



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS: UMA PERSPETIVA FUTURA NA
ENDODONTIA REGENERADORA**

Trabalho submetido por
Ana Teresa Da Silva Dias Lopes Fortuna
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**CÉLULAS ESTAMINAIS: UMA PERSPETIVA FUTURA NA
ENDODONTIA REGENERADORA**

Trabalho submetido por
Ana Teresa Da Silva Dias Lopes Fortuna
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Isabel Maria Correa Calvente de Barahona

setembro de 2017

Agradecimentos

Este trabalho simboliza o fim de um capítulo de 5 anos que me deixará eterna saudade e por isso desde já um eterno obrigado a esta casa que é a Egas Moniz.

À minha orientadora professora Isabel Barahona pela paciência e tempo despendido comigo na orientação deste trabalho.

Aos meus pais e volita por me terem permitido a realização deste curso superior e pelo apoio e motivação que me deram desde sempre.

Às minhas amigas de sempre por terem participado intensamente comigo durante todo o percurso e por me terem aturado nos bons e maus momentos.

À Teresa Pinto Leal, minha parceira de box, por todo o apoio e horas que passámos juntas.

À Mariana Avelar pelas noites sem dormir para chegarmos até aqui, juntas.

À Carla Lorigo por ter estado sempre presente.

Ao João Botelho pela ajuda que me deu como amigo e mentor.

Ao Filipe pelo apoio nos bons e maus momentos.

A todos aqueles que contribuíram neste percurso,

Obrigada.

Resumo

A endodontia regenerativa com células estaminais implica a regeneração de um tecido necrosado, que é a polpa dentária, sendo que este novo tecido deverá ser igual, o mais possível, ao tecido original.

Até à data a opção de tratamento para um dente cuja polpa está necrosada é a endodontia convencional que inclui a remoção total da polpa, preparação do canal e obturação, e se este tratamento não for passível de ser implementado a hipótese é a exodontia. Surge assim a necessidade de uma alternativa conservadora que permita manter o dente funcional em boca restabelecendo as suas características originais.

A endodontia regenerativa procura, através de protocolos bem estruturados, tornar possível no dia a dia clínico a regeneração da polpa dentária. Existem vários caminhos para o mesmo fim, no entanto, chegou-se à conclusão que a tríade de células estaminais, *scaffold* e fatores de crescimento, é ideal e suficiente para o conseguir. Surgem, no entanto, algumas barreiras éticas e legais que impedem a investigação de avançar mais rápido.

Existe atualmente um estudo clínico piloto desenvolvido em 2013, e publicado no presente ano, que provou ser possível a aplicação clínica da endodontia regenerativa com células estaminais, em cinco doentes submetidos ao transplante quatro tiveram sucesso com um *follow up* de 24/32 semanas, conseguiu-se formar polpa vital idêntica à original. É com este tipo de estudos que estamos cada vez mais perto daquilo que será o futuro da endodontia.

Esta monografia pretende sumariar os métodos e requisitos necessários para a endodontia regenerativa com células estaminais bem como demonstrar os avanços feitos até agora, pesquisas atuais e perspectivas futuras.

Palavras-chave: células estaminais dentárias, regeneração pulpar, *scaffold*, fatores de crescimento.

Abstract

Regenerative endodontics with stem cells implies a full regeneration of a tissue, in this case the dental pulp, and this new formed tissue must be identical to the original.

Until now, the option of treating a tooth with necrotic pulp is the conventional endodontic treatment which includes preparation of the root canal and obturation and, if undoable, the last option is extraction. Due to this fact, the necessity to find a more conservative alternative arose, one which allowed the preservation of the tooth in the oral cavity functioning and with its original characteristics.

Through well-structured protocols regenerative endodontics intends for the regeneration of the dental pulp to become possible, in a clinical environment. There are a lot of different pathways to achieve this final propose, but after some research the conclusion is that stem cells, *scaffolds* and growth factors are enough to form pulp tissue. Nevertheless, there are some ethical and legal barriers that delay the research in this field.

There was a pilot clinical case, ran in 2014 and published this year, which showed that it is possible to grow functional pulp in 4 of 5 patients enrolled in the study, with a follow up of 24/32 weeks. This brings us one step closer to what will be the future of endodontics.

