



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO EM ENDODONTIA. MITO OU REALIDADE?**

Trabalho submetido por  
**Nicole Sónia Pontes de Melo Xavier Pinto**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Outubro de 2014**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **REPARAÇÃO E REGENERAÇÃO EM ENDODONTIA. MITO OU REALIDADE?**

Trabalho submetido por  
**Nicole Sónia Pontes de Melo Xavier Pinto**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Doutor João Eduardo Fonseca Freitas Dias**

**Outubro de 2014**



À minha mãe,

Pelo amor e apoio incondicional.

Palavras nunca poderão descrever o teu esforço para que tudo fosse possível.

Obrigado por acreditares quando menos acreditei.



## **AGRADECIMENTOS**

O trabalho aqui desenvolvido foi fruto de muito esforço, dedicação e vontade. Considero-o a minha pequena grande vitória que assinala o fim destes anos de grande luta e também de alegrias. Mas, nada seria possível se não tivesse comigo, presencialmente ou não, as pessoas que me motivaram a querer e a fazer melhor.

Ao meu orientador, Doutor João Dias, pela paciência e motivação para que fosse além das minhas capacidades.

À Sara Rosa, por ser a voz da razão quando a vontade me falhava e por me acompanhar e motivar nestes 16 anos.

Ao Ricardo Neto, pela dedicação, atenção e especialmente por nunca deixar de acreditar em mim.

À Ana Rita Marta, colega de box na clínica, por me ter acompanhado neste percurso.

À Filipa Gomes, pelo apoio e amizade.

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram neste percurso.

Obrigada.



## RESUMO

A reparação e regeneração surgem como conceitos muito semelhantes, no entanto, são muito distintos. A reparação diz respeito a uma polpa ainda viva e regeneração, por sua vez, a uma polpa já necrosada.

A opção final de tratamento para um dente necrosado tem sido, até à data, o tratamento endodôntico radical, a apexificação e nos casos mais severos, onde nenhuma das opções anteriores é passível de ser implementada, a exodontia. Os procedimentos regenerativos surgem por necessidade de restabelecer as porções lesadas num dente para que este possa manter-se em função na boca, sem alteração do arco dentário.

A Medicina Regenerativa aplicada à Medicina Dentária procura, por métodos que eventualmente poderão ser colocados em prática corrente num ambiente de consultório, regenerar as estruturas dentárias lesadas. Na área da Endodontia é procurada, essencialmente, a regeneração da polpa e por conseguinte da dentina pretendendo, ao mesmo tempo, encerrar os ápices radiculares. Este encerramento pretende evitar a contaminação do espaço ocupado pela polpa e, simultaneamente, permitir o desenvolvimento normal radicular em casos de desenvolvimento incompleto.

Existem atualmente vários métodos em estudo tais como a revascularização pulpar, utilização de *scaffolds*, técnicas *cell-based* (implantação) e *cell-free* (ex. *homing* celular), impressão tridimensional celular, terapia genética e, por último, e talvez mais importante, o uso de células estaminais. Atualmente existem já na literatura múltiplos estudos que comprovam o potencial de regeneração de uma estrutura pelo uso da tríade *scaffold*/células estaminais/fatores de crescimento.

Mediante este contexto, esta revisão narrativa pretende clarificar os conceitos de reparação e regeneração, qual a aplicabilidade de cada um deles mediante a situação em questão e, ainda, enumerar e explicar cada uma das técnicas atualmente em estudo no que diz respeito a engenharia tecidual aplicada à Endodontia tentando sempre demonstrar o que já foi realizado e quais são as perspetivas futuras nesta área.

**Palavras-chave:** Reparação pulpar, Endodontia Regenerativa, células estaminais dentárias, *scaffold* dentário.



## **ABSTRACT**

The repair and regeneration appear as very similar concepts, however, they are very different. Repair relates to a pulp that is still alive and regeneration in turn, to a necrotic pulp.

The final treatment option for a necrotic tooth has been, to date, the radical Endodontic treatment, apexification and in the more severe cases, where none of the prior options is likely to be implemented, tooth extraction. Regenerative procedures arise from the need to re-establish the damaged portions in a tooth so that it can remain in function in the mouth, without altering the dental arch.

Regenerative Medicine applied to Dentistry looks, for methods that could possibly be put into current practice in an office environment, to regenerate damaged tooth structures. In the field of Endodontics it is essentially sought the regeneration of pulp and dentin therefore while seeking to terminate the root apexes. The closure intends to prevent contamination of the space occupied by the pulp and simultaneously to allow the normal root development in cases of incomplete development.

There are several methods currently under study such as pulp revascularization, use of scaffolds, cell-based techniques (implantation) and cell-free (e.g. cellular homing), three-dimensional cell printing, gene therapy and lastly and perhaps most importantly, the use of stem cells. Currently there are already multiple studies in the literature that demonstrate the potential for regeneration of a structure by using the triad scaffold/stem cell/growth factors.

Through this context, this narrative review aims to clarify the concepts of repair and regeneration, the applicability of each of them according to the situation in question and still enumerate and explain each of the techniques currently being studied with regard to tissue engineering applied to Endodontics always trying to show what has been accomplished and what are the future prospects in this area.

**Keywords:** Pulp repair, Regenerative Endodontics, dental stem cells, dental scaffold.



## ÍNDICE

I- INTRODUÇÃO .....	20
II- DESENVOLVIMENTO.....	22
1- Reparação .....	22
1.1- Proteção pulpar indireta .....	24
1.2- Proteção pulpar direta.....	25
1.3- Pulpotomia .....	26
2- Regeneração.....	28
2.1- Fatores de crescimento .....	33
2.2- Revascularização do canal radicular por coagulação sanguínea .....	39
2.3- Células estaminais .....	45
2.3.1- Células estaminais de origem dentária.....	49
2.3.1.1- SHED.....	50
2.3.1.2- DPSC .....	52
2.3.1.3- SCAP .....	54
2.3.1.4- DFPC .....	55
2.3.1.5- PDLSC.....	55
2.3.2- Isolamento de células estaminais dentárias .....	59
2.4- Técnica <i>cell-based</i> estaminal para regeneração da polpa/dentina ou Implantação pulpar .....	61
2.5- Técnica <i>cell-free</i> .....	63
2.6- <i>Scaffold</i> .....	65
2.6.1- <i>Scaffold</i> injetável.....	73
2.6.2- Uso de um hidrogel peptídico de auto-montagem personalizado para engenharia de tecidos pulpares.....	74
2.7- Impressão celular tridimensional.....	75
2.8- Terapia genética.....	76

III- CONCLUSÃO .....	80
IV- BIBLIOGRAFIA .....	82

## Índice de Figuras

- Figura 1. Representação esquemática de lesões tecidulares: leve ou mais intensa. A lesão tecidular de caráter mais leve provoca um aumento local de odontoblastos que secretam matriz de dentina reacional, por sua vez, na mais intensa pode ocorrer morte de odontoblastos. Se o ambiente for favorável poderá ocorrer diferenciação de células semelhantes a odontoblastos a partir de células estaminais para secreção de matriz de dentina reparadora (Fonte: Smith, Lumley, Tomson & Cooper, 2008). ..... 23
- Figura 2. Vista oclusal do segundo pré-molar inferior direito de aparência intacta e sem cáries e, ainda, radiografia pré-operativa com abertura apical e radiotransparência periradicular (Fonte: Banchs & Trope, 2004). ..... 42
- Figura 3. Radiografia realizada 26 dias após uso da pasta tri-antibiótica em que já são evidentes sinais radiográficos de reparação (Fonte: Banchs & Trope, 2004). ..... 42
- Figura 4. Radiografia realizada aos 24 meses em que o dente apresenta desenvolvimento completo radicular (Fonte: Banchs & Trope, 2004). ..... 42
- Figura 5. Propriedades das células estaminais (Fonte: Bragança, Tavares & Belo, 2010). ..... 45
- Figura 6. Nicho de células estaminais adultas- Formação de microambientes que fornecem sinais extrínsecos tais como moléculas intercelulares de sinalização, interações entre células estaminais e matriz extracelular, e com células vizinhas. Estes sinais conjuntamente com sinais intrínsecos celulares determinam a conduta e destino das células estaminais podendo, ainda, ocorrer interferência por meio de condições externas como a temperatura (Fonte: Bragança, Tavares & Belo, 2010). ..... 46
- Figura 7. As células estaminais isoladas a partir de tecido pulpar de dentes decíduos possuem elevada capacidade proliferativa e são capazes de se diferenciarem em odontoblastos maduros, adipócitos ou células neurais (Fonte: Soares, Knop, Jesus & Araújo, 2006). ..... 51

Figura 8. Estratégias de regeneração pulpar. B- *Scaffold* biodegradável preparado no interior do canal com posterior sedimentação conjunta com SHED ou SHED com células endoteliais. C-Ampliação do fragmento dentário/*scaffold* com evidência da interface entre dentina e *scaffold*. D-Visualização 14 dias após transplantação em ratos imunodeficientes, a baixa ampliação, de polpa dentária criada com SHED e células primárias endoteliais microvasculares dérmicas humanas. E-Visualização da área marcada em (D) a grande ampliação. (Fonte: Cordeiro et al., 2008). ..... 52

Figura 9. Reconhecimento de marcadores estaminais por meio de ligação de moléculas fluorescentes à molécula sinalizadora (Fonte: Correia & Bragança, 2010). ..... 61

Figura 10. Processo *cell-based* para regeneração pulpar (Fonte: Sun, Jin, Yu & Chen, 2011). ..... 62

Figura 11. Técnicas *cell-free* e *cell-based*. (a) Técnica de transplantação celular ou *cell-based*- as células estaminais são depositadas nos canais radiculares sob a forma de *scaffolds*. Ocorre regeneração não só pelo fornecimento de células mas também por fatores de crescimento sob forma de fatores tróficos. (b) Técnica *cell-free*- os *scaffolds* encontram-se repletos com fatores de crescimento sendo então injetados no espaço do canal de forma a induzir migração, proliferação e posterior diferenciação de células endógenas estaminais residentes no ápice radicular (Fonte: Kim et al., 2013). ..... 65

Figura 12. Combinação de (a) células estaminais, (b), fatores de crescimento e (c) matriz de *scaffold* numa construção tridimensional dentária ou injeção no local pretendido para regeneração do dente ou elementos deste (Sharma, Srivastava, Grover & Sharma, 2014). ..... 66

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Proteção pulpar indireta (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011). .....	25
Tabela 2. Proteção pulpar direta (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011). .....	26
Tabela 3. Domínios necessários para o desenvolvimento de técnicas regenerativas endodônticas (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves, 2007). .....	29
Tabela 4. Técnicas em estudo para uso regenerativo endodôntico (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves, 2007). .....	32
Tabela 5. Fonte, atividade e utilidade de diferentes fatores de crescimento (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves 2007). .....	34
Tabela 6. Instruções e composição da pasta antibiótica (Adaptada de: Trope, 2008). ....	40
Tabela 7. Apexificação (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011). .....	44
Tabela 8. Géneros de células estaminais (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves 2007). .....	47
Tabela 9. O potencial de diferenciação de diferentes células estaminais mesenquimais de origem dentária (Adaptada de: Ulmer, Winkel, Kohorst & Stiesch, 2010). .....	56
Tabela 10. Marcadores de células estaminais dentárias (Fonte: Morsczeck et al., 2008). .....	60
Tabela 11. Representação das propriedades, vantagens e desvantagens de biomateriais naturais utilizados como <i>scaffolds</i> (Adaptada de: Tarun, Ajay, Bhawna, Sunil & Ravi, 2011). .....	68
Tabela 12. Representação das propriedades, vantagens e desvantagens de biomateriais sintéticos utilizados como <i>scaffolds</i> (Adaptada de: Tarun, Ajay, Bhawna, Sunil & Ravi, 2011). .....	70
Tabela 13. <i>Scaffolds</i> estudados por vários investigadores (Adaptada de: Bansal & Bansal, 2011). .....	71

Tabela 14. Vetores virais estudados no âmbito de terapia genética por múltiplos autores (Adaptada de: Bansal & Bansal, 2011). .....	77
Tabela 15. Terapia genética- método <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> para confecção de células para aplicação em terapia (Adaptada de: Nakashima & Akamine, 2005).....	78

## **Abreviaturas**

**BMMSC-** do inglês *bone marrow mesenchymal stem cells* (células estaminais mesenquimais da medula óssea)

**BMP-** do inglês *bone morphogenic protein* (proteína morfogénica óssea)

**CD-** do inglês *clusters of differentiation* (molécula ou antígeno presente na superfície de uma célula)

**CGF-** do inglês *cementum-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de cimento)

**CSF-** do inglês *colony-stimulating factor* (fator de crescimento de colónias)

**DFPC-** do inglês *dental follicle precursor cell* (célula estaminal do folículo dentário)

**DMP1-** do inglês *dentin matrix acidic phosphoprotein 1* (fosfoproteína acídica de matriz dentinária 1)

**DPC-** do inglês *direct pulp capping* (proteção pulpar direta)

**DPSC-** do inglês *dental pulp stem cell* (célula estaminal da polpa dentária)

**ECM-** do inglês *extracellular matrix* (matriz extracelular)

**EGF-** do inglês *epidermal growth factor* (fator de crescimento epidérmico)

**ESC-** do inglês *embryonic stem cell* (célula estaminal embriónica)

**FACS-** do inglês *fluorescence activated cell sorting* (separação de células ativadas por fluorescência)

**FGF-** do inglês *fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblastos)

**HA/TCP-** do inglês *hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate* (hidroxiapatite/fosfato tricálcico  $\beta$ )

**HDMEC-** do inglês *human dermal microvascular endothelial cell* (célula endotelial microvascular dérmica humana)

**HLA-DR-** molécula recetora de superfície

**HSP-** do inglês *hydrostatic pressure* (pressão hidrostática)

**IGF-** do inglês *insulin-like growth factor* (fator de crescimento insulínico)

**iPSC-** do inglês *induced pluripotent stem cell* (célula estaminal pluripotente induzida)

**IPT-** do inglês *indirect pulp treatment* (tratamento pulpar indireto)

**LAB-** do inglês *living autologous fibrous bone tissue* (tecido ósseo fibroso autólogo vivo)

**MTA-** do inglês *mineral trioxide aggregate* (agregado mineral trióxido)

**MSC-** do inglês *mesenchymal stem cell* (célula estaminal mesenquimal)

**PBS-** do inglês *phosphate buffered saline* (tampão fosfato salino)

**PDGF-** do inglês *platelet-derived growth factor* (fator de crescimento derivado de plaquetas)

**PDLSC-** do inglês *periodontal ligament stem cell* (célula estaminal do ligamento periodontal)

**PLG-** do inglês *poly glycolic acid* (ácido poliglicólico)

**PLLA-** do inglês *poly-l-lactide* (ácido poli-l-lático)

**PRP-** do inglês *platelet-rich plasma* (plasma rico em plaquetas)

**SCAP-** do inglês *stem cell from the apical papilla* (célula estaminal da papila apical)

**SHED-** do inglês *stem cell from human exfoliated deciduous teeth* (célula estaminal de dentes decíduos esfoliados humanos)

**STRO-1-** do inglês *trypsin-resistant cell-surface antigen* (antígeno de superfície celular resistente a tripsina)

**RGD-** do inglês *arginyl-glycyl-aspartic acid* (motivo de adesão celular arginina-glicina-ácido aspártico)

**TGF- $\beta$ -** do inglês *transforming growth factor beta* (fator de crescimento transformador beta)

**VEGF-** do inglês *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento endotelial vascular)

## I- INTRODUÇÃO

Entende-se a polpa dentária como sendo um tecido heterogéneo, altamente vascularizado, com nervos mielinizados e não mielinizados, que contém em si múltiplos tipos celulares e moléculas da matriz extracelular e, cuja função primordial é a produção de dentina primária, secundária e terciária. A polpa possui, ainda, funções de nutrição da dentina e, de agir como um biossensor para deteção de estímulos lesivos. Por sua vez, a dentina é um dos principais tecidos mineralizados da estrutura dentária sendo constituída por múltiplos túbulos que interpenetram toda a sua estrutura. Estes dois tecidos estão em estrita relação sendo muitas vezes difícil de distinguir estas duas entidades uma vez que, a dentina encapsula a polpa em toda a sua extensão (Zhang & Yelick, 2010).

É importante que a função da polpa dentária seja mantida, uma vez que a perda desta é vulgarmente procedida de fratura da estrutura dentária, doença periapical ou/e perda do dente em si. Esta manutenção revela-se importante, pois mediante uma infeção da polpa torna-se necessário removê-la, com posterior desinfeção do canal e preenchimento do espaço com um material artificial. A regeneração endodôntica ergue-se então como uma possível alternativa aos métodos tradicionais, ao remover a polpa necrótica e substituí-la por tecido pulpar regenerado (Tatullo, Marrelli, Shakesheff & White, 2014).

Os primeiros trabalhos, que dizem respeito a regeneração dentária, têm aproximadamente 50 anos, e descrevem o uso de hidróxido de cálcio para fins de terapia de vitalidade pulpar e, ainda, um possível restabelecimento do complexo pulpo-dentinário em dentes permanentes necrosados através de um processo de revascularização baseado na importância da formação de um coágulo sanguíneo para reparação da lesão. Estes primeiros trabalhos permitiram que o foco se mantivesse sobre este tema. Assim, nas últimas décadas os procedimentos de regeneração dentária têm continuado a evoluir de forma a tornarem-se um campo vital no que diz respeito a tratamento Médico Dentário (Hargreaves & Cohen, 2011).

As novas ideias de engenharia tecidual surgiram no final da década de 80 sendo um dos componentes principais o *scaffold*, um material capaz de conter células e permitir o seu crescimento (Huang, 2009).

Segundo Hargreaves, Diogenes e Teixeira (2013) o objetivo da regeneração de tecidos, ou seja, a constituição de novo tecido que mimetize tanto a anatomia como função do tecido original é, de facto, distinto do objetivo da reparação tecidular sendo esta responsável, por exemplo, pelo desenvolvimento de um tecido de substituição sem que ocorra restauro da função.

Para Goldberg e Schmalz (2011), reparação e regeneração pulpar são dois eventos que indicam duas abordagens terapêuticas distintas, porém, estes dois termos são vulgarmente associados e utilizados de forma imprecisa como se fossem duas realidades indistinguíveis. No entanto, estes dois termos referem-se a realidades clínicas que não são justapostas.

## **II- DESENVOLVIMENTO**

### **1- Reparação**

A Endodontia, área da Medicina Dentária que diz respeito à morfologia, fisiologia, patologia da polpa dentária e tecidos periradiculares, possui como objetivo final a prevenção e/ou eliminação de periodontite apical. Esta, por sua vez, surge pela presença de polpa necrótica infetada, por libertação de metabolitos tóxicos e subprodutos no interior do canal dentário, com posterior difusão destes pelos tecidos periapicais desencadeando uma resposta inflamatória e, subsequente reabsorção óssea. Por outro lado, caso a polpa se encontre vital, poucas ou nenhuma bactérias estarão presentes nos canais tornando-se, assim, imperativa a sua preservação e terapia de forma a prevenir desenvolvimento de problemas periapicais (Cohenca, Paranjpe & Berg, 2013).

A reparação pulpar diz respeito à promoção da cura da polpa, ainda viva, cujos sintomas clínicos devem indicar uma lesão reversível. Como tal, esta reparação deve ocorrer após tratamento de uma lesão por proteção pulpar indireta ou direta da polpa seguida de restauração com um material biocompatível (Goldberg & Schmalz, 2011).

