104226. doi:10.1016/j.jmbbm.2020.104226
42. Gulseren, G., Tansik, G., Garifullin, R., Tekinay, A. B., & Guler, M. O. (2018). *Dentin Phosphoprotein Mimetic Peptide Nanofibers Promote Biomineralization*. *Macromolecular Bioscience*, 1800080. doi:10.1002/mabi.201800080
43. Villarreal-Ramirez E, Eliezer D, Garduño-Juarez R, Gericke A, Perez-Aguilar JM, Boskey A. Phosphorylation regulates the secondary structure and function of dentin phosphoprotein peptides. *Bone*. 2017 Feb;95:65-75. doi: 10.1016/j.bone.2016.10.028. Epub 2016 Nov 1. PMID: 27810285; PMCID: PMC5234040.
44. Chien YC, Tao J, Saeki K, Chin AF, Lau JL, Chen CL, De Yoreo JJ. Using Biomimetic Polymers in Place of Noncollagenous Proteins to Achieve Functional Remineralization of Dentin Tissues. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2017 3(12), 3469–3479. doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00378
45. Xiao Z, Que K, Wang H, An R, Chen Z, Qiu Z, Lin M, Song J, Yang J, Lu D, Shen M, Guan B, Wang Y, Deng X, Yang X, Cai Q, Deng J, Ma L, Zhang X, Zhang X. Rapid biomimetic remineralization of the demineralized enamel surface using nano-particles of amorphous calcium phosphate guided by chimaeric peptides. *Dent Mater*. 2017 Nov;33(11):1217-1228. doi: 10.1016/j.dental.2017.07.015. Epub 2017 Jul 31. PMID: 28774431.
46. Chen Z, Cao S, Wang H, Li Y, Kishen A, Deng X, Yang X, Wang Y, Cong C, Wang H, Zhang X. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. *PLoS One*. 2015 Jan 14;10(1):e0116553. doi: 10.1371/journal.pone.0116553. PMID: 25587986; PMCID: PMC4294661.
47. Muşat V, Anghel EM, Zaharia A, Atkinson I, Mocioiu OC, Buşilă M, Alexandru P. A Chitosan-Agarose Polysaccharide-Based Hydrogel for Biomimetic Remineralization of Dental Enamel. *Biomolecules*. 2021 Aug 2;11(8):1137. doi: 10.3390/biom11081137. PMID: 34439803; PMCID: PMC8392529.
48. Campodoni E, Dozio SM, Panseri S, Montesi M, Tampieri A, Sandri M. Mimicking Natural Microenvironments: Design of 3D-Aligned Hybrid Scaffold for Dentin Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Jul 23;8:836. doi: 10.3389/fbioe.2020.00836. PMID: 32793577; PMCID: PMC7390955.