This review intends to summarize the methods and requirements for the practice of regenerative endodontics with stem cells as well as to demonstrate the progress made so far, current research and future perspectives.

Key words: dental stem cells, dental pulp regeneration, *scaffold*, growth factors.

Índice

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. DESENVOLVIMENTO..... | 19 |
| 2.1. Endodontia Regenerativa..... | 19 |
| 2.1.1. O que é?..... | 19 |
| 2.1.2. História..... | 24 |
| 2.1.3. Hipóteses terapêuticas..... | 27 |
| 2.2. Células Estaminais (adultas e embrionárias)..... | 29 |
| 2.2.1. Células estaminais mesenquimais..... | 31 |
| 2.2.2. Células estaminais dentárias..... | 33 |
| 2.2.2.1. DPSC..... | 35 |
| 2.2.2.2. SHED..... | 39 |
| 2.2.2.3. PDLSC..... | 43 |
| 2.2.2.4. DFSC..... | 45 |
| 2.2.2.5. SCAP..... | 46 |
| 2.2.2.6. TGPC..... | 48 |
| 2.2.2.7. GMSC..... | 51 |
| 2.2.3. Células estaminais não dentárias..... | 51 |
| 2.3. Scaffold..... | 53 |
| 2.4. Fatores de crescimento..... | 56 |
| 2.4.1. Proteína Morfogénica Óssea (BMP)..... | 61 |
| 2.5. Obtenção de células estaminais..... | 65 |
| 2.5.1. Dador..... | 65 |
| 2.5.2. Recolha e transporte de tecidos dentários..... | 65 |
| 2.5.3. Isolamento de células estaminais dentárias..... | 67 |
| 2.5.4. Amplificação e diferenciação..... | 71 |
| 2.5.5. Sistemas de cultura..... | 71 |
| 2.5.6. Meio de amplificação..... | 73 |
| 2.5.7. Diferenciação de células estaminais dentárias..... | 75 |
| 2.5.8. Criopreservação de células estaminais dentárias..... | 75 |
| 2.5.9. Bioética, legislação e regulamentos de pesquisa com células estaminais..... | 76 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 2.6. Vantagens e Desvantagens..... | 79 |
| 2.7. Pesquisa atual..... | 80 |
| 2.8. Perspetivas futuras..... | 88 |
| 2.8.1. Principais dificuldades..... | 89 |
| 3. CONCLUSÃO..... | 91 |
| 4. BIBLIOGRAFIA..... | 93 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Representação esquemática da resposta do complexo pulpo-dentinário a estímulos moderados e severos..... | 21 |
| Figura 2 - Representação esquemática da (b) densidade e diâmetro tubular na dentina coronal superficial, (c) profunda e (a) dentina radicular..... | 22 |
| Figura 3 - Principais domínios necessários para o desenvolvimento de técnicas biológicas de endodontia regenerativa..... | 24 |
| Figura 4 - Representação esquemática das propriedades das células estaminais..... | 30 |
| Figura 5 - Exemplos das diferentes linhagens em que as células estaminais mesenquimais são teoricamente capazes de se diferenciar dando origem a diferentes fenótipos..... | 32 |
| Figura 6 - Representação esquemática da mandíbula que mostra a localização de células estaminais dentárias..... | 35 |
| Figura 7 - Dois primeiros pré-molares superiores antes do isolamento da polpa dentária..... | 37 |
| Figura 8 - Diferentes técnicas para a extração da polpa dentária..... | 39 |
| Figura 9 - Dois dentes decíduos para extração da polpa dentária..... | 42 |
| Figura 10 - Terceiro molar superior, a seta mais a baixo indica a área da raiz coberta pelo ligamento periodontal e por isso a fonte de PDLSC, a seta de cima indica a JAC..... | 45 |
| Figura 11 - Terceiro molar inferior com tecido do folículo dentário na área marcada pela seta..... | 46 |
| Figura 12 - Três dentes para extração de células estaminais da papila apical..... | 48 |
| Figura 13 - Desenvolvimento dentário e mesenquima dentário..... | 50 |
| Figura 14 - Terceiro molar inferior na fase de campânula (pós germectomia)..... | 50 |
| Figura 15 - Implantação de uma <i>scaffold</i> composta num dente humano extraído..... | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 16 - Formação do complexo pulpo-dentinário utilizando uma técnica de endodontia regenerativa..... | 62 |
| Figura 17 - Via de sinalização das BMP..... | 64 |
| Figura 18 - Procedimento de extração cirúrgica de um terceiro molar inferior..... | 67 |
| Figura 19 - Cultura primária de células estaminais da polpa dentária 6 dias após o cultivo juntamente com o remanescente do tecido de origem..... | 69 |
| Figura 20 - A mesma linhagem de células estaminas da polpa antes e depois de se alterar o meio respetivamente..... | 69 |
| Figura 21 - Um pedaço de tecido dentário da polpa com células em crescimento à sua volta (12 dias após cultura)..... | 70 |
| Figura 22 - Diagrama esquemático representativo do modelo canino de regeneração completa da polpa dentária num dente permanente e desenvolvido..... | 81 |
| Figura 23 - Sequência passo-a-passo do estudo clínico, incluindo o tratamento de cáries e reconstrução de uma parede com resina composta seguido da pulpectomia, processamento celular e transplantação celular seguida de uma restauração final. | 84 |
| Figura 24 - Análises radiográficas..... | 86 |