Teoricamente, a polpa possui capacidade de auto-reparação pela possibilidade de regeneração de tecidos tanto mineralizados como pulpares. Assim, face a uma lesão no dente são mobilizados odontoblastos que promovem uma resposta à colonização de microrganismos presentes nos túbulos dentinários produzindo, então, dentina esclerótica reacional de forma a criar uma barreira de proteção em torno da polpa. Em lesões de cárie mais severas, estes odontoblastos e várias outras células morrem no seguimento da resposta inflamatória. Neste caso, são recrutadas células progenitoras mesenquimais para o local, por meio de sinais que incluem produtos de degradação da matriz dentinária, que se diferenciam em odontoblastos, de maneira a formar dentina de reparação. Encontram-se ainda, no tecido pulpar, células de capacidade multipotente que podem responder a possíveis lesões e, para além disso, representam potencial de vascularização capaz de regenerar tecido pulpar funcional (Colombo, Moore, Hartgerink & D'Souza, 2014).

O termo dentinogênese terciária, como resposta a um processo regenerativo do complexo pulpo-dentinário, é utilizado de forma muito pouca rigorosa uma vez que os tecidos formados poderão apresentar desde uma estrutura com tubularidade regular, assemelhando-se assim a dentina primária de carácter fisiológico, a um tecido sem presença de túbulos e com poucas características morfológicas que se assemelhem a dentina (Sloan & Smith, 2007).

Ambas as dentinas reacional e reparadora parecem, ainda que superficialmente, muito parecidas pois levam a deposição de matriz na interface pulpo-dentinária sob o local de lesão, no entanto, uma diferença fundamental entre estas dentinas é a presença na dentina reacional de continuidade tubular o que geralmente não é observado na de reparação (Fig. 1) (Smith, Lumley, Tomson & Cooper, 2008).

A dentinogênese para formação de dentina reparadora, sendo esta caracterizada por possuir menos matriz e menos túbulos que as restantes, necessita do recrutamento de células estaminais subjacentes à polpa não infetada e diferenciação destas em *odontoblast-like cells*, ou seja, em células semelhantes a odontoblastos. Estas células são responsáveis pela formação de dentina, osteodentina ou ainda de tecido de cicatrização mineralizado (Lin & Rosenberg, 2011).

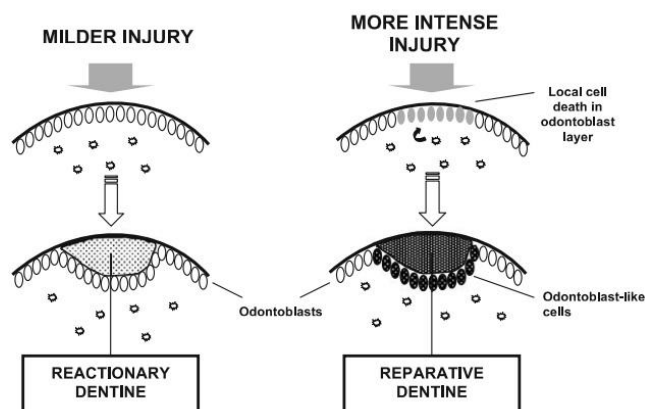


Figura 1. Representação esquemática de lesões tecidulares: leve ou mais intensa. A lesão tecidular de carácter mais leve provoca um aumento local de odontoblastos que secretam matriz de dentina reacional, por sua vez, na mais intensa pode ocorrer morte de odontoblastos. Se o ambiente for favorável poderá ocorrer diferenciação de células semelhantes a odontoblastos a partir de células estaminais para secreção de matriz de dentina reparadora (Fonte: Smith, Lumley, Tomson & Cooper, 2008).

A terapia de vitalidade pulpar visa tratar lesões pulpares de carácter reversível permitindo a manutenção da vitalidade e função pulpar tanto em dente decídua como em permanente. Esta terapia inclui duas abordagens terapêuticas sendo elas o tratamento pulpar indireto (IPT), em situações de cárie profunda dentinária, e proteção pulpar direta (DPC) ou pulpotomia, em situações de exposição pulpar (Fuks, 2008).

O êxito associado à terapia vital pulpar depende do tipo e localização da lesão, do tipo de tratamento efetuado e ainda da integridade da restauração e idade do dente em questão (Sun, Jin, Yu & Chen, 2011).

### **1.1- Proteção pulpar indireta**

A proteção pulpar indireta é um procedimento utilizado de forma a proteger os odontoblastos primários, ainda que alguns sejam destruídos de acordo com o envolvimento do complexo pulpo-dentinário, e para formação de dentina reacional ou de reparação na junção pulpo-dentinária (Ghoddusi, Forghani & Parisay, 2014).

Segundo Lin e Rosenberg (2011) podem participar, por libertação a partir da matriz de dentina, proteínas morfogénicas ósseas (BMPs), fatores de crescimento angiogénicos e fatores de crescimento insulínico (IGFs) no processo de dentinogénese reacional. Neste processo, a regulação positiva de odontoblastos resulta de um aumento da atividade de síntese da proteína de colagénio dentinária mediante o aumento da atividade de transcrição de genes. Os fatores de crescimento, por sua vez, podem atuar como moléculas sinalizadoras e, assim, ligar-se a recetores à superfície dos odontoblastos. Deste modo, a regulação da atividade ou expressão de genes durante a sua transcrição resulta da ligação do ligando ao recetor. Este procedimento é, no entanto, considerado altamente controverso por deixar, no local de lesão, cárie de forma a evitar exposição pulpar sendo colocado um material na porção de dentina cariada remanescente (Tab. 1).

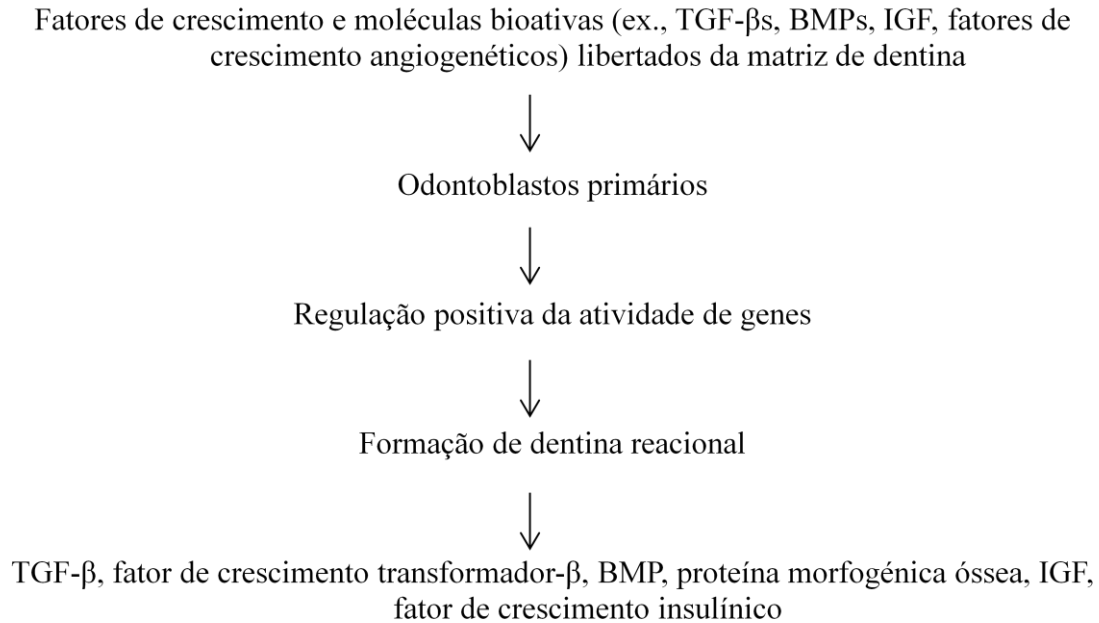


Tabela 1. Proteção pulpar indireta (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011).

## 1.2- Proteção pulpar direta

A proteção pulpar direta corresponde ao tratamento de uma exposição pulpar mecânica ou traumática. Esta proteção faz-se por selamento da exposição com um biomaterial que auxilia na formação de dentina de reparação e manutenção da vitalidade do tecido pulpar (Ghoddusi et al., 2014).

O dente deve apresentar-se assintomático, livre de contaminantes e a exposição pulpar em questão deve ser de reduzido diâmetro (Fuks, 2008).

De acordo com Lin e Rosenberg (2011), quando ocorre exposição pulpar, localmente, os odontoblastos primários conjuntamente com outras células do tecido pulpar são destruídos ocasionando, assim, inflamação. Se esta for controlada, células residentes poderão ser regeneradas. Desta forma, é colocado um material, geralmente hidróxido de cálcio ou agregado mineral trióxido (MTA), diretamente no local de exposição pulpar de maneira a auxiliar no processo de formação de dentina de reparação e, por conseguinte obter manutenção pulpar. Estes materiais de proteção pulpar poderão, possivelmente, causar formação de dentina reparadora por libertação de fatores de crescimento TGF-1, TGF-2, BMP-2 e IG-1 juntamente com moléculas bioativas que

induzem necessária sinalização em células estaminais para a sua diferenciação em células que se assemelham a odontoblastos na polpa para posterior produção de matriz dentinária (Tab. 2).

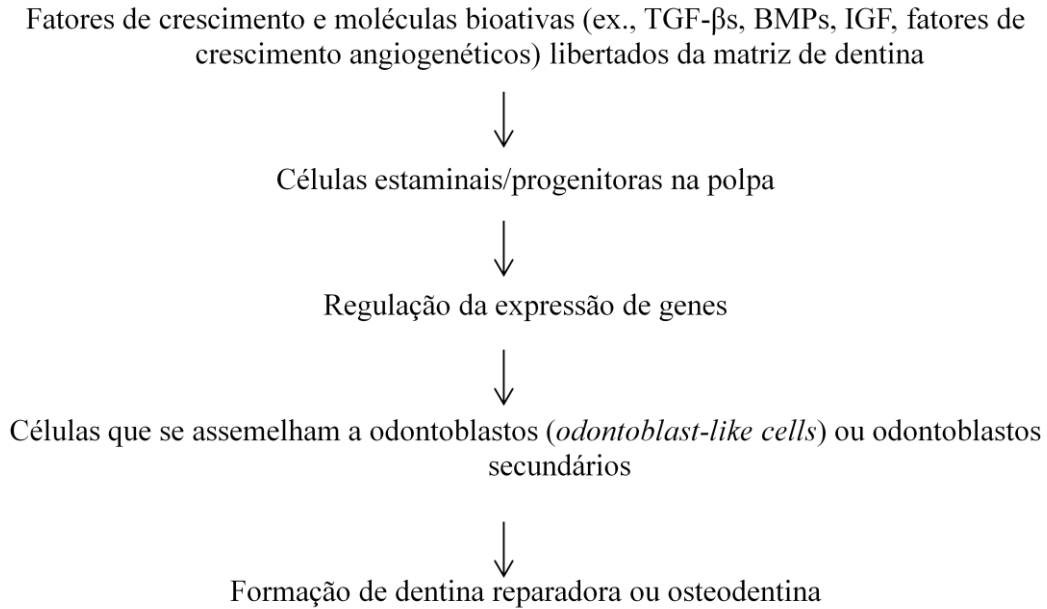


Tabela 2. Proteção pulpar direta (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011).

### 1.3- Pulpotomia

A proteção pulpar é considerada adequada em situações de exposição imediata mínima, porém, em casos de lesões tais como cáries que tenham sofrido exposição microbiana por um período de tempo, a pulpotomia parcial é mais recomendada (Hørsted-Bindslev & Bergenholtz, 2010).

Pulpotomia é um procedimento no qual é removido tecido pulpar da porção coronária do dente de forma a preservar a porção radicular, sendo esta última, selada com hidróxido de cálcio com o objetivo de estimular a formação de uma ponte dentinária. Os odontoblastos primários, e várias outras células da polpa coronária, são destruídos após a realização deste processo sendo, aqui, a inflamação muito mais grave do que a verificada após procedimentos de proteção pulpar. Neste caso, é necessário que ocorra maior concentração e posterior diferenciação de células progenitoras em células semelhantes a odontoblastos (*odontoblast like-cells*) na porção pulpar remanescente sendo o restante processo, que visa formação da ponte de dentina, semelhante àquele que ocorre na proteção pulpar (Lin & Rosenberg, 2011).

A pulpotomia permite remover com uma broca diamantada, para além de dentina, 1-2 mm de profundidade da porção infetada e mais superficial de tecido pulpar, sendo necessário que o sangramento associado a este procedimento seja controlado bem como a eliminação de quaisquer coágulos sanguíneos que eventualmente possam vir a formar-se, pela possibilidade de constituírem locais de crescimento de microrganismos passíveis de contaminar o meio. O material de proteção pulpar deverá ser colocado de forma delicada para evitar a sua dilaceração e deslocamento para porções mais profundas da polpa (Hørsted-Bindslev & Bergenholtz, 2010).

Os materiais de proteção, ao permitirem regeneração do complexo pulpo-dentinário, foram relacionados com o estímulo para a diferenciação de células progenitoras pulpares em células semelhantes a odontoblastos ou, ainda, com a secreção de TGF- $\beta$ 1 (Abou Neel, Chrzanowski, Salih, Kim & Knowles, 2014).

O hidróxido de cálcio tem sido utilizado de forma convencional como método de proteção pulpar promovendo formação de uma ponte de dentina sobre pequenos locais de exposição pulpar (Edwards & Mason, 2006).

As pastas e suspensões de hidróxido de cálcio têm um pH elevado, desta forma, quando são aplicadas cauterizam o tecido e causam necrose superficial numa extensão muito reduzida. Pouco tempo após proteção pulpar com hidróxido de cálcio, apresenta-se formação de uma camada superficial de tecido necrótico e infiltrados de células inflamatórias, o tecido sofre reorganização, os coágulos sanguíneos sofrem resolução, o processo inflamatório diminui e forma-se uma matriz rica em colagénio relacionada com o material de proteção pulpar ou zona necrótica com posterior formação de tecido amorfo (Hørsted-Bindslev & Bergenholtz, 2010).

O agregado mineral trióxido ou MTA é um material resistente à infiltração bacteriana que pode ser utilizado em proteção pulpar permitindo a reparação, por promoção do processo de dentinogénese, e continuação da manutenção da vitalidade do tecido pulpar quando usado de forma concomitante com adequada restauração. Pela utilização deste material observam-se semelhanças quando comparado a hidróxido de cálcio a nível da resposta pulpar ocorrendo proliferação, migração e diferenciação de células progenitoras em células que se assemelham a odontoblastos (Sun et al., 2011).

Embora o hidróxido de cálcio tenha vindo a ser utilizado em procedimentos de proteção pulpar direta e indireta por mais de uma década, segundo estudos recentes incluindo o de Fuks (2008), quando comparado com MTA, este último, tem-se revelado superior como material de proteção pulpar (Malhotra & Mala, 2012).

A proteção de polpa vital providencia a vantagem de manutenção da vitalidade da polpa dentária, porém, esta terapia só é recomendada para dentes que se apresentem assintomáticos ou que exibam sintomas de resposta inflamatória mínimos (Zhang & Yelick, 2010).

O mecanismo de reparação não é inteiramente entendido, porém, parece estar relacionado com odontoblastos secundários com formação de tecido duro, com possíveis inclusões e defeitos, diminuindo assim a eficácia de proteção da polpa (Hørsted-Bindslev & Bergenholtz, 2010).

Como o diagnóstico do estado pulpar se revela frequentemente difícil e falacioso pode conduzir, a que numa situação de terapia de vitalidade pulpar, seja necessário proceder a um tratamento endodôntico (Sun et al., 2011).

## **2- Regeneração**

A Medicina Regenerativa tem sofrido avanços ao longo dos anos devido, essencialmente, ao uso de agentes como o hidróxido de cálcio, utilizado em procedimentos de proteção pulpar visando a reparação desta, da utilização de biomoléculas e, atualmente, pelo estudo da biologia da polpa. Assim, cada vez mais, está a tornar-se possível a ideia de regeneração de tecido pulpar vital (Schmalz & Smith, 2014).

Podemos entender assim o conceito de procedimentos regenerativos endodônticos como sendo “procedimentos baseados biologicamente para substituição de estruturas danificadas incluindo dentina e estruturas radiculares e também de células do complexo pulpo-dentinário” (Chandki, Kala, Banthia & Banthia, 2012).

Segundo Murray, Garcia-Godoy e Hargreaves (2007), a primeira definição de engenharia tecidual teria sido muito provavelmente "um campo interdisciplinar que

aplica os princípios da engenharia e ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido".

Schamllz e Smith (2014) consideram que a regeneração visa restaurar a estrutura e função fisiológica dos tecidos por meio de abordagens de engenharia auxiliadas pelo desenvolvimento de terapias que se assemelhem a protocolos de tratamento recorrentes em prática clínica.

Os princípios da Medicina Regenerativa, segundo Murray et al. (2007), podem ser aplicados na área de Endodontia para regeneração de tecidos endodônticos. A Medicina Regenerativa aplicada à Endodontia implica pesquisa de células estaminais adultas, fatores de crescimento, cultura de tecidos e, ainda, de órgãos e materiais com o propósito de engenharia tecidual. Estas técnicas são frequentemente combinadas para criação de terapias regenerativas (Tab. 3).

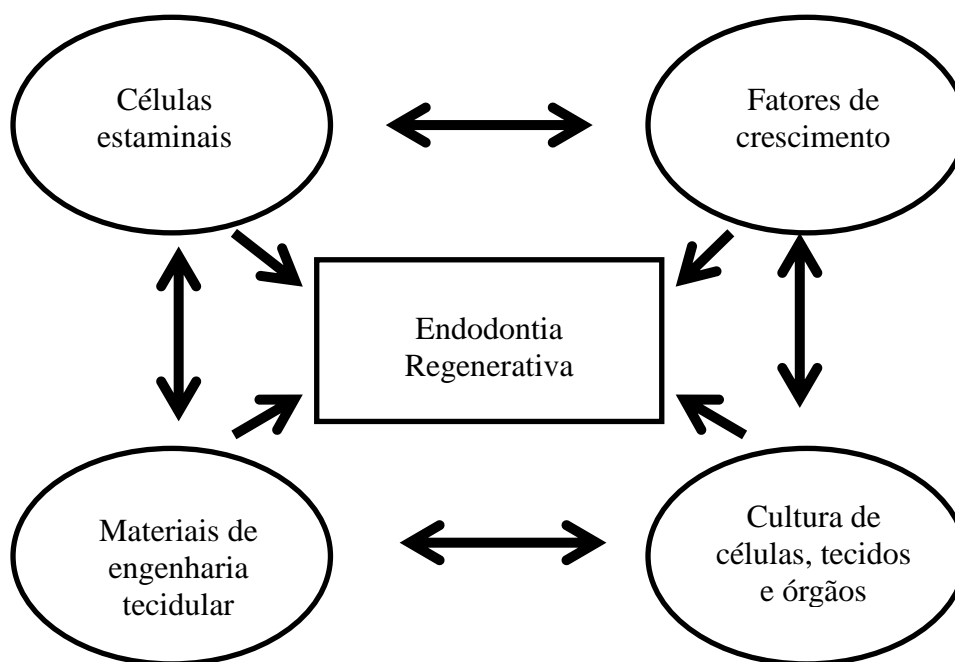


Tabela 3. Domínios necessários para o desenvolvimento de técnicas regenerativas endodônticas  
(Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves, 2007).

As fontes mais promissoras para uso em engenharia tecidual são as células estaminais, sendo assim, a pesquisa com uso destas continua a ser um dos mais ativos campos acadêmicos embora existam, ainda, questões não resolvidas e limitações de uso a elas associadas. Outro componente essencial na engenharia tecidual é o *scaffold*, um suporte físico, que deverá apoiar a vascularização e inervação do tecido pulpar. Para

engenharia tecidual são também necessários fatores de crescimento possuindo estes, ainda, desafios no que diz respeito à sua aplicação em Endodontia Regenerativa (Zhang & Yelick, 2010).

Com o uso de células espera-se que seja possível regenerar a polpa do espaço do canal radicular e, ainda, da câmara pulpar acompanhada de dentina nas paredes dentinárias (Huang, Al-Habib & Gauthier, 2013).

Foram realizadas tentativas, ainda que sem êxito, de regeneração de tecidos pulparem em 1960 e 1970 e, desde então, tem havido melhorias avassaladoras ao nível dos materiais, instrumentos e medicamentos disponíveis para uso clínico e, ainda, ao nível do conhecimento da biologia das células estaminais e engenharia tecidual. Estas melhorias têm permitido a elaboração de técnicas biológicas para a regeneração de uma estrutura pulpar funcional, no entanto, o foco principal no que diz respeito a esta temática tem sido fundamentalmente a nível de células principalmente pelo seu uso em procedimentos de transplantação. Porém existem dificuldades associadas devido a, nomeadamente, custos excessivos relativos a isolamento, manuseio, armazenamento e envio de células, manipulação *ex vivo* e possível rejeição imunitária e, ainda, à possibilidade de contaminação e transmissão de agentes patogénicos e potencial de formação de tumores (Sun et al., 2011).

Podem ser considerados dois tipos de engenharia e/ou regeneração pulpar tendo por base situações clínicas: regeneração pulpar parcial e síntese pulpar *de novo*. Os processos de infeção e inflamação pulpar são distintos até que a polpa sofra necrose na sua totalidade. Anteriormente à ocorrência de necrose é possível a recuperação do tecido pulpar remanescente após desinfeção. Para potenciar a regeneração, podem ser introduzidos tecidos pulparem gerados por engenharia no espaço pulpar de modo a permitirem a recuperação de tecido da polpa e geração de nova dentina. Por outro lado, quando todo o tecido pulpar é perdido, considera-se proceder a síntese pulpar *de novo* para regeneração tecidual (Huang, 2009).




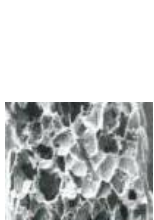

Para aumentar o potencial da regeneração parcial ou *in situ* poderão ser inseridos, no espaço pulpar, dispositivos médicos indutores ou construções de engenharia pulpar baseadas em células estaminais da polpa dentária (DPSCs) para auxiliar no processo de recuperação total de tecido pulpar/gerar nova dentina. Este tipo de regeneração parcial parece ser mais simples, prático e fidedigno quando comparado

com a síntese pulpar *de novo*, embora ainda, sejam necessários mais estudos clínicos controlados para fornecer evidência de efetividade. Quando todo o tecido pulpar é perdido, a síntese *de novo* da polpa deve ocorrer para que seja gerado novo tecido. Esta formação de tecido bem vascularizado, ao utilizar uma porção de dente como modelo, foi já descrita por vários grupos de investigadores tais como Cordeiro et al. (2008) ao usarem células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs) ou Prescott et al. (2008) ao usarem células estaminais da polpa dentária (DPSCs) (Sun et al., 2011).

A regeneração parcial pulpar parece ser uma técnica exequível, porém, a dificuldade a ela associada parece residir na avaliação da porção que deve ser mantida viva. É expectável a criação de tecido artificial pulpar para permuta de tecido, mesmo que este tenha sido totalmente destruído, a partir da utilização de células estaminais adultas pluripotentes ou embrionárias quando combinadas com *scaffolds* adequados. Pode, ainda, ser antecipada a atração de células endógenas com origem em nichos de células estaminais periapicais ou por migração celular da medula óssea adjacente por meio de moléculas da matriz extracelular (ECM) quando introduzidas no canal radicular desinfetado (Goldberg, 2011).

As técnicas *cell-based* e *cell-free* são dois tipos de abordagens utilizadas com o intuito de regenerar tecidos. A técnica *cell-free* faz uso de materiais, que não sejam células, como meios de tentativa de regeneração de tecido. No entanto, e até ao momento, não existem evidências de que de facto essa regeneração ocorra existindo assim subjacentes dificuldades de previsão da extensão da regeneração pulpar que possa eventualmente ocorrer. A técnica *cell-based* implica a introdução de células exógenas no hospedeiro de modo a promover regeneração dos tecidos (Huang et al., 2013).

Murray et al. (2007) consideram a tabela a seguir representada (Tab. 4) como sendo um marco inicial de identificação das principais prioridades de pesquisa no desenvolvimento de técnicas aplicáveis no campo da Endodontia Regenerativa. As técnicas apresentadas não se encontram em nenhuma ordem de prioridade específica, porém, representam uma sequência o mais próximo da realidade em termos de aplicabilidade em situações particulares:

Técnica	Imagem	Vantagens	Desvantagens
<p><b>Revascularização do canal radicular:</b> abrir ápice do dente até 1mm para permitir sangramento no interior dos canais radiculares</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Menor risco de rejeição imunitária</li> <li>○ Menor risco de transmissão de patógenos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Poucos relatos de caso publicados até à data</li> <li>○ Potencial risco de necrose se o tecido se tornar reinfestado</li> </ul>
<p><b>Terapia celular estaminal:</b> células estaminais autólogas ou alogénicas são colocadas no dente via matriz injetável</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Rápida</li> <li>○ Fácil colocação</li> <li>○ Menos dolorosa</li> <li>○ As células são fáceis de colher</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Baixa sobrevivência celular</li> <li>○ As células não produzem nova polpa funcional</li> <li>○ Elevado risco de complicações</li> </ul>
<p><b>Implantação pulpar:</b> tecido pulpar é cultivado em laboratório em folhas e implantado cirurgicamente</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ As folhas de células são fáceis de cultivar</li> <li>○ Mais estável do que uma injeção de células dissociadas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ As folhas não possuem vascularização por isso apenas pequenas construções são possíveis</li> <li>○ Deve ser projetado para encaixar adequadamente no canal radicular</li> </ul>
<p><b>Implante de scaffold:</b> células pulpares são colocadas num scaffold 3-D feito a partir de polímeros e cirurgicamente implantado</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ A estrutura suporta organização celular</li> <li>○ Alguns materiais podem promover vascularização</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Baixa sobrevivência celular após implantação</li> <li>○ Deve ser projetado para encaixar adequadamente no canal radicular</li> </ul>
<p><b>Impressão celular 3-D:</b> dispositivo tipo jato de tinta dispensa camadas de células num hidrogel passível de ser cirurgicamente implantado</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Múltiplos tipos celulares podem ser posicionados estrategicamente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Deve ser projetado para encaixar adequadamente no canal radicular</li> <li>○ A pesquisa inicial ainda não provou funcionalidade <i>in vivo</i></li> </ul>



<p><b>Scaffolds injetáveis:</b> hidrogéis polimerizáveis, somente ou contendo suspensões celulares são colocados por injeção</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fácil colocação</li> <li>○ Podem promover regeneração ao providenciar substituição para matriz extracelular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Controlo limitado sobre formação tecidular</li> <li>○ Baixa sobrevivência celular</li> <li>○ A pesquisa inicial ainda não provou funcionalidade <i>in vivo</i></li> </ul>
<p><b>Terapia genética:</b> genes mineralizadores são transferidos para as células pulpares vitais de dentes necróticos e sintomáticos</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Pode evitar a limpeza e modelação de canais radiculares</li> <li>○ Pode evitar a necessidade de implantação de células estaminais</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ A maioria das células num dente necrótico encontra-se já morta</li> <li>○ Difícil de controlar</li> <li>○ Risco de problemas de saúde</li> <li>○ Não aprovado pela FDA</li> </ul>

Tabela 4. Técnicas em estudo para uso regenerativo endodôntico (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves, 2007).

## 2.1- Fatores de crescimento

A implantação de células estaminais, para além da necessidade de um *scaffold* apropriado, necessita também de fatores de transcrição, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular (ECM), que induzem vias de diferenciação específicas e mantêm o fenótipo de odontoblastos (Sun et al., 2011).

Fatores de crescimento são por definição “proteínas que se ligam a recetores na célula e induzem proliferação e/ou diferenciação celular” (Murray et al., 2007).

Estes fatores “regulam a divisão ou especialização de células estaminais para o tipo celular pretendido e medeiam eventos celulares essenciais na regeneração tecidular incluindo proliferação, quimiotaxia, diferenciação e síntese de matriz.” (Saber, 2009).

Vários processos biológicos são regulados por sinais solúveis que usualmente ocorrem localmente, como tal, a colocação de fatores de crescimento pode ser utilizada

para modulação do comportamento celular, maturação e formação de tecidos (Hacking & Khademhosseini, 2009).

Para que a Endodontia Regenerativa tenha um forte impacto sobre a prática clínica, esta deve centrar-se essencial e primariamente, na prestação de terapias eficazes com fim a regenerar tecido pulpar funcional e, se possível, também restaurar a estrutura de dentina perdida. Assim, alguns investigadores conseguiram mimetizar ou complementar as respostas reparadoras do dente através de uma melhor compreensão dos processos biológicos de mediação da reparação tecidual. A dentina contém múltiplas proteínas capazes de estimular respostas a nível dos tecidos. A desmineralização de tecidos dentários após a aplicação de agentes condicionadores na cavidade, materiais restauradores e até cárie pode levar à libertação de fatores de crescimento. Assim, é possível que o efeito terapêutico do hidróxido de cálcio se deva substancialmente à extração de fatores de crescimento a partir da matriz de dentina (Murray et al., 2007).

Fatores como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento insulínico (IGF), o fator de estimulação de colónias (CSF) e o fator de crescimento epidérmico (EGF) são utilizados para aumentar o número de células estaminais. Por sua vez, as interleucinas (1-13) atuam como moduladores das respostas imunes, humorais e celulares. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) detém um importante papel no processo de angiogénese e, os fatores de crescimento transformante alfa e beta são importantes no que diz respeito a processos de cicatrização e regeneração de tecidos (Saber, 2009).

Segundo Murray et al. (2007), a tabela a seguir representada (Tab. 5) indica a origem, atividade e utilidade de alguns fatores de crescimento mais comuns:

<b>Abreviação</b>	<b>Fator</b>	<b>Fonte principal</b>	<b>Atividade</b>	<b>Utilidade</b>
<b>BMP</b>	Proteína morfogénica óssea	Matriz óssea	BMP induz diferenciação de osteoblastos e mineralização	BMP é utilizada para induzir as células estaminais a sintetizarem e secretarem matriz

			óssea	mineral
<b>CSF</b>	Fator estimulador de colónias	Vasta gama de células	CSFs são citocinas que estimulam a proliferação de células estaminais ósseas pluripotentes específicas	CSF pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais
<b>EGF</b>	Fator de crescimento epidermal	Glândulas submaxilares	EGF promove a proliferação de células mesenquimais, gliais e epiteliais	EGF pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico	Vasta gama de células	FGF promove a proliferação de várias células	FGF pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais
<b>IGF</b>	Fator de crescimento insulínico I ou II	I-fígado II- variedade de células	IGF promove a proliferação de vários tipos celulares	IGF pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais
<b>IL</b>	Interleucinas IL-1 a IL-13	Leucócitos	ILs são citocinas que estimulam as respostas imunitárias, humoral e celular	Promove a atividade inflamatória celular

<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas	Plaquetas, células endoteliais, placenta	PDGF promove a proliferação de tecido conjuntivo, células gliais e do músculo liso	PDGF pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Fator de crescimento transformado r-alfa	Macrófagos, células cerebrais e queratinócitos	TGF- $\alpha$ pode ser importante para a normal reparação de lesões	Induz desenvolvimento epitelial e de estrutura tecidual
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformado r-beta	Matriz de dentina, células TH1 ativadas, células ( <i>T-helper</i> ) e células <i>natural killer</i> (NK)	TGF- $\beta$ é anti-inflamatório, promove a reparação de lesões, inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos	TGF- $\beta$ 1 está presente na matriz de dentina e tem sido utilizado para promover mineralização de tecido pulpar
<b>NGF</b>	Fator de crescimento nervoso	Uma proteína secretada pelo tecido alvo de um neurónio	NGF é crítico para a sobrevivência e manutenção de neurónios simpáticos e sensoriais	Promove o crescimento de neurónios e sobrevivência celular neuronal

Tabela 5. Fonte, atividade e utilidade de diferentes fatores de crescimento (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves 2007).

O PDGF é libertado por plaquetas e possui potencial para promover o fenómeno de angiogénese e de proliferação celular. Estes fatores podem induzir quimiotaxia e proliferação de células estaminais no local da lesão e, ainda, estimular a síntese da proteína da matriz de dentina (Kim et al., 2012).

FGF2 atua como fator indutor de diferenciação no processo de reparação de danos de tecido pulpar e como regulador positivo da expressão de quimiocinas podendo, este, ser útil na engenharia tecidual e regeneração pulpar quando se utilizam DPSCs humanas (Deepak, Nandini & Sathyajith, 2011).

IGFs são polipéptidos de cadeia única similares à sequência de proinsulina. De entre estes fatores, o IGF-1 e -2 contribuem para a reparação e odontogénese dentária por meio de proliferação e diferenciação celular. Especificamente, IGF-1 ou Somatomedina C detém, ainda, a possibilidade de promoção do crescimento e diferenciação de células da polpa (Kim et al., 2012).

A aplicação do fator de crescimento humano insulínico-1 juntamente com colagénio pode induzir completa formação de ponte e de túbulos de dentina podendo, assim, ser utilizado tal como outros fatores de crescimento, anteriormente à proteção pulpar ou como componente de materiais de restauração ou de Endodontia para estimulação de regeneração da polpa e de dentina (Murray et al., 2007).

O VEGF desempenha um papel de relevância no controlo da permeabilidade vascular no decorrer de eventos patológicos e fisiológicos. É um importante indutor da diferenciação e sobrevivência celular e pensa-se, ainda, que possa representar um papel crucial na promoção do processo de dentinogénese por indução de vascularização. Essa vascularização é necessária para sustento das elevadas exigências metabólicas de células odontoblásticas no decorrer do processo ativo de secreção de dentina (Rosa, Botero & Nör, 2011).

São considerados essenciais, os fatores de crescimento da família do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e proteínas morfogénicas ósseas (BMPs). As BMPs são importantes no desenvolvimento e regeneração dentária e, por sua vez, a família do fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) revela-se essencial na sinalização celular para diferenciação odontoblástica e estimulação da secreção de matriz de dentina. Os elementos desta família são secretados por odontoblastos e

depositados na matriz de dentina, sob forma ativa, por interações com outros componentes desta (Murray et al., 2007).

O efeito da família TGF-  $\beta$  é francamente variável dependendo, assim, do tipo de células e tecidos. TGF-  $\beta$ 1 desempenha um papel fundamental na resposta imunitária, durante a lesão da polpa dentária, e regula atividades celulares tais como migração, proliferação e diferenciação celular e síntese de matriz extracelular (Kim et al., 2012).

Proteínas tais como as proteínas morfogénicas ósseas, também conhecidas como BMPs, representam um papel de importância em mecanismos de formação de dentina reparadora. Estas, membros da família TGF- $\beta$ , foram identificadas como sendo reguladoras da formação óssea e cartilagem participando, enfaticamente, em processos de embriogénese e morfogénese de múltiplos órgãos/tecidos (Demarco et al., 2011).

Durante a formação do dente, as BMPs determinam quando ocorrerá a iniciação, morfogénese, citodiferenciação e secreção matricial, desta forma, sem estes fatores de crescimento o dente dificilmente se desenvolveria. Além do mais, possuem um papel predominante na formação de dentina. Aproximadamente 20 BMPs foram identificadas e caracterizadas tendo cada uma delas diferente expressão e afinidade para recetores fazendo, assim, com que a atividade biológica destes fatores *in vivo* seja única (Saber, 2009).

As BMPs possuem a capacidade de induzir maior quantidade de dentina reparadora e mais homogénea, com presença de túbulos de dentina com processos odontoblásticos bem definidos, comparativamente com a formada pelo uso de hidróxido de cálcio. A família BMP apresenta-se como sendo a mais favorável para uso, quando comparada com outros fatores de crescimento, pelo facto de a BMP-2, BMP-4 e BMP-7 demonstrarem dirigir a diferenciação de células estaminais em odontoblastos e consequentemente formação de dentina. No entanto, para que a engenharia tecidual seja bem-sucedida é importante que a colocação destas seja realizada em doses e tempo apropriados para o local pretendido (Bansal & Bansal, 2011).

A aplicação direta de fatores de crescimento revela limitação das suas meias-vidas e resulta, usualmente, em libertação temporária e instável. Estes factos são desfavoráveis para formação de novos tecidos (Zhang & Yelick, 2010).

Os fatores de crescimento podem ser colocados previamente à proteção pulpar ou ser incorporados em materiais restauradores endodônticos de forma a estimular o processo de regeneração de dentina e polpa. A longo prazo, os fatores de crescimento poderão ser utilizados conjuntamente com células estaminais pós-natal para proceder à substituição de polpa de dentes debilitados (Murray et al., 2007).

Futuramente, no âmbito da Medicina Dentária, espera-se que os fatores de crescimento possam vir a ser incorporados em materiais endodônticos e de restauração de forma a propiciar regeneração do complexo pulpo-dentinário (Malhotra & Mala, 2012).

## **2.2- Revascularização do canal radicular por coagulação sanguínea**

Os esforços iniciais, no que diz respeito a regeneração de tecido pulpar estavam direcionados para a introdução de sangramento e formação de um coágulo sanguíneo no espaço do canal de dentes definitivos. Neste processo, inicialmente, foi utilizado um coágulo sanguíneo com intuito regenerativo do tecido pulpar, porém, e como resultado houve formação de granulação, tecido fibroso ou mesmo ainda osso ou cimento (Sun et al., 2011).

O processo de revascularização é utilizado essencialmente em dentes com desenvolvimento apical incompleto. Estes ápices permitem que a resposta celular possa levar ao seu encerramento e crescimento radicular (Schmalz & Smith, 2014).

O método de revascularização implica que o espaço existente do canal radicular tenha sido desinfetado e que a formação de um coágulo sanguíneo contenha, por sua vez, a matriz que captura as células capazes de iniciar formação de tecidos (Murray et al., 2007).

O coágulo sanguíneo criado no canal pulpar atua, assim, como um *scaffold* e os fatores de crescimento nele presentes podem contribuir para a convocação de células, porém, ainda é inconclusiva a capacidade de atração de células endógenas estaminais (Huang et al., 2013).

Este coágulo deverá ser criado após remoção de tecido contaminado e controlo da infeção (Zhang & Yelick, 2010).

O procedimento de revascularização implica que seja usada pouca ou nenhuma instrumentação de tipo mecânico, que seja feito uso de irrigantes antissépticos e de uma mistura antibiótica ou, ainda, de hidróxido de cálcio (Lin & Rosenberg, 2011).

O uso de uma mistura tripla antibiótica (Ciprofloxacina/Metronidazol/Minociclina) pode auxiliar no processo de revascularização ao criar um ambiente adequado, por redução ou até mesmo eliminação completa de bactérias em dentes com desenvolvimento incompleto apical e polpas necróticas, para desenvolvimento da vasculatura e regeneração celular (Hargreaves et al., 2011).