Índice de tabelas

Tabela 1 – Hipóteses terapêuticas em desenvolvimento na endodontia regenerativa.....27

Tabela 2 – Ordem cronológica da descoberta das células estaminais de origem dentária.....35

Tabela 3 – Fonte, atividade e utilidade de alguns fatores de crescimento mais comuns.....59

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens da endodontia regenerativa com células estaminais...79

Lista de abreviaturas

AAE – Associação Americana de Endodontia

bFGF - Fator de crescimento fibroblástico básico

BMSC - Células estaminais da medula óssea

CBCT - Tomografia computadorizada de feixe cônico

CO₂ - Dióxido de carbono

CPP - Polifosfato de cálcio

DFSC - Células estaminais precursoras do folículo dentário

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM – Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DSPP - Sialofosfoproteína da dentina

ECM - Matriz extracelular

ED - Digestão enzimática

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

EpSC - Células estaminais epiteliais

FDA - Administração de alimentos e fármacos

G-CSF - Fator estimulador de colónias de granulócitos

GMSC - Células estaminais localizadas na gengiva humana

GMP - Boas Práticas de Fabricação

GP - Gutta-percha

GPL - Boas práticas laboratoriais

HA TCP - Fosfato tricálcico de hidroxiapatite

HA – Hidroxiapatite

HBSS - Solução salina de Hank

HERS - Bainha radicular de Hertwig

HP - Plasma humano

ICSCN - Consórcio internacional de redes das células estaminais

ISCT – Sociedade internacional terapia celular Internacional

ISSCR - Sociedade internacional de pesquisa com células estaminais

JAC - Junção amelocimentária

JAD - Junção amelodentinária

LIF - Fator inibidor da leucina

MRI - Ressonância magnética

MSC - Células estaminais mesenquimais

MTA - Agregados minerais de trióxidos

NaOCl - Hipoclorito de sódio

OG - Crescimento espontâneo

PBS - Tampão fosfato

PDLSC - Células estaminais do ligamento periodontal

PEG - Polietilenoglicol

PGA - Ácido poliglicólico

PLA - Ácido polilactico

PLGA - Ácido poli láctico-co-glicólico

PRP - Plasma rico em plaquetas

PRF - Plasma rico em fibrina

RGD - Ácido aspártico

RS/TKs - Proteína recetora serina/treonina cinase

SCAP - Células estaminais da papila apical

SCRO - Comité de supervisão das células estaminais

SDF-1 – Fator derivado de células do estroma 1

SHED - Células estaminais de dentes decíduos esfoliados

STRO-1 - Antígeno de superfície celular resistente a tripsina

TCP - Fosfato tricálcio

TGPC - Células progenitoras do gérmen dentário

TGF β - Fator de transformação do crescimento beta

USFDA - Administração de alimentos e fármacos dos Estados Unidos da América

α -MEM – Meio essencial mínimo de Eagle alfa

1. INTRODUÇÃO

As lesões de cárie, a pulpíte, a periodontite apical são situações que provocam uma diminuição de saúde oral e aumentam o custo do tratamento dentário, levando a uma perda prematura de peças dentárias e por conseguinte a uma diminuição da qualidade de vida (Nakashima & Akamine, 2005).