Trope (2008) descreveu a mistura e respectivas instruções. Esta mistura, utilizada em estudo por Banchs e Trope (2004), tem como composição 200 mg de Ciprofloxacina, 500mg de Metronidazol e 100 mg de Minociclina (Tab. 6):

---

### 3Mis-MP

- **Antibióticos (3Mis)**
  - Ciprofloxacina 200mg
  - Metronidazol 500mg
  - Minociclina 100mg
- **Transportador (MP)**
  - Macrogol pomada
  - Propileno glicol

### Protocolo para preparação

- **Antibióticos (3Mis)-** Assegurar a não criação de contaminação cruzada
  - Remover o revestimento de açúcar dos comprimidos com uma lâmina cirúrgica, esmagar individualmente em grãos separados
  - Abrir as cápsulas, esmagar individualmente em grãos separados
  - Moer cada antibiótico num pó fino
  - Combinar quantidades iguais de antibióticos (1:1:1) num bloco de mistura
- **Transportador (MP)**
  - Quantidades iguais de macrogol pomada e propileno glicol (1:1)
  - Usando uma espátula limpa misturar os dois num bloco de mistura

- O resultado deve ser opaco
- **Separar pequenas porções de 3Mis e incorporar em MP usando o seguinte:**
  - 1:5 (MP:3Mis)→ Consistência cremosa
  - 1:7 (standard mis)→ Espalha facilmente mas não se desintegra
  - Se o resultado é escamoso ou quebradiço, então foi incorporado demasiado 3Mis

#### **Armazenamento**

- Os antibióticos devem ser mantidos separados em recipientes de porcelana conservadores de humidade
- Macrogol pomada e propileno glicol devem ser armazenados separadamente
  - Descartar se a mistura se encontrar transparente (evidência de contaminação da mistura)

Tabela 6. Instruções e composição da pasta antibiótica (Adaptada de: Trope, 2008).

Banchs e Trope (2004) descreveram o tratamento, numa criança de 11 anos, de um segundo pré-molar inferior com ápice aberto com sinais radiográficos e clínicos que evidenciavam periodontite apical e presença de fístula. Porém, em exame clínico, não existia sintomatologia e o dente não apresentava cárie mas sim uma fratura que provocou necrose pulpar por micro-exposição (Fig. 2). Realizou-se desinfeção canal com solução de hipoclorito de sódio a 5,25% e utilizou-se uma mistura antibiótica tripla sendo esta removida após 26 dias. Ao fim deste tempo, não existia evidência de sintomatologia ou de fístula e a radiotransparência associada ao dente havia sofrido redução (Fig. 3), procedeu-se à formação de um coágulo sanguíneo no espaço do canal para atuar como *scaffold* para crescimento de tecidos e, posteriormente, a um bom selamento cervical com MTA e restauração de resina.

Foi constatado por Banchs e Trope (2004), que aos 22 dias se verificaram evidências de reparação e que ao fim de 24 meses, as paredes radiculares encontravam-se mais espessas e o desenvolvimento semelhante ao contra-lateral (Fig. 4) permanecendo o dente assintomático com resposta positiva ao teste ao frio. Foi sugerido, que algum tecido pulpar possa ter sobrevivido a nível apical com presença de

odontoblastos funcionais sendo este facto inferido devido ao espessamento das paredes radiculares e continuação de crescimento da raiz.

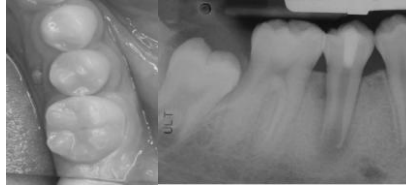


Figura 2. Vista oclusal do segundo pré-molar inferior direito de aparência intacta e sem cáries e, ainda, radiografia pré-operativa com abertura apical e radiotransparência periradicular (Fonte: Banchs & Trope, 2004).

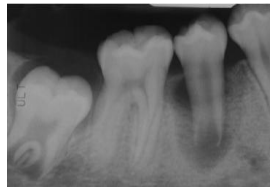


Figura 3. Radiografia realizada 26 dias após uso da pasta tri-antibiótica em que já são evidentes sinais radiográficos de reparação (Fonte: Banchs & Trope, 2004).



Figura 4. Radiografia realizada aos 24 meses em que o dente apresenta desenvolvimento completo radicular (Fonte: Banchs & Trope, 2004).

Trope (2008) considerou que se ao fim de 3 meses o dente não apresentar sinais de regeneração poderão ser iniciados métodos de tratamento tradicionais. No que diz respeito à terminologia correta refere levantarem-se questões, uma vez que, para o mesmo caso alguns autores defendem que a revascularização é de facto regeneração pulpar e início da tecnologia de células estaminais em Endodontia.

No entanto, Trope (2008) é de opinião que, de forma evidente, não se poderá considerar tratar de uma situação de apexificação, uma vez que o ápice se encontrou encerrado, e também, pelo fato das paredes do canal se terem encontrado mais espessas. No entanto, também não se parece tratar de uma situação de apexogénese, onde se pretende que o encerramento apical venha a ocorrer obtendo paredes de dentina mais espessas e utilizando polpa vital remanescente radicular para atingir este propósito. No

presente caso, só poderá ser mencionado que o espaço pulpar readquiriu um estado de vitalidade.

Segundo Saber (2009), o termo revascularização diz efetivamente respeito a regeneração e formação fisiológica de tecidos, podendo estes fenômenos deverem-se à sobrevivência das células estaminais da papila apical ou SCAPs à infecção.

Saber (2009) sugere assim, que a evidência radiográfica demonstrada por Banchs e Trope (2004), relativamente ao aumento da espessura da parede de dentina, poderia ser explicada pelo crescimento de osso, cimento ou ainda de um material semelhante a dentina.

Esta técnica, segundo Murray et al. (2007), é relativamente simples podendo ser completada usando instrumentos disponíveis, medicação sem custos normalmente associados às técnicas biotecnológicas e pelo uso das próprias células sanguíneas do paciente, que impedem a possibilidade de uma rejeição imunitária e de transmissão de agentes patogênicos ao substituir a polpa por tecidos construídos por engenharia.

Murray et al. (2007) referem, como limitação à técnica, a não identificação da fonte de tecido regenerado, a concentração e composição das células no interior do coágulo sanguíneo serem imprevisíveis o que pode conduzir a variações significativas, não dependendo por isso, a engenharia tecidual, da formação de um coágulo e ainda, a necessidade do aumento do forâmen apical para promoção de vascularização e manutenção da viabilidade celular por difusão inicial de nutrientes. Para que tal ocorra, as células deverão ter disponível oxigênio suficiente ou não terão possibilidade de sobrevivência face a hipoxia.

De acordo com Hargreaves et al. (2013), alternativamente e como tratamento de dentes permanentes imaturos, poder-se-á realizar apexificação. Este método é caracterizado por aplicação de hidróxido de cálcio por um período longo de tempo e mais recentemente pela utilização de MTA, para atuar como barreira apical, anterior à colocação de um material de preenchimento radicular ou de obturação.

Hargreaves et al. (2013) consideram que embora se possa realizar apexificação tanto com hidróxido de cálcio como MTA, pode, no entanto, ocorrer enfraquecimento e aumento de risco de fratura cervical. Para além disso, este método impede qualquer desenvolvimento, demonstrável radiograficamente, quer do comprimento quer da

largura radicular. O dente tratado demonstra reabilitação da periodontite apical, porém, não apresenta restauro de tecido funcional pulpar.

Lin e Rosenberg (2011) descrevem a apexificação como sendo um procedimento no qual é removida polpa necrótica por desbridamento mecânico com irrigação química antisséptica simultânea. Durante este procedimento é improvável a ocorrência de formação de dentina reparadora devido à ausência de tecido pulpar sendo a barreira calcificada que se forma a nível do forâmen apical descrita como um tecido que se assemelha a cimento ou osteodentina. O MTA e o hidróxido de cálcio poderão induzir liberação de fatores de crescimento da matriz de dentina tal como ocorre na proteção pulpar ou na pulpotomia. Poderá ocorrer liberação de BMP, PDGF, FGF, TGF, IGF-1, EGF e CGF (fator de crescimento derivado de cimento) da matriz de cimento e, ainda, IGF, TGF- $\beta$ , BMP, FGF, PDGF da matriz alveolar óssea. Este mecanismo poderá ser responsável pela sinalização celular estaminal/progenitora verificada no ligamento periodontal e medula óssea alveolar que conduz posteriormente à diferenciação em osteoblastos e células que se assemelham a cimento (*cementoblast-like cells*) (Tab. 7).

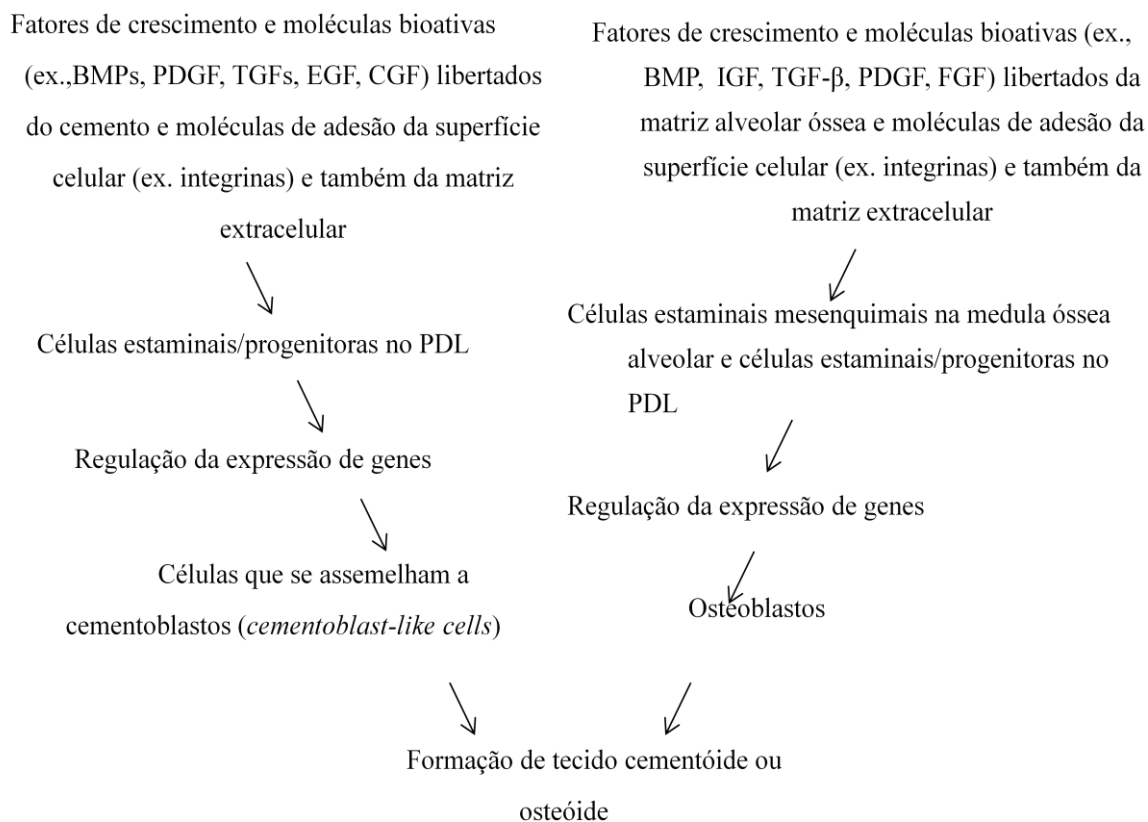


Tabela 7. Apexificação (Adaptada de: Lin & Rosenberg, 2011).

### 2.3- Células estaminais

Para que seja possível entender o conceito de engenharia tecidual será necessário entender o que são células estaminais e qual o papel que estas representam no processo de regeneração (Huang, 2009).

As células estaminais são consideradas as células mais importantes para Medicina Regenerativa. Estas possuem capacidade de desenvolver um organismo a partir de uma só célula e, células saudáveis podem, ainda, substituir células danificadas em adultos (Saber, 2009).

Estas células caracterizam-se essencialmente por duas propriedades básicas. Por um lado têm capacidade de se auto-renovarem num estado indiferenciado de forma ilimitada e, por outro, têm a possibilidade de se diferenciarem em mais do que um tipo de células especializadas (Fig. 5) (Bragança, Tavares & Belo, 2010).

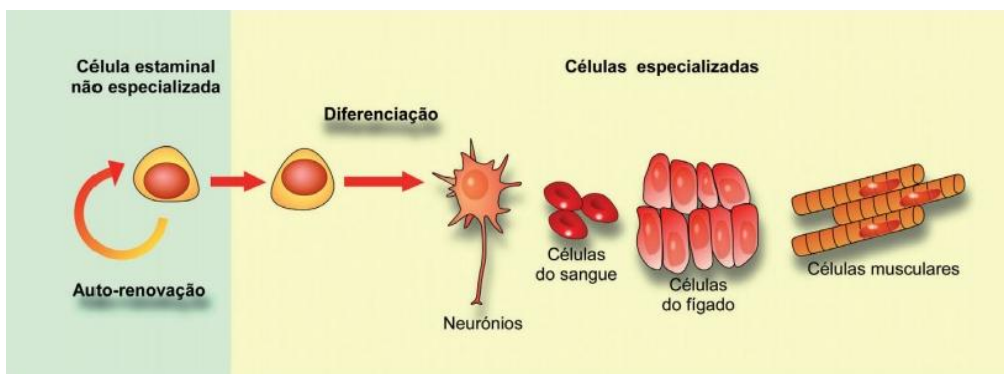


Figura 5. Propriedades das células estaminais (Fonte: Bragança, Tavares & Belo, 2010).

Estas células são indiferenciadas sendo este fenótipo mantido até que ocorra exposição a sinais apropriados (Nosrat, Kim, Verma & Chand, 2014).

Consideram-se nichos, estruturas celulares existentes em tecidos e órgãos, que formam microambientes tridimensionais. Estes exercem influência e controlo sobre a expressão génica determinando esta, por sua vez, as características de auto-renovação e diferenciação de células estaminais (Fig. 6). Estes nichos fornecem sinais extrínsecos tais como interações com a matriz extracelular, entre células estaminais e vizinhas ou moléculas de sinalização intercelular, que quando combinados com fatores intrínsecos definem o comportamento e fim da célula estaminal (Bragança et al., 2010).

As células poderão encontrar-se num só nicho ou ainda apresentar uma posição variável no organismo humano sendo que, a maioria destas em adultos, encontra-se num estado estacionário. A ativação destas pode ocorrer por meio de fatores exógenos para que possam sofrer divisão e diferenciação e, por conseguinte, favorecer processos de renovação ou regeneração no decurso de uma lesão (Bragança et al., 2010).

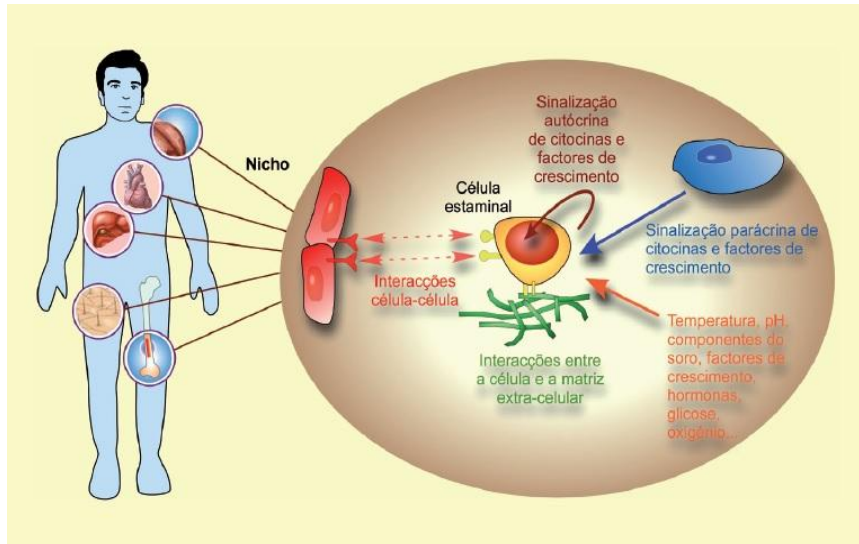


Figura 6. Nicho de células estaminais adultas- Formação de microambientes que fornecem sinais extrínsecos tais como moléculas intercelulares de sinalização, interações entre células estaminais e matriz extracelular, e com células vizinhas. Estes sinais conjuntamente com sinais intrínsecos celulares determinam a conduta e destino das células estaminais podendo, ainda, ocorrer interferência por meio de condições externas como a temperatura (Fonte: Bragança, Tavares & Belo, 2010).

De acordo com a sua plasticidade, as células podem ser divididas em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Esta plasticidade determina a habilidade de produção de células de diferentes tecidos (Tab. 8) (Murray et al., 2007).

As células totipotentes apresentam capacidade de formação, de linhagens celulares filhas, a partir de qualquer linhagem celular. Por sua vez, as células estaminais pluripotentes quando comparadas com multipotentes, apresentam as mesmas capacidades que estas excetuando a possibilidade de formação de trofoblastos. As células estaminais multipotentes, por sua vez, possuem apenas a partir de um número limitado de tecidos específicos, a habilidade de produção de células filhas (Rosenbaum, Grande & Dines, 2008).

Só se consideram células pluripotentes as que são encontradas no embrião ainda em desenvolvimento ou as que, por meio de indução genética celular somática, se

transformem em células estaminais pluripotentes (iPSCs) (Diogenes, Henry, Teixeira & Hargreaves, 2013).

A reprogramação de iPSCs permite a obtenção de células com particularidades de células estaminais embrionárias a partir de células diferenciadas adultas do próprio paciente superando, assim, praticamente todas as preocupações éticas correlacionadas com as células estaminais embrionárias humanas. Esta reprogramação permite ainda um novo incentivo relativamente à investigação para a utilização de células pluripotentes em procedimentos terapêuticos. As iPSCs revelam potencialidade pelo seu uso futuro em terapias celulares, porém, será ainda necessária investigação mais aprofundada para poderem ser definidos protocolos de diferenciação com maior eficácia de maneira a que sejam garantidos os critérios de pureza e estabilidade de células diferenciadas (Bragança et al., 2010).

Kim et al. (2013) consideraram a hipótese das células iPS poderem ser utilizadas como fonte celular para regeneração pulpar, porém, mesmo com uma eficaz geração de iPS elevada são requeridos métodos de reprogramação não virais, previamente à transplantação, com o intuito de evitar mutações genómicas.

<b>Tipo de célula estaminal</b>	<b>Plasticidade celular</b>	<b>Fonte da célula estaminal</b>
<b>Totipotente</b>	Cada célula pode desenvolver-se numa nova	Células de embriões precoces (1-3 dias)
<b>Pluripotente</b>	Células podem formar quaisquer tipos celulares (acima de 200)	Algumas células do blastocisto (5-14 dias)
<b>Multipotente</b>	As células diferenciaram-se mas podem formar um número de outros tecidos	Tecido fetal, cordão umbilical e células estaminais pós-natal incluindo células estaminais da polpa dentária

Tabela 8. Géneros de células estaminais (Adaptada de: Murray, Garcia-Godoy & Hargreaves 2007).

A qualificação das células estaminais pode ser realizada de acordo com a sua origem em autólogas, alogénicas e xenogénicas. As células autólogas são obtidas a partir de um indivíduo e implantadas no mesmo, as alogénicas podem ser obtidas a partir de indivíduos da mesma espécie e as xenogénicas, por sua vez, são células obtidas a partir de indivíduos de diferentes espécies (Bansal & Bansal, 2011).

De entre estas células, as células autólogas apresentam menores problemas no que diz respeito a rejeição imunitária e transmissão de agentes patogénicos. Estas células são obtidas de forma mais económica, já que representam células do próprio indivíduo e, como tal, também dispensam dificuldades nos campos éticos e legais (Murray et al., 2007).

As células estaminais podem ser classificadas e divididas em células estaminais embrionárias e pós-natal de acordo com o seu estágio de desenvolvimento embrionário (Peng, Ye & Zhou, 2009).

No interior da massa celular do blastocisto encontram-se as células estaminais embrionárias e, por sua vez, as células estaminais pós-natal foram isoladas a partir de vários tecidos incluindo medula óssea, tecido neural, polpa dentária e ligamento periodontal (Bansal & Bansal, 2011).