Graças aos avanços na terapia regenerativa de vitalidade pulpar com células estaminais a regeneração do complexo pulpo-dentinário poderá tornar-se uma alternativa à remoção total da polpa (Nakashima & Akamine, 2005).

Nos últimos anos as estratégias de tratamento da polpa dentária afetada têm-se focado em tratamentos mais invasivos que têm um sucesso limitado, o que levou o departamento de endodontia a interessar-se pelos campos da biologia das células estaminais, genética e engenharia tecidual. A endodontia regenerativa baseia-se na possibilidade de usar células estaminais para criar polpa nova e assim tratar dentes com polpa necrosada (Cavalcanti et al., 2012).

A lesão de cárie é uma doença multifatorial que afeta o esmalte, a dentina, a polpa e o cimento. Esta doença implica uma desmineralização com reação inflamatória associada no tecido pulpar. Durante décadas o tratamento baseou-se na remoção dos tecidos inflamados seguida de uma restauração e/ou endodontia (Sharma, Sharma, & Dias, 2015).

Contudo, muitos dentes não são restauráveis devido a reabsorção apical e fratura, raízes que não estão completamente formadas, ou grande destruição da estrutura coronal e nestes casos o tratamento passa pela exodontia (Nakashima & Akamine, 2005).

O tratamento de proteção pulpar, direta ou indireta, diz respeito ao tratamento realizado após uma lesão cujos sintomas indiquem uma lesão reversível. A proteção pulpar visa a reparação da polpa que ainda está viva, e por fim a restauração com um material biocompatível (Schmalz & Goldberg, 2011).

Os tratamentos de proteção pulpar atuais induzem a formação de dentina através de cimentos como o hidróxido de cálcio ou agregados minerais de trióxidos (MTA), no entanto não

conseguem substituir a função biológica, vitalidade e propriedades mecânicas do tecido original (Sharma et al., 2015).

Após uma exposição pulpar moderada, a proteção pulpar direta com hidróxido de cálcio ou MTA promove o recrutamento e diferenciação de células progenitoras da polpa, que são induzidas a produzir uma ponte dentinária de reparação. Se não se tratar de um processo de inflamação agudo e a polpa dispuser de uma quantidade suficiente de sangue que promova a cicatrização, a polpa pode-se reparar espontaneamente devido à eficácia do agente utilizado (Schmalz & Goldberg, 2011).

A pergunta que queremos responder é se “haverá alguma alternativa terapêutica que ajude na regeneração dos tecidos polpa/dentina perdidos?” (Sharma et al., 2015).

A remoção completa da polpa (pulpectomia) apresenta uma taxa de sucesso clínico bastante elevada, no entanto há vários aspetos a ter em conta, nomeadamente, nos dentes endodonciados a estética é afetada pois dá-se uma descoloração da coroa devido aos materiais de preenchimento endodôntico, a integridade do dente em si também fica comprometida devido à perda de estrutura, os dentes perdem a sensibilidade às alterações ambientais e por isso torna-se difícil a percepção da existência de lesões de cárie pelo doente, o que está de acordo com estudos que indicam que a perda de dentes é maior em dentes endodonciados do que em não endodonciados devido a lesões de cárie secundárias e complexidade da restauração (Sharma et al., 2015).

Para além destas existem ainda algumas desvantagens após o tratamento de obturação, por exemplo dor pós-operatória, lesões apicais devido a micro infiltrações da coroa dentária e fratura vertical da raiz, o que leva também ao aumento da incidência de extração dentária (Nakashima et al., 2017).

Por estas razões, tornou-se importante o desenvolvimento de uma alternativa biológica de tratamento endodôntico: a regeneração de tecido pulpo-dentinário para revitalizar o dente (Sharma et al., 2015).

A engenharia de tecidos é uma ciência interdisciplinar que conjuga os princípios de engenharia e de ciências biomédicas com o objetivo de formar estruturas que possam

restaurar, manter ou melhorar a função tecidual (Langer & Vacanti, 1993).

A engenharia tecidual e a biotecnologia evoluíram e abriram novas portas para conseguir novas técnicas de tratamento pulpar por métodos biológicos que incluem a estimulação da capacidade regenerativa da própria polpa induzindo a migração das células da região apical para o interior do canal pulpar ou a substituição de todo o tecido pulpar por transplante de tecido pulpar obtido *in vitro* (Sharma et al., 2015).

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. Endodontia Regenerativa

2.1.1. O que é

Conceito de endodontia regenerativa: A endodontia regenerativa consiste numa forma ideal de terapia endodôntica onde se remove a totalidade da polpa dentária necrótica para ser substituída por tecidos pulparez saudáveis permitindo uma revitalização do dente (Saber, 2009).

Quando falamos de endodontia regenerativa devemos começar por perceber o que é o complexo pulpo-dentinário que tem uma estrutura funcional dinâmica no dente e tem um papel primordial na defesa imunitária e homeostase. Numa perspectiva regenerativa é um dos tecidos mais difíceis de mimetizar devido à sua natureza fisiológica única (Kim, 2017).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo laxo diferente de outros tecidos conjuntivos pela presença de odontoblastos que se relacionam com a dentina. Um dos objetivos da endodontia regenerativa é tentar restaurar a polpa e a dentina de forma a funcionarem como uma unidade fisiológica a que chamamos complexo pulpo-dentinário (Kim, 2017).

O tecido conjuntivo pulpar consiste numa matriz extracelular (ECM) composta por um grupo de substâncias com um nível relativamente alto de glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras moléculas de adesão (fibronectina, laminina) e numa quantidade mais escassa fibras de colagénio tipo III que formam uma rede apenas à volta dos vasos e nervos. A zona celular mais periférica da polpa dentária é a camada de odontoblastos, seguida de uma camada interior cell-free-zone chamada camada basal de Weil, a seguir há uma zona rica em células e por fim o núcleo pulpar (Suchánek, Browne, Kleplová, & Mazurová, 2016).

As últimas duas zonas mencionadas anteriormente têm uma estrutura muito parecida, são compostas por vasos largos, nervos e muitas células, mais especificamente: fibroblastos, células do sistema imunitário, e células mesenquimais indiferenciadas (Suchánek et al., 2016).

O termo “complexo pulpo-dentinário” refere-se anatomicamente à polpa dentária “enclausurada” pela dentina que se encontra na periferia. A função primária da polpa é

produzir dentina e tem funções secundárias de nutrição, defesa e sensoriais (Sharma et al., 2015).

A dentina por sua vez é um tecido poroso formado por cristais de hidroxiapatite numa matriz de colagénio. Esta matriz mineralizada é formada inicialmente pelos odontoblastos, que secretam colagénio a partir da junção amelodentinária (JAD), estes depois crescem arrastando consigo os processos odontoblásticos que são prolongamentos da própria célula (Pashley, 1996).

Os odontoblastos são células longas e colunares localizadas na periferia da polpa dentária e como referido anteriormente são eles que dão origem à dentina num processo chamado dentinogénese. Os processos odontoblásticos são prolongamentos celulares que surgem do corpo da célula e penetram na dentina mineralizada (Arana-Chavez & Massa, 2004) e estão alinhados com a mesma (Smith et al., 2003).

Na dentinogénese o odontoblasto sintetiza e secreta os constituintes da matriz extracelular, que formam a dentina e que por fim vão ser mineralizados (Smith et al., 2003).

Após a dentinogénese os odontoblastos vão depositando novas camadas de dentina ao longo da vida e podem formar um tipo de dentina reacionária/reparadora como resposta a qualquer fator externo que possa danificar o dente (descrito mais à frente) (Arana-Chavez & Massa, 2004).

Durante a formação do gérmen dentário a formação do tecido dentário durante o período da morfogénese é promovida pelas interações entre células epiteliais e células mesenquimais da papila dentária que estimulam populações de células mesenquimais para se diferenciarem em odontoblastos que darão origem à dentina primária (Smith et al., 2003).