As células estaminais embrionárias (ESCs) podem ser consideradas pluripotentes por possuírem a habilidade de se diferenciarem em todos os tipos celulares, para além disso, possuem capacidade de auto-renovação. As células estaminais pós-natal ou adultas são consideradas importantes no mecanismo de reparação intrínseco a muitos órgãos e tecidos. Esta classificação resulta de interações epitélio-mesenquimais que ocorrem durante a formação da estrutura dentária (Nerem, 2011).

As células estaminais embrionárias humanas apresentam barreiras éticas e legais, portanto, para uso destinado a engenharia de tecidos encontram-se mais indicadas as células estaminais pós-natal (Demarco et al., 2011).

Existem duas populações de células estaminais a ser consideradas uma vez que, a formação da estrutura dentária resulta de interações de carácter epitelial-mesenquimal. Essas populações são representadas pelas células estaminais epiteliais (EpSCs) e as células estaminais mesenquimais (MSCs). As EpSCs dão origem a ameloblastos

enquanto as MSCs dão origem a odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal (Bluteau, Luder, De Bari & Mitsiadis, 2008).

As células estaminais mesenquimais são células multipotentes não hematopoiéticas que podem proliferar e diferenciarem-se em vários tipos celulares compreendendo vários tecidos e demonstrando características específicas. Características tais como, morfologia semelhante a fibroblastos, habilidade de aderência a superfícies plásticas de cultura de tecidos e poder osteogénico (Lymperi, Ligoudistianou, Taraslia, Kontakiotis & Anastasiadou, 2013).

As MSCs podem ser isoladas a partir de múltiplos tecidos tais como, medula óssea, sangue periférico, sangue do cordão umbilical, tecido conectivo adulto, tecidos dentários, placenta e membrana amniótica (Rodríguez-Lozano et al., 2012).

As células estaminais mesenquimais primeiramente isoladas e descritas foram as células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMMSCs). Estas células possuem capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e estroma fibroso mielosuportado, como tal, foram consideradas os critérios de *gold standard* para as células estaminais da polpa dentária ou DPSCs aquando do seu isolamento e caracterização. As populações que se assemelham a MSCs do tecido dentário parecem indicar maior envolvimento odontogénico do que osteogénico durante o desenvolvimento sendo utilizadas, nos últimos anos, em vários estudos para avaliar a sua aplicabilidade clínica (Demarco et al., 2011).

### **2.3.1- Células estaminais de origem dentária**

Atualmente consideram-se as seguintes células estaminais de origem dentária: células estaminais da polpa dentária (DPSCs), células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos (SHEDs), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs), células estaminais do folículo dentário (DFPCs) e células estaminais da papila apical (SCAPs) (Giordano, La Monaca, Annibali, Cicconetti & Ottolenghi, 2011).

### 2.3.1.1- SHED

As células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos ou SHEDs representam uma população celular estaminal pós-natal capaz de ampla proliferação e diferenciação multipotencial. Os dentes decíduos esfoliados assemelham-se a cordão umbilical contendo células estaminais que representam uma promessa no que diz respeito à aplicabilidade clínica (Telles, Machado, Sakai & Nör, 2011).

As SHEDs foram isoladas a partir da polpa de incisivos decíduos e exibem uma elevada plasticidade, uma vez que é possível a sua diferenciação em múltiplos tipos celulares (Chandki et al., 2012).

As células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos diferenciam-se em neurónios, adipócitos e odontoblastos funcionais para, além de, promoverem a estimulação do processo de osteogénese quando são transplantadas *in vivo* (Fig. 7) (Soares, Knop, Jesus & Araújo, 2007).

Estas células têm potencial de indução de formação óssea e dentina, diferenciação *in vitro* em outros derivados de células mesenquimais não dentárias e, ainda, capacidade osteoindutora *in vivo* (Estrela, Alencar, Kitten, Vencio & Gava, 2011).

As SHEDs detêm uma taxa de proliferação superior, quando comparadas com células estaminais de dentes permanentes, podendo ser obtidas a partir de tecidos descartáveis e acessíveis e, para além disso, fruem de aplicabilidade em casos de dentição mista na qual ocorreu necrose pulpar devido a trauma em dentição definitiva imatura (Saber, 2009).

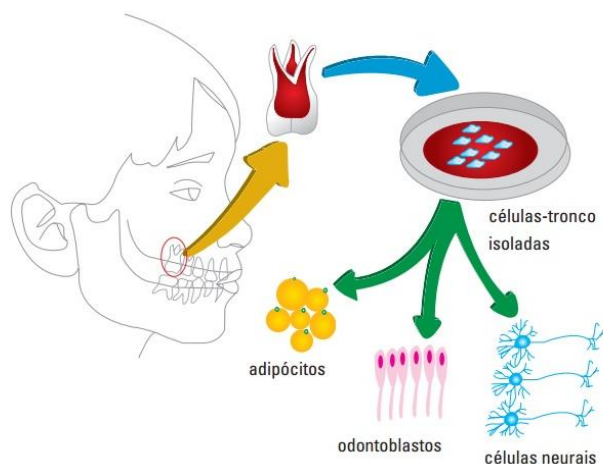


Figura 7. As células estaminais isoladas a partir de tecido pulpar de dentes decíduos possuem elevada capacidade proliferativa e são capazes de se diferenciarem em odontoblastos maduros, adipócitos ou células neurais (Fonte: Soares, Knop, Jesus & Araújo, 2006).

Cordeiro et al. (2008) desenvolveram um estudo que comprovou a importância das células estaminais e a sua aplicabilidade em regeneração pulpar. Neste estudo foram transplantados porção de dente/*scaffold*/células estaminais no tecido subcutâneo de ratos imunodeficientes (Fig. 8). Em observação, as SHEDs demonstraram diferenciação num tecido semelhante a polpa com características morfológicas equiparadas a polpa normal. Ocorreu um aumento de densidade de microvasos, comparativamente com os controles de *scaffolds* vazios, quando colocadas SHED individualmente ou em conjunto com células endoteliais microvasculares dérmicas humanas (HDMECs) em porções de dente/*scaffold* implantados em ratos.

Nestes estudos, Cordeiro et al. (2008), verificaram que a implantação conjunta de SHED/HDMEC demonstrou menor aumento de densidade de microvasos quando comparada com SHEDs de forma individual, sendo estas, capazes de se diferenciarem em vasos sanguíneos e de se anastomosarem com a vasculatura hospedeira. Estes autores defendem que a escolha de um *scaffold* apropriado, o seu modo de apresentação e sinalização morfogénica permitem a diferenciação de SHEDs em odontoblastos secretores de dentina, fibroblastos e rede microvascular e, que o reduzido pH gerado pela deterioração do *scaffold* parece cooperar na mobilização de fatores de crescimento e moléculas bioativas com potencial regenerativo sob células indiferenciadas e formação de dentina reparadora.

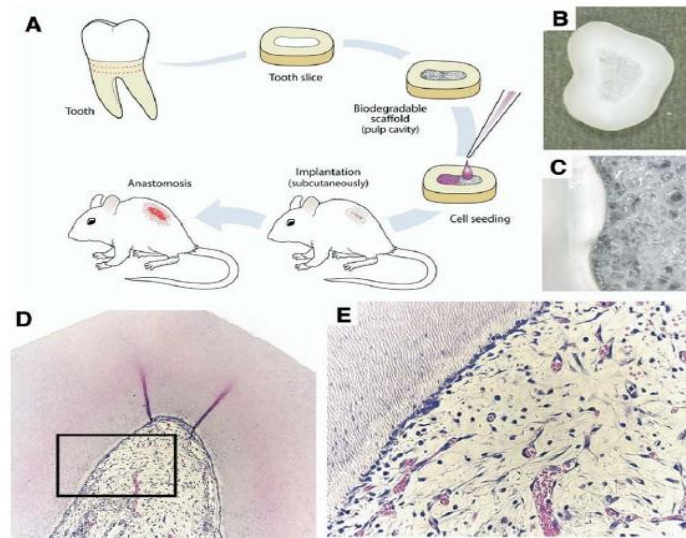


Figura 8. Estratégias de regeneração pulpar. B- *Scaffold* biodegradável preparado no interior do canal com posterior sedimentação conjunta com SHED ou SHED com células endoteliais. C-Ampliação do fragmento dentário/*scaffold* com evidência da interface entre dentina e *scaffold*. D-Visualização 14 dias após transplantação em ratos imunodeficientes, a baixa ampliação, de polpa dentária criada com SHED e células primárias endoteliais microvasculares dérmicas humanas. E-Visualização da área marcada em (D) a grande ampliação. (Fonte: Cordeiro et al., 2008).

### 2.3.1.2- DPSC

As células estaminais da polpa dentária (DPSCs) são uma população celular heterogênea, obtida a partir da polpa de dentes definitivos por digestão enzimática, caracterizada pela sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens de células de estroma e pela sua capacidade clonogênica (Demarco et al., 2011).

Inicialmente, o isolamento das células estaminais da polpa dentária, foi realizado a partir de terceiros molares sendo a polpa removida por via coronária e, posteriormente, sujeita à ação de collagenases e dispases (Tatullo et al., 2014).

O isolamento de DPSCs pode ainda ser realizado a partir de dentes supranumerários, dentes indicados para exodontia por motivos ortodônticos e ainda dentes em posição irregular (Nakashima, Iohara & Murakami, 2013).

As DPSCs proliferam extensivamente, podem ser criopreservadas de forma segura, ser aplicadas com vários *scaffolds*, têm um tempo de vida longo, possuem

propriedades imunossupressoras e capacidade de formação de tecidos mineralizados semelhantes a dentina, porém, ainda não existe confirmação de que estas células possam, de facto, produzir dentina (Saber, 2009).

Estas células são extraídas do tecido pulpar de forma altamente eficiente e esta fácil gestão faz com que sejam promissoras e de possível uso clínico humano (Sun et al., 2011).

A capacidade de desenvolvimento das DPSCs *in vitro* é limitada diferenciando-se estas, em células progenitoras de osteoblasto e sofrendo maturação em osteoblastos que produzam LAB (tecido ósseo fibroso autólogo vivo). *In vivo*, tecidos mais complexos poderão resultar, ou seja, as DPSCs poderão formar tecido ósseo calcificado com canais de Havers e osteócitos e ainda, complexos tecidulares semelhantes a dentina/polpa (Ulmer, Winkel, Kohorst & Stiesch, 2010).

Estas células apresentam potencial regenerador no que diz respeito ao complexo pulpo-dentinário ao serem transplantadas de forma individual ou conjunta com BMP-2 (Nakashima et al., 2013).

Yu, Damek-Poprawa, Nicoll e Akintoye (2009), ao usarem pressão hidrostática dinâmica (dynamic hydrostatic pressure-HSP), testaram a hipótese da aplicação direta de HSP perturbar a sobrevivência de DPSCs e a diferenciação odontogénica. Yu et al. demonstraram que a pressão hidrostática perturba a sobrevivência das DPSCs mas que, ao mesmo tempo, promove a diferenciação odontogénica, mineralização precoce *in vitro*, regeneração de tecidos duros *in vivo* e resposta à estimulação da proteína BMP-2. Esta proteína, possivelmente, permitiu a manutenção da vitalidade pulpar apesar do aumento da deposição mineral.

Zhang et al. (2006) investigaram o comportamento *in vitro* e, ainda, *in vivo* de DPSCs isoladas a partir de terceiros molares impactados quando colocadas em três *scaffolds* diferentes: colagénio esponjoso; cerâmica porosa sendo a cerâmica sinterizada de Hidroxiapatite/Fosfato tricálcico (HA/TCP) e por fim rede fibrosa de titânio. Estes *scaffold*, contendo as DPSCs, foram transplantados durante 6 ou 12 semanas em ratos. Foi demonstrado que *in vitro* as células haviam desenvolvido abundante deposição de ECM com expressão de DPSCs positiva no total dos *scaffolds* em estudo, porém, o tecido final formado teria mais pareças com tecido conectivo do que propriamente

com tecido que se assemelhasse a dentina. Todos os materiais em estudo permitiram a adesão, crescimento e diferenciação das células estaminais em questão.

Foi investigado por Prescott et al. (2008), o papel de cada componente pertencente à tríade de engenharia tecidual no que diz respeito à organização e diferenciação de DPSCs no local, simulado, de perfuração de furca usando como modelo um rato. Foi utilizado um *scaffold* de colagénio, por permitir o posicionamento de células e fatores de crescimento com facilidade e, por permitir a sua substituição por tecidos naturais durante a degradação. Foi utilizada também proteína da matriz dentinária 1 (DMP1) por contribuir na regularização da mineralização e, por demonstrar indução de carácter diferenciativo de células estaminais em células semelhantes a odontoblastos.

Foi, neste estudo demonstrado por Prescott et al. (2008), que quando se encontravam presentes *scaffold*, DPSCs e fatores de crescimento ocorria uma clara organização de tecidos, formação de fibroblastos e, ainda, formação de vasos sanguíneos sendo a angiogénese um importante passo no que diz respeito à reparação tecidual por permitir que fatores de crescimento e nutrientes cheguem ao local lesado.

Para Rosa, Della Bona, Cavalcanti e Nör (2012), as DPSCs e as SHEDs, ambas originadas a partir da polpa dentária, diferem na capacidade de diferenciação odontogénica e indução osteogénica, porém, ambas apresentam aptidão de regeneração de um complexo tipo pulpo-dentinário.

As DPSCs têm como vantagens, segundo Sun et al. (2011), o fácil acesso e produção com baixa morbidade, extração altamente eficiente a partir de tecido pulpar e extensa capacidade de diferenciação e interatividade com biomateriais.

### **2.3.1.3- SCAP**

As SCAPs ou células estaminais da papila apical são uma população celular estaminal mesenquimal presente na papila apical de dentes com maturidade incompleta. Estas células expressam múltiplos marcadores de células estaminais mesenquimais, detêm aptidão de formação de células de carácter semelhante a odontoblastos, dentina *in vivo* e serão, possivelmente, a fonte primária de dentina a nível da raiz do dente (Saber, 2009).

Estas células poderão ser obtidas a partir de terceiros molares e dentes com ápice aberto, sendo estes uma importante fonte (Lymperi et al., 2013).

As SCAPs podem ainda subsistir após necrose pulpar ou tratamento endodôntico continuando, assim, a produzir dentina a nível radicular (Zhang & Yelick, 2010).

O fenómeno de apexogénese pode ocorrer em dentes permanentes infetados imaturos com periodontite apical ou abscesso devendo-se, provavelmente, às SCAPs que residem na papila apical que sobrevivem à infeção devido à proximidade com os tecidos periapicais. O tecido formado pode ser beneficiado por circulação colateral que permite sobrevivência celular durante o processo de necrose, assim, após desinfeção endodôntica, as SCAPs dão origem a odontoblastos primários (Estrela et al., 2011).

Estas células estaminais possuem características semelhantes, mas ainda assim diferentes, quando comparadas com DPSCs. As SCAPs parecem indicar ser a fonte de odontoblastos primários sendo estes, por sua vez, responsáveis pela formação de dentina a nível radicular. Por outro lado, as DPSCs parecem ser a fonte para substituição de odontoblastos formadores de dentina reparadora (Huang, Gronthos & Shi, 2009).

#### **2.3.1.4- DFPC**

As células progenitoras do folículo dentário ou DFPCs foram isoladas em primeira instância a partir de terceiros molares impactados de origem humana e possuem a habilidade de formar cimento *in vivo*, para além de, se diferenciarem em cementoblastos *in vitro* (Gandhi, Gandhi & Madan, 2011).

Estas células tais como as SCAPs representam células de um tecido em desenvolvimento e podem, assim, apresentar uma plasticidade superior comparativamente com outras células estaminais dentárias (Volponi, Pang & Sharpe, 2010).

#### **2.3.1.5- PDLSC**

As células estaminais do ligamento periodontal ou PDLSCs são células estaminais multipotentes pós-natal do ligamento periodontal. Estas células, em condições de cultura específicas, diferenciam-se em células semelhantes a cimento,

adipócitos e células formadoras de colagénio podendo, ainda, terem capacidade de gerar uma estrutura semelhante a cimento/ligamento periodontal e contribuir para a reparação de tecido periodontal (Saber, 2009).

Não existem, porém, evidências de que as PDLSCs formem estruturas semelhantes a polpa dentária, no entanto, poderá ser fabricada uma raiz biológica juntamente com um ligamento periodontal funcional (Demarco et al., 2011).

Ulmer et al. (2010) descrevem o potencial de diferenciação de múltiplas células estaminais mesenquimais de origem dentária na tabela a seguir descrita (Tab. 9):

<b>Células estaminais</b>	<b>Tecido alvo/células alvo</b>	<b>Literatura</b>
<b>DPSCs</b>	Odontoblastos	Batouli et al. 2003, Braut et al. 2003, Iohara et al. 2004, Mina & Braut 2004, Nakashima et al. 2004, Zhang et al. 2005, Huang et al. 2006, Kumabe et al. 2006, Yu J. et al. 2006, Yang X. et al. 2007, Takeda et al. 2008, Yang X. et al. 2008b, Yu J. et al. 2008, Zhang et al. 2008a, Zhang et al. 2008b, He F. et al. 2009, Yang X. et al. 2009, Yu V. et al. 2009, Nakashima et al. 2002, Sumita et al. 2009
	Tecido dentário e pulpar	Gronthos et al. 2002, Yu J. et al. 2006, El-Backly et al. 2008, He H. et al. 2008
	Osteoblastos	Gronthos et al. 2000, Gronthos et al. 2002, Braut et al. 2003, Mina & Braut 2004, Laino et al. 2005, Pierdomenico et al. 2005, Kerkis et al. 2006, Laino et al. 2006, Papaccio et al. 2006, Yu J. et al. 2006, d'Aquino et al. 2007, Jo et al. 2007, Liu H. S. et al. 2007, Otaki et al. 2007, Yu J. et al. 2007, Cheng et al. 2008, de Mendonca Costa et al. 2008, Graziano et al. 2008, Lu et al. 2008, Takeda et al. 2008, Yu J. et al. 2008, Koyama et al. 2009
	Condrócitos	Kerkis et al. 2006, Cheng et al. 2008, Koyama et al. 2009

	Adipócitos	Pierdomenico et al. 2005, Jo et al. 2007, Liu H. S. et al. 2007, Cheng et al. 2008, He H. et al. 2008, Zhang et al. 2008a, Koyama et al. 2009
	Endotelócitos	D'Aquino et al. 2007
	Neurónios	Gronthos et al. 2002, Kerkis et al. 2006, d'Aquino et al. 2007, Liu H. S. et al. 2007, Arthur et al. 2008, He H. et al. 2008
	Musculatura	Kerkis et al. 2006, Zhang et al. 2008a
<b>SHEDs</b>	Odontoblastos	Miura et al. 2003, Cordeiro et al. 2008
	Osteoblastos	Seo et al. 2008, Singhatanadgit et al. 2009, Xu N. et al. 2009, Zheng et al. 2009, Koyama et al. 2009
	Neurónios	Miura et al. 2003, Morszeck et al. 2009b
	Adipócitos	Miura et al. 2003, Xu N. et al. 2009, Koyama et al. 2009
	Endotelócitos	Cordeiro et al. 2008
<b>PDLSCs</b>	Odontoblastos	Trubiani et al. 2007
	Tecido periodontal	Seo et al. 2004, Sonoyama et al. 2006, Liu Y. et al. 2008, Yang Z. et al. 2009
	Osteoblastos	Gay et al. 2007, Fujii et al. 2008, Chang et al. 2009, Singhatanadgit et al. 2009
	Cementoblastos	Seo et al. 2004, Ma et al. 2008, Chang et al. 2009, Yang Z. et al. 2009
	Condrócitos	Gay et al. 2007
	Adipócitos	Seo et al. 2004, Gay et al. 2007, Fujii et al. 2008
<b>DFSCs</b>	Células progenitoras PDL	Yokoi et al. 2007
	Osteoblastos	Morszeck et al. 2005, Morszeck 2006, Morszeck et al. 2009a
	Cementoblastos	Morszeck et al. 2005, Morszeck 2006, Kemoun et al. 2007, Wu J. et al. 2008b
	Neuroblastos	Völlner et al. 2009, Morszeck et al. 2009b
<b>SCAPs</b>	Odontoblastos	Kikuchi et al. 2004, Sonoyama et al. 2006

	Osteoblastos	Ikeda et al. 2006, Tete et al. 2008, Park et al. 2009
--	--------------	---

Tabela 9. O potencial de diferenciação de diferentes células estaminais mesenquimais de origem dentária (Adaptada de: Ulmer, Winkel, Kohorst & Stiesch, 2010).

Segundo Huang et al. (2009), desde que foi realizado o isolamento e a caracterização das células estaminais DPSC, SHED e SCAP, o seu uso para a regeneração dos tecidos pulpare e dentinários foi investigada. A implantação de células estaminais/*scaffolds* nos canais radiculares, que têm somente fornecimento sanguíneo a partir da extremidade apical, pode comprometer a vascularização de suporte da vitalidade das células implantadas nos *scaffolds*, sendo assim, foi sugerida a inserção progressiva da polpa fabricada por meio de engenharia tecidual, de maneira a conseguir a regeneração do tecido pretendido.

Huang et al. (2009) pensam que as células mesenquimais indiferenciadas residentes em tecidos periapicais ou, ainda, células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs) no osso alveolar dos maxilares possam ser introduzidas no espaço do canal através da formação de coágulos de sangue, para permitir que sejam formados novos odontoblastos e, para que ocorra regeneração de tecido que se assemelhe a polpa dentária. Estes autores consideram que, segundo as características das células PDLSC, DPSC e SCAP seja improvável formação de odontoblastos a partir de ligamento periodontal ou osso periapical e, que não existe evidência alguma que demonstre que BMMSCs possam originar odontoblastos funcionais e, por conseguinte gerar dentina.

De acordo com Murray et al. (2007) são já utilizadas técnicas com aplicações regenerativas médicas pelas múltiplas vantagens associadas à utilização de células estaminais, nomeadamente, as pós-natal. As células estaminais autólogas são relativamente acessíveis de obtenção e de colocação por meio de seringa e têm o potencial de induzir nova regeneração pulpar. Como desvantagens, as células poderão ter taxas de sobrevivência reduzidas e poderão migrar para diferentes locais causando padrões de mineralização. Para solucionar esta questão, as células, poderão ser aplicadas conjuntamente com um coágulo de fibrina ou material de *scaffold*.

### 2.3.2- Isolamento de células estaminais dentárias

Para reconhecimento, caracterização e isolamento de células estaminais são utilizados marcadores celulares (Ulmer et al., 2010).

As células estaminais adultas possuem proteínas ou fatores de transcrição específicos, normalmente presentes na superfície celular, que são utilizados como marcadores citológicos em processos de identificação e isolamento destas (Correia & Bragança, 2010).

De entre a população de células semelhantes a MSCs, encontram-se as células estaminais de origem dentária, sendo assim, os marcadores utilizados para identificação de MSCs poderão ser utilizados para identificação destas células (Huang, 2011).

Segundo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* as células estaminais mesenquimais (MSCs) devem expressar CD105, CD73 e CD90 e não ter expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR (Dominici et al., 2006).

As células estaminais de origem dentária são de difícil caracterização por meio de marcadores proteicos de superfície (Tab. 10), no entanto alguns destes, tais como Stro-1 e CD73 são expressos por todas as células estaminais ou precursores celulares. Um conhecimento mais aprofundado destes marcadores e da sua relação no que diz respeito a diferenciação e plasticidade celular será útil para a aplicação de células estaminais de forma terapêutica (Morsczech et al., 2008).



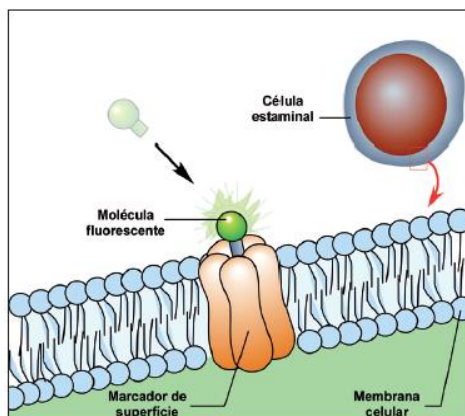


Figura 9. Reconhecimento de marcadores estaminais por meio de ligação de moléculas fluorescentes à molécula sinalizadora (Fonte: Correia & Bragança, 2010).

#### **2.4- Técnica *cell-based* estaminal para regeneração da polpa/dentina ou Implantação pulpar**

No processo de implantação pulpar é transplantada polpa, obtida a partir de uma linha celular estaminal purificada livre de infecção ou de patógenos ou, ainda, de células cultivadas em laboratório para os sistemas de canais com a conformação e desinfecção adequadas. Este tecido desenvolve-se *in vitro* sob forma de folhas em nanofibras poliméricas biodegradáveis ou em folhas de proteínas de ECM tais como fibronectina ou colagénio I (Murray et al., 2007).

No processo considerado são transplantadas células previamente removidas do hospedeiro (autólogas) ou de outros indivíduos (alógenas). Estas células sofreram, em cultura, crescimento para expansão numérica ou então, um processamento mínimo como separação destas dos tecidos (Huang et al., 2013).

A estratégia de regeneração por transplantação celular, que implica recolha de tecidos por meio de biopsia, expansão de populações celulares e subsequente implantação destas, por meio de biomateriais, no espaço pulpar desinfetado encontra-se representada na figura seguinte (Fig. 10) (Sun et al., 2011).

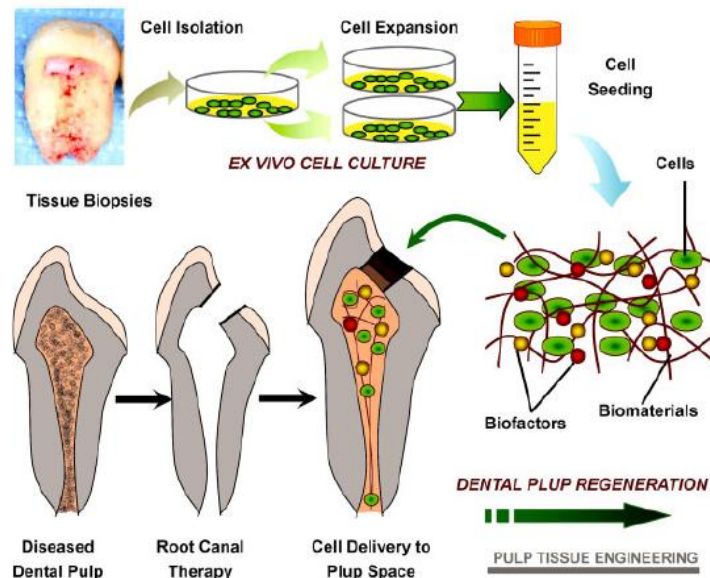


Figura 10. Processo *cell-based* para regeneração pulpar (Fonte: Sun, Jin, Yu & Chen, 2011).

Esta técnica utiliza células estaminais da polpa dentária e de várias outras origens, sendo que, estas participam no processo regenerativo não só por providenciarem células como também fatores de crescimento para aumentar a atividade celular de origem endógena e de células transplantadas (Fig. 11a) (Kim et al., 2013).

A técnica *cell-based* revela-se eficiente no processo de reparação de defeitos de tamanho amplo promovendo bons resultados devido ao seu potencial, mediante sinais microambientais, de divisão e diferenciação (Huang, 2011).

São necessárias construções de tecidos ou ainda de órgãos *in vitro* para posterior transplante. A maioria das culturas de células *in vitro* desenvolve-se como uma monocamada ligada à base de frascos de cultura, porém, algumas células estaminais só sobrevivem se forem colocadas em cultura sobre uma camada de células que permitam a sua alimentação; as células estaminais são cultivadas em duas dimensões, no entanto e teoricamente, seria possível tornar a sua cultura tridimensional se estas fossem cultivadas em filtros de membrana biodegradáveis, com múltiplos filtros enrolados e posterior implantação no sistema de canais radiculares desinfetados (Huang, 2009).

Neste sistema, as células são relativamente fáceis de cultivar em filtros em ambiente de laboratório. As folhas cultivadas com agregados celulares são mais estáveis aquando da injeção no sistema de canais do que células dissociadas, porém, como potencial problema poderão ser necessários procedimentos específicos para garantir que as células adiram corretamente às paredes do canal radicular (Murray et al., 2007).

Esta técnica possui para além de vantagens, desvantagens a ela associada. De entre estas, incluem-se: a implantação das folhas com células revela-se morosa pois são muito débeis, finas e sem vascularização, logo teriam de ser implantadas na porção apical do dente por meio de um *scaffold* capaz de suportar proliferação celular e, as células encontram-se em risco de anoxia e necrose se estas se encontrarem localizadas a aproximadamente 200 µm a partir da distância máxima de difusão de oxigénio de um suprimento capilar sanguíneo (Murray et al., 2007).

Segundo Huang et al. (2013), uma preocupação fundamental subjacente ao processo regenerativo do tecido pulpar seria a restrição de suprimento sanguíneo do forâmen apical. Esta restrição poderia complicar o fenómeno de angiogénese, no entanto e mais recentemente, comprovou-se exatamente o oposto indicando que se o canal se encontrar preenchido com células estaminais tais como SCAP ou DPSC poderá ocorrer regeneração pulpar e vascularização com êxito podendo ainda, no canal, existir deposição de uma estrutura similar a dentina.

## **2.5- Técnica *cell-free***

De acordo com a técnica *cell-free* deverá ocorrer migração de células distantes ou adjacentes para ocupação do espaço de canal, e neste, sofrerem um processo de diferenciação em células pulpares e linhagens odontoblásticas (Huang & Garcia-Godoy, 2014).

A regeneração tecidular poderá ser efetuada por *homing* de células endógenas como substituição de transplante de células exógenas, no entanto, o fenómeno de auto-regeneração ou regeneração de *homing* celular, em situações de perda de um órgão na sua totalidade, não é esperado uma vez que assim o tamanho do defeito é amplamente ultrapassado (Huang et al., 2013).

*Homing* celular, em engenharia tecidual, é definido como sendo o processo de recruta ativa, migração e mobilização de células endógenas direcionadas para o compartimento anatómico onde é requerida regeneração, ou seja, para locais onde existam defeitos anatómicos, por meio de uso de um *scaffold* que permite colonização celular e equilíbrio de fatores de crescimento/moléculas sinalizadoras (Fig. 11b) (Kim et al., 2013).

Pode ser considerado um tipo de *homing* celular, o protocolo atual de revascularização, sendo que o coágulo criado neste atua como *scaffold* no espaço de canal. Por sua vez, os fatores de crescimento presentes no coágulo sanguíneo podem auxiliar na recruta de células estaminais, no entanto, a extensão desta é pouco clara (Huang et al., 2013).

Quando o defeito tecidual em questão não é muito extenso torna-se preferível utilizar uma técnica *cell-free*, uma vez que, a utilização de células como um meio terapêutico, especialmente as expandidas *ex vivo*, é um processo muito complexo. Em situações em que apenas pequenas porções de dentina foram perdidas, os fatores de crescimento, permitem a atração de células estaminais na polpa remanescente para permitir a regeneração da porção perdida. A técnica *cell-free* apresenta-se, por estes motivos, como sendo uma abordagem de preferência, no entanto, não existe evidência de regeneração mais extensiva (Huang, 2011).

Segundo aprovação da FDA, já se encontram no mercado produtos comercializáveis de *homing* celular sendo, assim, esperada a aprovação de outras moléculas de sinalização de forma relativamente mais acessível comparativamente com produtos de caráter celular estaminal (Kim et al., 2013).

Segundo Schmalz e Smith (2014), uma importante questão acerca da tradução clínica de regeneração pulpar prende-se com o desenvolvimento de técnicas *cell-free* e *cell-based*. A técnica *cell-based* implica a necessidade de produção de preparações celulares de elevada qualidade pela utilização de instalações adequadas, com controlos reguladores a elas associados e uso de células autólogas, pois, pelo uso de demais células poderá estar associado risco de rejeição imunitária. Ainda sobre esta técnica, Schmalz e Smith, questionam como a atual prática clínica poderá ser alterada para facilitar a introdução de procedimentos como transplante de células.

Como forma de diminuir os desafios associados com o desenvolvimento de procedimentos clínicos terapêuticos, Schmalz e Smith (2014), consideram poderem ser utilizadas técnicas *cell-free*. Estas técnicas permitem, por meio de *homing* celular, explorar o processo de recruta de MSCs, em direção à polpa, através da vascularização no decorrer da reparação natural na polpa ou pela estimulação deste processo. Para além disso, as técnicas, permitem a focalização em alvos de origem molecular que favorecem a atração de células pulpares.

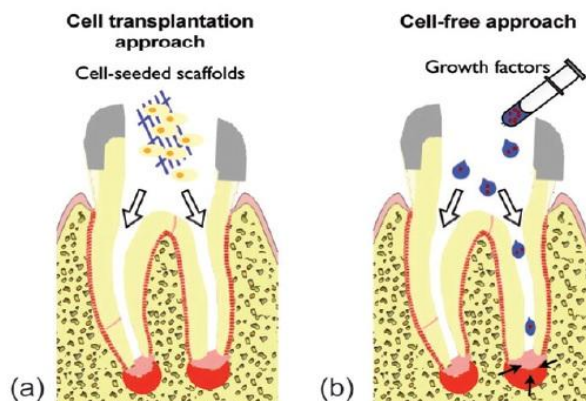


Figura 11. Técnicas *cell-free* e *cell-based*. (a) Técnica de transplantação celular ou *cell-based*- as células estaminais são depositadas nos canais radiculares sob a forma de *scaffolds*. Ocorre regeneração não só pelo fornecimento de células mas também por fatores de crescimento sob forma de fatores tróficos. (b) Técnica *cell-free*- os *scaffolds* encontram-se repletos com fatores de crescimento sendo então injetados no espaço do canal de forma a induzir migração, proliferação e posterior diferenciação de células endógenas estaminais residentes no ápice radicular (Fonte: Kim et al., 2013).

## 2.6- Scaffold

Com o intuito de se obter regeneração de estruturas dentárias ou inclusive do dente na sua totalidade, a engenharia tecidual faz uso da combinação de células estaminais, fatores de crescimento e *scaffold*. Estes últimos são um importante contributo para facilitar a distribuição destas células e/ou fatores de crescimento localmente. Atualmente, os estudos encontram-se direcionados de uma forma preferencial, para a adaptação de características conformacionais dos biomateriais de forma a incentivar interações guiadas, coordenadas, oportunas e especialmente adequadas entre células estaminais e as matrizes de *scaffold* (Fig. 12) (Sharma, Srivastava, Grover & Sharma, 2014).

Os *scaffolds*, por definição “providenciam um micro ambiente tridimensional físico-químico e biológico para crescimento e diferenciação celular promovendo adesão e migração celular” (Deepak et al., 2011).

Um *scaffold* apropriado pode assim, seletivamente localizar e ligar células, conter fatores de crescimento e sofrer biodegradação ao longo do tempo (Hargreaves et al., 2011).

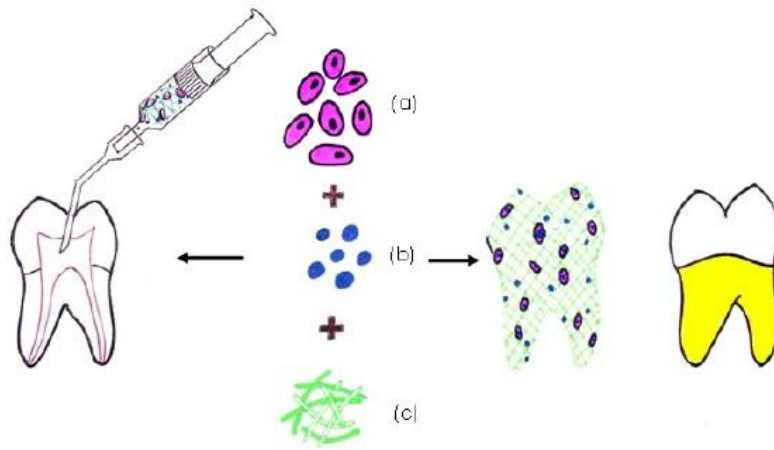


Figura 12. Combinação de (a) células estaminais, (b), fatores de crescimento e (c) matriz de *scaffold* numa construção tridimensional dentária ou injeção no local pretendido para regeneração do dente ou elementos deste (Sharma, Srivastava, Grover & Sharma, 2014).

Estes materiais podem ser fabricados sob a forma de géis, folhas ou mesmo ainda de estruturas de elevada complexidade com poros e canais devendo sofrer degradação gradual após implantação, para que possam ser substituídos por novo tecido. Os *scaffolds* devem igualmente ser porosos, biocompatíveis, não tóxicos, com capacidade de suporte de crescimento celular, apresentarem recetividade à esterilização, demonstrarem eficácia no transporte de nutrientes, fazerem uso de oxigénio e resíduos e, ainda, deve ser possível a sua utilização como veículos de distribuição de proteínas e controladores génicos (Malhotra e Mala, 2012).

A degradação destes materiais é uma etapa essencial devendo o *scaffold*, que atua como modelo para regeneração, ser reabsorvido assim que o novo material tenha sido gerado. Esta degradação deve ocorrer a uma taxa compatível com a formação destes novos tecidos devendo os produtos oriundos deste processo não ser tóxicos e serem de relativa facilidade de remoção ou degradação para que haja minimização da resposta inflamatória (Rosa et al., 2012).

Um *scaffold* pode também conter nutrientes e possivelmente antibióticos sendo os nutrientes importantes para promover a sobrevivência e crescimento celular e, os antibióticos, como forma de prevenção contra crescimento bacteriano no interior do sistema de canais (Murray et al., 2007).

As características físico-mecânicas dos *scaffolds* tais como interconetividade, forma e tamanho de poros e taxa de porosidade são determinantes críticos do comportamento celular e conseqüentemente da formação de tecidos (Demarco et al., 2011).

Tanto a quantidade como a extensão dos poros alteram a permeabilidade e as propriedades mecânicas do *scaffold* influenciando a sedimentação celular, crescimento de tecidos e difusão de nutrientes. Assim, poros em maior quantidade e extensão, permitem que a celularidade seja aperfeiçoada e a resistência do *scaffold* seja reduzida. As propriedades mecânicas têm um impacto direto na formação de tecidos, ao afetar a diferenciação celular no tipo de fenótipo pretendido, através de mecanotransdução. O *scaffold* deve, assim, ser mecanicamente compatível com os tecidos circundantes (Rosa et al., 2012).

Idealmente, o *scaffold* deve permitir a funcionalidade de múltiplos tipos de células incluindo odontoblastos, cementoblastos, fibroblastos pulpares, células vasculares e/ou terminações nervosas e ainda potencialmente ameloblastos (Yildirim et al., 2011).

*Scaffolds* podem ser classificados como sendo naturais ou sintéticos e, ainda, como sendo rígidos e não rígidos. Os biomateriais naturais permitem o suporte de células contribuindo para a sua sobrevivência e função e, como tal, melhoram o desempenho e biocompatibilidade celular. Porém, apresentam ainda múltiplas desvantagens tais como fonte variável, imunogenicidade se não forem puros, variedade limitada de propriedades mecânicas e, ainda, falta de controlo sobre o tamanho de poros (Sharma et al., 2014).