O odontoblasto é uma célula pós-mitótica o que significa que não se consegue dividir e, por isso, não apresenta capacidade de proliferação nem regeneração. Para manter o tecido da polpa após a morte dos odontoblastos é necessário o recrutamento de células estaminais/progenitoras que posteriormente se diferenciam em odontoblastos (Simon & Smith, 2014).

Para percebermos o comportamento do complexo pulpo-dentinário a um estímulo que provoca uma lesão, seja ela traumática ou por lesão de cárie devemos primeiro perceber a dimensão da lesão já que isso irá influenciar os eventos celulares que se seguem (Simon & Smith, 2014).



Figura 1 – Representação esquemática da resposta do complexo pulpo-dentinário a estímulos moderados e severos. A branco estão os odontoblastos que sobreviveram ao estímulo e secretam dentina reacionária e a preto os odontoblastos da nova geração após o estímulo severo que secretam dentina reparadora. Adaptado de: (Smith et al., 2003)

Sabemos que quando a lesão está numa fase inicial, a polpa responde com um aumento da atividade secretora dos odontoblastos provocando uma deposição de dentina reacionária que é uma variante da dentina terciária (Fig.1). Podemos considerar esta resposta celular como defesa ou como regeneração, de defesa porque ao aumentar a espessura da dentina aumenta a barreira contra as bactérias cariogênicas e de regeneração pois restaura a integridade estrutural do tecido. Esta dentina reacionária tem origem em odontoblastos já existentes e possui uma estrutura tubular idêntica à da dentina primária que é contínua com a matriz da dentina primária e que se comporta de forma muito parecida (Simon & Smith, 2014).

A dentinogênese reacionária é um processo mais rápido e menos complexo do que a dentinogênese reparadora, que é referida mais à frente, no entanto é bastante difícil distingui-las clinicamente (Femiano, Femiano, Festa, Rullo, & Perillo, 2014).

A dentina primária é constituída por túbulos dentinários com a forma de cones invertidos, estes não têm todos a mesma dimensão sendo que os de menor dimensão se encontram na JAD e os maiores na zona mais coronal da dentina (Fig.2) (Pashley, 1996).

Os túbulos dentinários vão desde a JAD até à câmara pulpar e formam o trajeto dos odontoblastos. Com o aumento de profundidade, isto é, na direção da câmara pulpar aumenta também a densidade tubular (Fig.2). Dentro de cada túbulo podemos encontrar uma zona pobre em colagénio rodeada por um cilindro hipermineralizado composto maioritariamente por apatite a que chamamos dentina peritubular (Kinney, Balooch, Marshall, & Marshall, 1999).

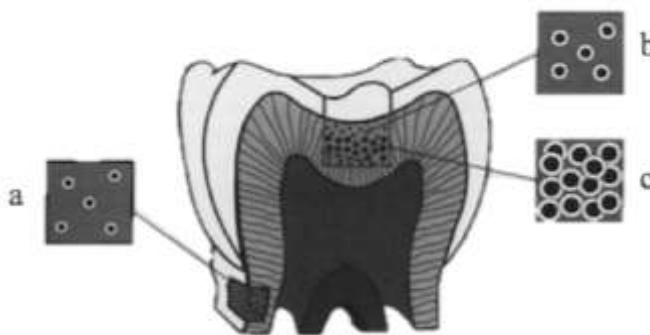


Figura 2 - Representação esquemática da (b) densidade e diâmetro tubular na dentina coronal superficial, (c) profunda e (a) dentina radicular. Adaptado de: (Pashley, 1996)

Quando a lesão apresenta uma maior extensão se a inflamação não estiver descontrolada e a polpa não estiver altamente infetada uma resposta de cicatrização normal será iniciada onde a polpa se vai tentar renovar utilizando e diferenciando células estaminais em odontoblastos. Quando isto acontece, a nova geração de odontoblastos secreta uma dentina reparadora no local da lesão (Fig.1) (Simon & Smith, 2014).