Os materiais naturais apresentam biocompatibilidade superior comparativamente com os materiais sintéticos, porém, estes últimos permitem um controlo aperfeiçoado sobre características físico-químicas do meio sendo relativamente livres de contração e conduzindo mais ao crescimento de novos tecidos (Chandki et al., 2012).

Os biomateriais sintéticos podem ser fabricados, sob condições controladas, em quantidade ilimitada, são menos dispendiosos e podem ser adaptados de maneira a obter a forma pretendida sendo que as suas propriedades fazem com que sejam adequados para a aplicação desejada. De entre essas propriedades encontram-se diferenciação celular e propriedades mecânicas e químicas, especialmente a força, características dos poros e taxa de degradação. Estes materiais apresentam como desvantagem, não possuírem locais de adesão celular requerendo assim modificações químicas para aumentar este processo (Sharma et al., 2014).

Os *scaffolds* naturais são compostos por materiais hidrofílicos e nativos que permitem interações celulares prevenindo assim uma resposta inflamatória (Rosenbaum et al., 2008).

Os polímeros sintéticos são usualmente degradados por hidrólise enquanto os naturais são geralmente degradados por meio de enzimas (Bansal & Bansal, 2011).

A tabela seguinte descreve as propriedades, vantagens e desvantagens associadas aos seguintes materiais naturais: Quitosana, Fibrina, fibroína de Seda, Gelatina, Colagénio, ácido Hialurónico e Alginato (Tab. 11) (Tarun, Ajay, Bhawna, Sunil & Ravi, 2011):

<i>Scaffold</i>	<b>Propriedades</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Quitosana</b>	Quitosana, a forma desacetilada total/parcial de quitina. A sua ampla variedade de aplicação vai desde pele, cartilagem, osso e enxertos vasculares a substratos de cultura de células de mamíferos	Biologicamente renovável, biodegradável, não-antigénico, não-tóxico, biofuncional, materiais bioadesivos	Provoca rápida regeneração óssea em estágios iniciais. Formação óssea após implantação destas matrizes ocorre após um longo período
<b>Fibrina</b>	Fibrina é uma rede complexa formada por polimerização de fibrinogénio na presença da enzima trombina	Induz interação celular aperfeiçoada, elevada biocompatibilidade	Rápida degradação <i>in vivo</i> . Difícil de manter a integridade estrutural

<b>Fibroína de Seda</b>	Fibroína é uma proteína fibrosa que constitui o cerne da seda, enquanto a sericina é uma proteína tipo cola que circunda a fibroína	Biocompatibilidade, degradação lenta, excelentes propriedades mecânicas	Pouca produção de seda por aranhas
<b>Gelatina</b>	Deriva do colagénio, insolúvel em água	Biodegradação e biocompatibilidade em ambiente fisiológico, baixa antigenicidade	Fracas propriedades mecânicas, quebradiço
<b>Colagénio</b>	Componente da matriz extracelular natural (ECM)	Biocompatível, bom reconhecimento celular	Fracas propriedades mecânicas
<b>Ácido Hialurónico</b>	Componente da ECM natural, papel na cicatrização natural de lesões	Biocompatível, facilmente funcionalizado, bom reconhecimento celular	Fracas propriedades mecânicas
<b>Alginato</b>	Origina-se a partir de algas marinhas, estruturalmente similar ao glicosaminoglicano natural	Biocompatível, métodos simples de gelificação	Fracas propriedades mecânicas

Tabela 11. Representação das propriedades, vantagens e desvantagens de biomateriais naturais utilizados como *scaffolds* (Adaptada de: Tarun, Ajay, Bhawna, Sunil & Ravi, 2011).

Os polímeros sintéticos são divididos em duas categorias: biodegradáveis ou não biodegradáveis. As propriedades destes materiais, tal como as suas vantagens e desvantagens são descritas na tabela a seguir representada (Tab. 12) (Tarun et al., 2011):

<i>Scaffold</i>	Propriedades	Vantagens	Desvantagens
<b>Polímeros de grande volume tais como (ácido polilático, ácido poliglicólico, ácido poli lático-glicólico, polipropileno fumarato)</b>	Propriedades mecânicas e de degradação podem ser ajustadas por segmentos poliméricos variáveis	Excelente biocompatibilidade, bom reabsorvível, excelente taxa de degradação	Produzem condição local acídica pela degradação de produtos, possível resposta inflamatória, fraca adesão celular, fraca resistência à compressão
<b>Polietilenoglicol</b>	Utilizado como um <i>scaffold</i> injetável, propriedades mecânicas e de degradação podem ser ajustadas por segmentos poliméricos variáveis	Biocompatível, hidrofílico	Fraca adesão celular
<b>Polímeros de superfície erodíveis (poliortoesteres, polianidridos, polifosfazeno)</b>	Comumente utilizados em colocação de fármacos avançada devido às suas propriedades erosivas de superfície	Excelente biocompatibilidade, possível retenção de integridade mecânica	Não podem ser completamente substituídos por tecido ósseo

Tabela 12. Representação das propriedades, vantagens e desvantagens de biomateriais sintéticos utilizados como *scaffolds* (Adaptada de: Tarun, Ajay, Bhawna, Sunil & Ravi, 2011).

Comparativamente, de acordo com a rigidez, os biomateriais dúcteis providenciam encapsulamento de células e os rígidos, por sua vez, substituição estrutural. Para regeneração pulpar, a matriz deverá ser preferencialmente dúctil e ainda

injetável para que a distribuição no espaço do complexo pulpar seja facilitada, permitir a fixação das células à matriz e as paredes da cavidade pulpar circundantes, apresentar contração reduzida e, ainda, sustentar a vascularização (Sharma et al., 2014).

Em termos de aplicação prática clínica, o Plasma rico em plaquetas (PRP) satisfaz vários critérios de seleção de um *scaffold* sendo este autólogo, de fácil preparo, rico em fatores de crescimento e de degradação gradual formando uma matriz tridimensional de fibrina (Hargreaves et al., 2011).

Os procedimentos que utilizam como base PRP são elementares, uma vez que este material pode ser adquirido a partir do próprio paciente de forma simples e célere, com menor hipótese de resposta imunológica ou de transmissão de doenças. Na realidade, tanto o PRP como as suas formulações associadas ainda não demonstraram potencial de regeneração pulpar, porém, avanços da terapêutica baseada em PRP noutros campos sugerem que existe possibilidade de transformação de novas preparações de plaquetas como veículos de células/fármacos que possam ser manipulados, estudados e aplicados com relativa facilidade por clínicos e, assim, vir a ter aplicabilidade em Endodontia Regenerativa (Sun et al., 2011).

Bansal e Bansal (2011) compilaram na tabela (Tab. 13) a seguir representada vários *scaffolds* estudados por vários investigadores e os respetivos resultados de cada estudo:

Investigadores	<i>Scaffold</i> estudado	Resultados do estudo
<b>Feng t al.</b>	Colagénio (natural)	Colagénio providencia elevada resistência à tração nos tecidos. Permite uma fácil colocação de células e fatores de crescimento e a substituição com tecidos naturais após sofrer degradação.
<b>Sharma et al.</b>	Colagénio (natural), PLA, PGA (sintético)	<i>Scaffold</i> natural providencia boa biocompatibilidade e biodisponibilidade, <i>scaffolds</i> sintéticos oferecem maior controlo sobre a taxa de degradação e propriedades mecânicas.
		Todos os três tipos suportaram ligação,

<b>Zhang et al.</b>	Colagénio esponjoso, cerâmica porosa, rede fibrosa de titânio	crescimento e diferenciação de DPSCs <i>in vitro</i> e, as células organizaram-se num tecido bem vascularizado que expressa DSPP, um marcador de dentina <i>in vivo</i> .
<b>Huang et al.</b>	Colagénio e PLG	Os <i>scaffolds</i> poliméricos (PLG) são resistentes à contração quando comparados ao colagénio.
<b>Gebhardt et al.</b>	Polímero, colagénio, <i>scaffold</i> biocerâmico de fosfato de cálcio	A taxa de sobrevivência de DPSCs e PDLSCs foi ótima em colagénio e em <i>scaffold</i> polimérico quando comparada com <i>scaffold</i> de fosfato de cálcio.
<b>Mooney et al.</b>	PGA	PGA atuam como adequadas matrizes para sedimentação de fibroblastos pulparentes dentários, permitem a proliferação e desenvolvimento de um tecido com celularidade semelhante à polpa normal.
<b>Bohl et al.</b>	Polímero de PGA	A cultura de células estaminais pulparentes em PGA <i>in vitro</i> resultou num tecido de elevada densidade celular semelhante à polpa nativa.
<b>Buurma et al.</b>	PGA	<i>Scaffolds</i> poliméricos são os mais promissores para criação de tecido de substituição. Polpa dentária humana e fibroblastos gengivais aderem a <i>scaffolds</i> de PGA não tecido, proliferam e produzem matriz extracelular <i>in vitro</i> .
<b>Chen et al.</b>	Dextrano metacrilato glicidil (Dex-GMA) hidrogel híbrido de gelatina	Aumenta a ligação, proliferação e diferenciação de PDLSCs. Quando DPSCs foram enxertadas em

<b>El-Backly et al.</b>	Ácido poli (lático-co-glicólico) <i>Scaffold</i> poroso polimérico	<i>scaffolds</i> poliméricos de ácido poli (lático-co-glicólico) e implantados num coelho ocorreu formação de matriz de osteodentina com estrutura tubular.
<b>Xu et al.</b>	<i>Scaffold</i> de seda	Este é o primeiro estudo a caracterizar tecido bioconstruído gerado a partir de células do germen dentário depositadas num <i>scaffold</i> de seda.
<b>Etienne et al.</b>	<i>Scaffold</i> de seda	Estes <i>scaffolds</i> foram capazes de criar um aumento de tecido flexível tridimensional de longa duração e a análise histológica revelou revascularização da área através do biomaterial.
<b>Guo et al.</b>	Matriz de dentina tratada (TDM)	TDM providenciou adequado <i>scaffold</i> e microambiente indutor para crescimento de células do folículo dentário (DFCs)
<b>Inuyama et al.</b>	Esonja de ácido Hialurónico (HA)	A esponja de HA possui uma apropriada estrutura, biocompatibilidade e biodegradação para uso como <i>scaffold</i> .
<b>Lyngstadaas et al.</b>	Derivado de matriz de esmalte (Emdogain)	As amelogeninas no Emdogain automontam-se em nanoesferas que constituem uma matriz extracelular. Esta matriz é lentamente digerida por enzimas proteolíticas extracelulares para libertação de péptidos bioativos.

Tabela 13. *Scaffolds* estudados por vários investigadores (Adaptada de: Bansal & Bansal, 2011).

### 2.6.1- *Scaffold* injetável

Uma combinação de células estaminais, fatores de crescimento e *scaffolds* deve ser colocada de uma maneira espacialmente apropriada no espaço de sistema de canais radiculares enquanto é mantida uma adequada difusão de oxigénio e nutrientes. Como

tal, pode ser injetada uma mistura de células/*scaffold*/fator de crescimento no 1mm apical do sistema de canais radiculares seguido de preenchimento com uma combinação de *scaffold* /fator de crescimento (Hargreaves et al., 2011).

Os polímeros de hidrogel são *scaffolds* injetáveis que podem ser administrados por meio de seringa nos sistemas dos canais radiculares sendo que, teoricamente, estes podem promover regeneração pulpar ao providenciar um substrato para proliferação e diferenciação celular numa estrutura de tecidos organizada (Murray et al., 2007).

Os hidrogéis apresentam elevado teor de água, consistência suave e flexível e uma baixa tensão de interface com água ou fluidos biológicos (Bansal e Bansal, 2011).

O grau de *crosslinking* das cadeias poliméricas no interior do hidrogel pode ser aumentado, podendo assim, as propriedades mecânicas serem melhoradas (Hacking & Khademhosseini, 2009).

Anteriormente, os hidrogéis apresentavam controle limitado sobre formação e desenvolvimento tecidual, porém, com os avanços na formulação houve uma melhoria na habilidade para suporte de sobrevivência celular (Murray et al, 2007).

#### **2.6.2- Uso de um hidrogel peptídico de auto-montagem personalizado para engenharia de tecidos pulpares**

Galler, Hartgerink, Cavender, Schmalz e D'Souza (2012) utilizaram um hidrogel peptídico de auto-adesão e auto-clivável que apresentava propriedades viscoelásticas para que pudesse ser injetado no canal radicular por meio de seringa e, localmente, voltar a demonstrar rigidez. Foi colocada como hipótese, a incorporação de células estaminais derivadas da polpa conjuntamente com fatores bioativos num *scaffold* para que pudesse ocorrer proliferação celular, diferenciação e angiogênese. O TGF $\beta$ 1 e o FGF2 atuaram conjuntamente de forma sinérgica estimulando a proliferação, citodiferenciação e mineralização. A presença de heparina (grupo experimental) quando comparada com PBS (grupo de controle), causou um adiamento da libertação dos fatores de crescimento confirmando, assim, que a ligação de nanoestruturas ligadoras de heparina com fatores de crescimento retardam a sua libertação.

Segundo Galler et al. (2012) somente ocorre proliferação suficiente e formação de tecido na presença de fatores de crescimento/células estaminais/*scaffolds*, que formam um tecido conetivo vascularizado que se assemelha à polpa dentária e, as células promovem a degradação do hidrogel peptídico e substituem-no por uma matriz extracelular de colagénio. Foi concluído que a matriz utilizada demonstrava qualidades superiores quando comparada a materiais convencionais não personalizáveis, que as DPSCs aparentam apresentar maior aplicabilidade por apresentaram taxas de proliferação aumentadas com o motivo RGD (motivo de adesão celular arginina-glicina-ácido aspártico) em géis peptídicos e, que os fatores de crescimento foram por si só capazes de atrair células hospedeiras.

## **2.7- Impressão celular tridimensional**

De forma a recriar a polpa dentária, poderá ser utilizada uma técnica de impressão tridimensional de células fazendo uso de um dispositivo de jato de tinta para dispensa de camadas de células suspensas num hidrogel (Murray et al., 2007).

Esta técnica envolve o desenvolvimento de modelos e impressão de órgãos e o condicionamento e maturação acelerada destes (Horst, Chavez, Jheon, Desai & Klein, 2012).

Por meio de impressão tridimensional é possível que sejam construídos, célula-a-célula, *scaffolds* heterogéneos tridimensionais. Esta técnica abrange o posicionamento de múltiplos tipos celulares num *scaffold* flexível, tal como uma estrutura de hidrogel, de acordo com um projeto produzido com auxílio de um computador. A estrutura tridimensional e, ainda, espessura do *scaffold* podem ser controlados por meio desta tecnologia (Malhotra & Mala, 2012).

A impressão celular tridimensional posiciona idealmente os odontoblastos na periferia e os fibroblastos no centro pulpar. Os odontoblastos seriam um contributo para a reparação e manutenção dentinária e, por sua vez, os fibroblastos atuariam como um apoio de uma rede vascular e de células nervosas (Murray et al., 2007).

## 2.8- Terapia genética

As células humanas contêm uma fita de 1 m de DNA que contém em si 3 bilhões de pares de base excetuando células anucleadas e células sanguíneas vermelhas, por sua vez, a molécula de DNA contém sequências genéticas, ou seja, genes que controlam a atividade e função celular. Compreendendo isto, na terapia genética, podem ser aplicados genes para fatores de crescimento, morfogénios, fatores de transcrição e moléculas da matriz extracelular por meio de vetores não virais e virais (Murray et al., 2007).

O gene pode estimular ou induzir um processo natural biológico ao expressar moléculas envolvidas na resposta de carácter regenerador para o tecido pretendido. Assim, para que esta terapia tenha sucesso, será necessário um transporte e transferência eficaz de genes em células de tecidos-alvo, rápida avaliação da expressão génica em situações específicas e a níveis apropriados e, ainda, toxicidade sistémica mínima (Nakashima & Akamine, 2005).

Podem ser utilizados vetores virais ou não virais para permitir a absorção celular e a expressão génica. Os vetores virais podem replicar genes de interesse juntamente com o seu genoma, pelo uso da maquinaria genética do hospedeiro celular, e são caracterizados por serem geneticamente alterados para que o seu potencial causador de doenças seja eliminado (Bansal & Bansal, 2011).

De entre os vetores virais encontram-se os adenovírus, retrovírus e vírus herpes simplex e de entre os não virais os plasmídeos, péptidos e lipossomas catiónicos. Tanto os vetores virais como os não virais poderão ser utilizados para distribuição de genes por meio da técnica *in vivo* ou pela técnica *ex vivo* (Malhotra e Mala, 2012).

Os vetores virais têm como vantagem a relativa facilidade com que entram nas células do recipiente, porém, também apresentam dificuldades tais como, controlo da produção viral, capacidade de transporte, dependência da proliferação celular, etc. (Passarge, 2013).

Na tabela seguinte (Tab. 14), por Bansal e Bansal (2011), encontram-se descritos múltiplos vetores virais estudados por diferentes investigadores e os resultados subsequentes de cada estudo respetivamente:

Investigadores	Vetor viral estudado	Resultados do estudo
<b>Naldini et al.</b>	Retrovírus	Demonstração <i>in vivo</i> de colocação de genes e transdução estável de células não divisíveis.
<b>Rutherford et al.</b>	Vírus recombinante codificando BMP-7	Método eficaz para induzir regeneração de dentina no dente com pulpite reversível.
<b>Sugiyama et al.</b>	Lentivírus recombinante codificando BMP-2	Células de estroma da medula óssea infetadas com este vetor demonstraram estável expressão de BMP-2.
<b>Yang et al.</b>	Adenovírus codificando gene BMP-2	Demonstrou expressão odontogénica aperfeiçoada.
<b>Zhang et al.</b>	Adenovírus codificando BMP-7	Formação óssea nestes <i>scaffolds</i> foi superior.
<b>Shang et al.</b>	Adenovírus codificando PDGF-B	Modulação da atividade de proliferação de PDLSCs; expressão elevada de colagénio tipo I.
<b>Scheller et al.</b>	Retrovírus codificando forma ativa de catenina- $\beta$	Sobre-expressão de catenina- $\beta$ suprime a diferenciação e mineralização de DPSCs (regula negativamente a diferenciação tipo odontoblástica de DPSCs)
<b>Zhang et al.</b>	Adenovírus codificando BMP-7, PDGF-B ou combinação de ambas	Todos os três <i>scaffolds</i> demonstraram aumento de formação óssea (aumento máximo em combinação).

Tabela 14. Vetores virais estudados no âmbito de terapia genética por múltiplos autores (Adaptada de: Bansal & Bansal, 2011).

As técnicas não-virais incluem eletroporação ou uso de ultrassons para distribuição de genes. Esta distribuição tem êxito, por meio de método de ultrassons, tanto *in vivo* como *in vitro*. O método de eletroporação apenas apresenta resultados *in vitro* podendo este facto dever-se à falta de eritrócitos no coágulo plasmático devido a alterações térmicas durante o processo. *In vivo*, o gene sofre distribuição para a corrente

sanguínea ou localmente para os tecidos-alvo, por inalação ou injeção, sendo o potencial de cura do tecido pulpar melhorado por genes indutores de dentina diretamente sobre a polpa dentária amputada exposta. Por sua vez, a abordagem *ex vivo* envolve a manipulação genética de células *in vitro*, que são posteriormente transplantadas para o local de regeneração para que seja estimulada formação de dentina reparadora mais rapidamente e de forma otimizada (Bansal & Bansal, 2011).

Sendo assim, ambas as técnicas, *in vivo* e *ex vivo*, podem ser utilizadas (Tab. 15). A escolha da técnica a utilizar será sempre feita mediante as características do tecido alvo. De entre essas, encontram-se a morfologia e fisiologia do vetor utilizado, da natureza da patologia e, ainda, do procedimento em si no que diz respeito à segurança a ele associada (Nakashima & Akamine, 2005).

<b>Métodos <i>In Vivo</i></b>	<b>Métodos <i>Ex Vivo</i></b>
Adicionar gene <i>In Vivo</i> para induzir nova função Exemplos: angiogênese	Cultivar células <i>Ex Vivo</i> , adicionar gene, transplantar de volta para o hospedeiro Exemplos: crescimento de novo de cartilagem e osso

Tabela 15. Terapia gênica- método *in vivo* e *ex vivo* para confecção de células para aplicação em terapia (Adaptada de: Nakashima & Akamine, 2005).

*In vivo*, parece ser uma técnica eficaz para regeneração de dentina/proteção pulpar, apenas quando exista tecido não infetado pulpar apical que contenha células estaminais progenitoras, em número suficiente, mesmo após remoção da polpa necrótica ou infetada. A técnica *ex vivo* é essencialmente viável em situações em que as células requeiram uma fonte de nutrientes e oxigênio, como em casos de inflamação severa, para manter a sua viabilidade. O ambiente lesado teria, assim, de desenvolver um leito vascular a partir de elementos existentes no forâmen apical ou de elementos da polpa (Edwards & Mason, 2006).

*Ex vivo* aparenta ser uma técnica proveitosa em casos de pulpíte reversível e/ou poucas células estaminais no tecido pulpar. Esta técnica afasta a urgência de limpeza e conformação dos canais e implantação de células estaminais nestes, porém, esta técnica

ainda não apresenta indicações de ser bem-sucedida como parte de terapias regenerativas (Malhotra & Mala, 2012).

O uso desta técnica a nível endodôntico seria para colocação de genes de mineralização em tecidos pulpare para promover mineralização tecidual. Contudo, esta técnica ainda acarreta muitos riscos necessitando assim de maior desenvolvimento para tratamento endodôntico (Deepak et al., 2011).

Segundo Bansal e Bansal (2011) existem ainda alguns desafios associados à empregabilidade da terapia genética sendo necessário estabelecer o isolamento, identificação e protocolo de expansão de células estaminais pulpare, os sistemas de distribuição génica deverão ser otimizados, será necessário aprender a controlar esta terapia de forma precisa para uso clínico seguro e ainda requisitos para demonstração do custo-benefício e, possibilidade de tratamento seguro e de longo prazo de condições que de outra forma poderiam implicar necrose pulpar.

### III- CONCLUSÃO

A reparação e regeneração, como foi concluído, são dois conceitos diferentes muitas vezes confundidos e pobremente aplicados.

A reparação procura essencialmente manter a vitalidade pulpar, nomeadamente, quando estamos perante uma situação reversível.

Atualmente, pela remoção da porção afetada e pelo uso de agentes protetores que estimulam a formação de nova dentina reativa ou reacional é possível, até certo ponto, ter um resultado favorável no que diz respeito a adiar ou até mesmo evitar um procedimento endodôntico. No entanto, estas técnicas ainda se revestem de muitas questões nomeadamente no que diz respeito ao deixar, ainda em boca, cárie em métodos de proteção pulpar indireta. Futuramente é esperado poder incluir fatores de crescimento nos inúmeros materiais, ainda em expansão, de proteção pulpar de forma a contribuir para o avanço destas técnicas de vitalidade pulpar.

Os métodos de Endodontia Regenerativa surgem como uma possível alternativa de forma a poder contornar os métodos tradicionais, em que é colocado um material biocompatível no espaço de canal, quando os dentes ultrapassam o limite de reversibilidade ficando estes mais frágeis e de fácil fratura, e ainda, como última instância para manter dentes em boca que de outra forma teriam de ser extraídos.

Vários estudos atualmente direcionam os métodos de endodontia regenerativa para dentes imaturos promovendo o seu desenvolvimento radicular continuado, no entanto, pretende-se que a aplicabilidade seja estendida a dentes permanentes.

Pelas técnicas abordadas é possível constatar o avanço da Medicina Regenerativa aplicada à Endodontia, até aos dias de hoje, principalmente pela utilização da tríade *scaffold*/células estaminais/fatores de crescimento. Idealmente, a regeneração do complexo pulpo-dentinário passaria pelo uso de células estaminais do próprio hospedeiro e, preferencialmente, o desenvolvimento pulpar deveria ocorrer diretamente no espaço de canal de forma a evitar possíveis contaminações e demais problemas associados à sua manipulação *in vitro*. As técnicas associadas a estes métodos deverão ser facilmente aplicadas em meio clínico e com protocolos bem definidos.

As técnicas regenerativas aplicadas à Endodontia, ainda com múltiplas vantagens e desvantagens, são ainda muitas delas hipotéticas ou sem reprodutibilidade em humanos. É, no entanto, expectável que estas continuem o seu desenvolvimento de forma a serem exequíveis recorrentemente por endodontistas, de maneira a salvaguardar a dentição no arco dentário.

O futuro desta área passa pela otimização dos componentes que dela fazem parte e das suas múltiplas técnicas para que não seja apenas mais uma alternativa mas sim uma inevitabilidade. Os métodos tradicionais endodônticos, eventualmente, tornar-se-ão obsoletos ou de pouca empregabilidade e, esta área, apresentar-se-á cada vez menos como um mito e mais como uma realidade.

#### IV- BIBLIOGRAFIA

- Abou Neel, E. A., Chrzanowski, W., Salih, V. M., Kim, H.-W. e Knowles, J. C. (2014). Tissue engineering in dentistry. *Journal of Dentistry*, 42 (8), 915-928. doi:10.1016/j.jdent.2014.05.008
- Banchs, F. e Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of Endodontics*, 30 (4), 196–200. doi:10.1097/00004770-200404000-00003
- Bansal, R. e Bansal, R. (2011). Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian Journal of Dental Research : Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 22 (1), 122–31. doi:10.4103/0970-9290.79977
- Bluteau, G., Luder, H. U., De Bari, C. e Mitsiadis, T. A. (2008). Stem cells for tooth engineering. *European Cells & Materials*, 16, 1–9. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3806253&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bragança, J., Tavares A. e Belo J. (2010). Células estaminais e medicina regenerativa um admirável mundo novo. *canalBQ, Revista Da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7, 4–17. Disponível em [http://www.spn.org.pt/docs/canal%20bq\\_stem%20cells.pdf](http://www.spn.org.pt/docs/canal%20bq_stem%20cells.pdf)
- Chandki, R., Kala, M., Banthia, P. e Banthia, R. (2012). From stem to roots: Tissue engineering in endodontics. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 4 (1), e66–71. doi:10.4317/jced.50678
- Cohenca, N., Paranjpe, A. e Berg, J. (2013). Vital Pulp Therapy. *Dental Clinics of North America*, 57 (1), 59-73. doi:10.1016/j.cden.2012.09.004
- Colombo, J. S., Moore, A. N., Hartgerink, J. D. e D’Souza, R. N. (2014). Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *Journal of Endodontics*, 40 (4), S6–12. doi:10.1016/j.joen.2014.01.019

- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., ... Nör, J. E. (2008). Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of Endodontics*, 34 (8), 962–9. doi:10.1016/j.joen.2008.04.009
- Correia R. e Bragança J. (2010). Células estaminais adultas em medicina. *canalBQ, Revista Da Sociedade Portuguesa de Bioquímica*, 7, 18-23. Disponível em [http://canalbq.spb.pt/docs/canalBQ\\_0007.pdf](http://canalbq.spb.pt/docs/canalBQ_0007.pdf)
- Demarco, F. F., Conde, M. C. M., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T. e Nör, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal*, 22 (1), 3–13. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-64402011000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402011000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Deepak, B. S., Nandini, D. B. e Sathyajith N. (2011). Tissue engineering: Is it the future of Endodontics? *People's Journal of Scientific Research*, 4 (1). Disponível em <http://www.pjsr.org/jan-2011pdf/Dr.%20Deepak%20B.S.%20-%202019.pdf>
- Diogenes, A., Y, M. a H., Teixeira, F. B. e Hargreaves, K. M. (2013). An update on clinical regenerative endodontics. *British Dental Journal*, 28 (1), 2-23. doi:10.1038/sj.bdj.2013.906
- Domicini, M., Le Blanc, K., Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ...Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8 (4), 315-317. Disponível em <http://www.medivet-america.com/documents/thescience/General/Minimal%20Criteria%20for%20defining%20multipotent%20mesenchymal%20stromal%20cells.%20The%20International%20Society%20for%20Cellular%20Therapy%20Position%20Paper.pdf>
- Edwards, P. C. e Mason, J. M. (2006). Gene-enhanced tissue engineering for dental hard tissue regeneration: (2) dentin-pulp and periodontal regeneration. *Head & Face Medicine*, 2, 16. doi:10.1186/1746-160X-2-16
- Estrela, C., Alencar, A. H. G. De, Kitten, G. T., Vencio, E. F. e Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration.

*Brazilian Dental Journal*, 22 (2), 91–8. Disponível em  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537580>

- Fuks, A. B. (2008). Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *Journal of Endodontics*, 34 (7), S18-24. doi:10.1016/j.joen.2008.02.031
- Galler, K. M., Hartgerink, J. D., Cavender, A. C., Schmalz, G. e D'Souza, R. N. (2012). A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Engineering. Part A*, 18 (1-2), 176–84. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0222
- Gandhi, A., Gandhi, T. e Madan, N. (2011). Dental pulp stem cells in endodontic research : a promising tool for tooth tissue engineering. *RSBO*, 8 (3), 335–341. Disponível em  
[http://vdisk.univille.edu.br/community/depto\\_odontologia/get/ODONTOLOGIA/RSBO/RSBO\\_v8\\_n3\\_julho-setembro2011/RSBO-v8n3-artigo14.pdf](http://vdisk.univille.edu.br/community/depto_odontologia/get/ODONTOLOGIA/RSBO/RSBO_v8_n3_julho-setembro2011/RSBO-v8n3-artigo14.pdf)
- Ghoddusi, J., Forghani, M. e Parisay, I. (2014). New approaches in vital pulp therapy in permanent teeth. *Iranian Endodontic Journal*, 9 (1), 15–22. Disponível em  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3881297&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Giordano, G., La Monaca, G., Annibali, S., Cicconetti, A. e Ottolenghi, L. (2011). Stem cells from oral niches: a review. *Annali Di Stomatologia*, 2 (1-2), 3–8. Disponível em  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3254390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Goldberg, M. (2011). Pulp healing and regeneration: more questions than answers. *Advances in Dental Research*, 23 (3), 270–274. doi:10.1177/0022034511405385
- Goldberg, M. e Schmalz, G. (2011). Toward a strategic plan for pulp healing: from repair to regeneration. *Clinical Oral Investigations*, 15 (1), 1–2. doi:10.1007/s00784-010-0503-x

- Hacking, S. A. e Khademhosseini, A. (2009). Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *Journal of Dental Research*, 88 (5), 409–21. doi:10.1177/0022034509334774
- Hargreaves, K. M., e Law, A. S. (2011). Regenerative endodontics. Hargreaves, K. M., Cohen, S., *Cohen´s pathways of the pulp* (pp. 602-619). 10ª edição. St. Louis, Missouri: Berman, L. H.
- Hargreaves, K. M., Diogenes A. e Teixeira F. B. (2013). Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*, 39 (3), S30-S4. doi:10.1016/j.joen.2012.11.025
- Horst, O. V., Chavez, M. G., Jheon, A. H., Desai, T. e Klein, O. D. (2012). Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dental Clinics of North America*, 56 (3), 495-520. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.009
- Hørsted-Bindslev, P, e Bergenholtz, G. (2010). Treatment of vital pulp conditions. Bergenholtz, G., Hørsted-Bindslev, P. e Reit, C (Eds.), *Textbook of Endodontology* (pp. 47-70). Oxford, UK: Autor
- Huang, G. T. J. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative Medicine*, 4 (5), 697–707. doi:10.2217/rme.09.45
- Huang, G. T. J. (2011). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: Advancement and challenge. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*, 3, 788-800. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3289134/pdf/nihms331027.pdf>
- Huang, G. T.-J., Al-Habib, M. e Gauthier, P. (2013). Challenges of stem cell-based pulp and dentin regeneration: a clinical perspective. *Endodontic Topics*, 28 (1), 51–60. doi:10.1111/etp.12035
- Huang, G. T.-J. e Garcia-Godoy, F. (2014). Missing concepts in de novo pulp regeneration. *Journal of Dental Research*, 93 (8), 717-724. doi:10.1177/0022034514537829

- Huang, G. T.-J., Gronthos, S. e Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88 (9), 792–806.  
doi:10.1177/0022034509340867
- Kim, S. G., Zheng, Y., Zhou, J., Chen, M., Embree, M. C., Song, K., ... Mao, J. J. (2013). Dentin and dental pulp regeneration by the patient's endogenous cells. *Endodontic Topics*, 28 (1), 106–117. doi:10.1111/etp.12037
- Kim, S. G., Zhou, J., Solomon, C., Zheng, Y., Suzuki, T., Chen, M., ... Mao, J. J. (2012). Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dental Clinics of North America*, 56 (3), 563–75. doi:10.1016/j.cden.2012.05.001
- Lin, L. M. e Rosenberg, P. a. (2011). Repair and regeneration in endodontics. *International Endodontic Journal*, 44 (10), 889–906. doi:10.1111/j.1365-2591.2011.01915.x
- Lymperi, S., Ligoudistianou, C., Taraslia, V., Kontakiotis, E. e Anastasiadou, E. (2013). Dental stem cells and their applications in dental tissue engineering. *The Open Dentistry Journal*, 7, 76–81. doi:10.2174/1874210601307010076
- Malhotra, N. e Mala, K. (2012). Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: past, current and future. *Australian Endodontic Journal : The Journal of the Australian Society of Endodontology Inc*, 38 (3), 137–48. doi:10.1111/j.1747-4477.2012.00355.x
- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T., Völlner, F., Galler, K. e Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clinical Oral Investigations*, 12 (2), 113-118. doi: 10.1007/s00784-007-0170-8
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F. e Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, 33 (4), 377–90. doi:10.1016/j.joen.2006.09.013
- Nakashima, M. e Akamine, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of Endodontics*, 31 (10),

711-718. Disponível em <http://endotreatment.gr/media/files/REGENERATIVE-ENDODONTICS/PIIS-6.pdf>

- Nakashima, M., Iohara, K. e Murakami, M. (2013). Dental pulp stem cells and regeneration. *Endodontic Topics*, 28 (1), 38-50. doi: 10.1111/etp.12027
- Nerem R. M. (2011) Tissue engineering: from basic biology to cell-based applications. Li, S., L'Heureux N., & Elisseeff, J. (Eds.). *Stem cell and tissue engineering* (pp. 1-11). 1ª edição. Singapore: Autor.
- Nosrat, A., Ryul Kim, J., Verma, P. e S Chand, P. (2014). Tissue engineering considerations in dental pulp regeneration. *Iranian Endodontic Journal*, 9 (1), 30–9. Disponível em <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3881299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Passarge, E. (2013). A brief guide to genetic diagnosis. *Color Atlas of Genetics* (pp. 396). 4ª edição. New York, EUA: Autor.
- Peng, L., Ye, L. e Zhou, X. (2009). Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *International Journal of Oral Science*, 1 (1), 6–12. doi:10.4248/ijos.08032
- Prescott, R. S., Alsanea, R., Fayad, M. I., Johnson, B. R., Wenckus, C. S., Hao, J., ... George, A. (2008). In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *Journal of Endodontics*, 34 (4), 421–426. doi:10.1016/j.joen.2008.02.005
- Rodríguez-Lozano, F., Insausti, C., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M., Meseguer, L., ... Moraleda, J. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina Oral Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 17 (6), 1062-1067. doi:10.4317/medoral.17925
- Rosa, V., Botero, T. M. e Nör, J. E. (2011). Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. *International Dental Journal*, 61 (1), 23-28. doi:10.1111/j.1875-595X.2011.00026.x

- Rosa, V., Della Bona, A., Cavalcanti, B. N. e Nör, J. E. (2012). Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 28 (4), 341–8. doi:10.1016/j.dental.2011.11.025
- Rosenbaum, A. J., Grande, D. A. e Dines, J. S. (2008). The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering: A global assessment. *Organogenesis*, 4 (1), 23–27. Disponível em [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634175/pdf/org0401\\_0023.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634175/pdf/org0401_0023.pdf)
- Saber, S. E. M. (2009). Tissue engineering in endodontics. *Journal of Oral Science*, 51 (4), 495–507. Disponível em [https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnusd/51/4/51\\_4\\_495/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/josnusd/51/4/51_4_495/_pdf)
- Schmalz, G. e Smith, A. J. (2014). Pulp development, repair, and regeneration: challenges of the transition from traditional dentistry to biologically based therapies. *Journal of Endodontics*, 40 (4 Suppl), 2–5. doi:10.1016/j.joen.2014.01.018
- Sharma, S., Srivastava, D., Grover, S. e Sharma, V. (2014). Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research : JCDR*, 8 (1), 309–15. doi:10.7860/JCDR/2014/7609.3937
- Sloan, A. J. e Smith, A. J. (2007). Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases*, 13 (2), 151-157. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01346.x
- Smith, A. J., Lumley, P. J., Tomson, P. L. e Cooper, P. R. (2008). Dental regeneration and materials — a partnership. *Clinical Oral Investigations*, 12 (2), 103–108. doi: 10.1007/s00784-008-0189-5
- Soares, A. P., Knop, L. A. H., Jesus, A. A. e Araújo, T. M. (2007). Células-tronco em Odontologia. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, 12 (1), 33–40. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/dpress/v12n1/a06v12n1>

- Sun, H.-H., Jin, T., Yu, Q. e Chen, F.-M. (2011). Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5 (4), e1–16. doi:10.1002/term.369
- Tarun, G., Ajay, B., Bhawna K., Sunil K. e Ravi, J. (2011). Scaffold: Tissue engineering and regenerative medicine. *International Research journal of Pharmacy*, 2 (12), 37-42. Disponível em [http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/719\\_pdf.pdf](http://www.irjponline.com/admin/php/uploads/719_pdf.pdf)
- Tatullo, M., Marrelli, M., Shakesheff, K. M. e White, L. J. (2014). Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term.1899
- Telles, P. D., Machado, M. A., Sakai, V. T. e Nör, J. E. (2011). Pulp Tissue from Primary Teeth: New Source of Stem Cells. *Journal of Applied Oral Science*, 19 (3), 189-194. Disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-77572011000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572011000300002&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
- Trope, M. (2008). Regenerative potential of dental pulp. *Pediatric Dentistry*, 30 (3), 206-210. doi:10.1016/j.joen.2008.04.001
- Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P. e Stiesch, M. (2010). Stem cells--prospects in dentistry. *Schweizer Monatsschrift Fur Zahnmedizin*, 120 (10), 860–883. doi:smfz-2010-10-31 [pii]
- Volponi, A. A., Pang, Y. e Sharpe, P. T. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*, 20 (12), 715-722. doi:10.1016/j.tcb.2010.09.012
- Yildirim, S., Fu, S. Y., Kim, K., Zhou, H., Lee, C. H., Li, A., ...Mao, J. J. (2011). Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *International Journal of Oral Science*, 3 (3), 107-116. doi: 10.4248/IJOS11042
- Yu, V., Damek-Poprawa, M., Nicoll, S. B. e Akintoye, S. O. (2009). Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem

cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386 (4), 661–665.  
doi:10.1016/j.bbrc.2009.06.106

Zhang, W., Walboomers, X. F., van Kuppevelt, T. H., Daamen, W. F., Bian, Z. e Jansen, J. a. (2006). The performance of human dental pulp stem cells on different three-dimensional scaffold materials. *Biomaterials*, 27 (33), 5658–68.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2006.07.013

Zhang, W. e Yelick, P. C. (2010). Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *International Journal of Dentistry*.  
doi:10.1155/2010/856087