Esta dentina reparadora apresenta uma estrutura bastante heterogénea que pode variar entre uma estrutura tubular normal, uma estrutura desorganizada e pobre em túbulos e uma estrutura sem túbulos. Estas alterações na estrutura da polpa indicam a natureza patológica da dentinogénese reparadora, em que faltam mecanismos de controlo da organização

tecidual ao contrário do processo fisiológico de dentinogênese (Simon & Smith, 2014).

A dentinogênese reparadora é um processo claramente mais complexo do que a dentinogênese reacionária e caracteriza-se pelo recrutamento de células estaminais até ao local da lesão, a sua proliferação, e diferenciação em odontoblastos de nova geração que tem uma atividade secretora aumentada (Simon & Smith, 2014).

Para perceber melhor a diferença entre elas em 2003 Smith et al. propuseram as seguintes definições: a dentina reacionária é formada por uma matriz de dentina terciária secretada por odontoblastos que sobreviveram ao estímulo enquanto a dentina reparadora é formada por uma matriz de dentina terciária mas desta vez secretada por uma nova geração de odontoblastos depois da morte dos odontoblastos originais responsáveis pela secreção da dentina primária (Smith et al., 2003).

Quando a lesão apresenta uma maior extensão, e a inflamação estiver descontrolada, as moléculas inflamatórias e imunitárias irão impedir o processo de cicatrização e eventualmente induzir a morte celular (Sharma et al., 2015).

Conseguir a regeneração do tecido pulpar depois da pulpectomia onde há a remoção total da polpa tem sido uma tarefa muito complicada, sendo uns dos problemas principais a revascularização, dado que o tecido pulpar está encapsulado na dentina sem haver uma vascularização lateral apenas a do ápex, dificultando a indução de diferenciação das células estaminais que darão origem aos odontoblastos e o seu arranjo espacial dos odontoblastos (Sharma et al., 2015).

Enquanto a revascularização através de um coágulo sanguíneo é uma técnica proposta para dentes imaturos uma vez que têm o ápex aberto o que irá permitir uma melhor irrigação, para os dentes maduros a engenharia tecidual com células estaminais apresenta um grande potencial para a regeneração pulpar (Sharma et al., 2015).

Uma solução biológica que permita a substituição dos tecidos pulpares é um dos grandes objetivos de investigação atuais, que tal como no passado, tem sido um tema de grande interesse. O conceito de engenharia tecidual inclui a tríade células estaminais, fatores de crescimento e *scaffold* e é com estes três fatores que se pensa conseguir a formação de novo

tecido pulpar (Fig.3) (Sharma et al., 2015).

Atualmente alguns investigadores utilizam a tríade conhecida como base e atualizam-na, como é o caso de Nakashima et al.: Células estaminais mesenquimais, Fatores de crescimento/diferenciação ou citoquinas e microambiente (*scaffold*, matriz extracelular) (Nakashima et al., 2017)

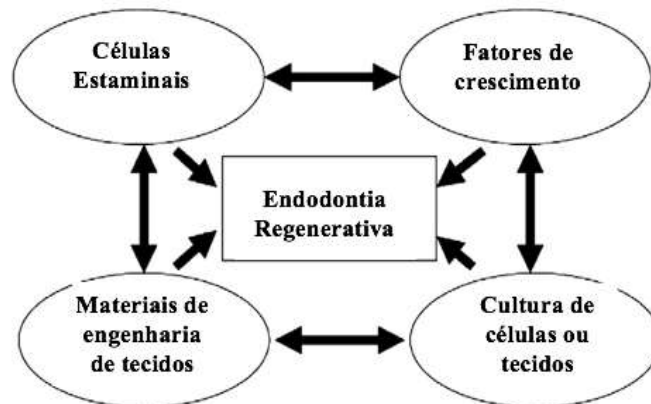


Figura 3 - Principais domínios necessários para o desenvolvimento de técnicas biológicas de endodontia regenerativa. Adaptado de: (Murray, Garcia-Godoy, & Hargreaves, 2007)

2.1.2. História

A regeneração da polpa não é um assunto recente, já em 1963 Ostby conseguiu o crescimento de tecido pulpar no interior de uma câmara pulpar vazia através da introdução de um coágulo sanguíneo (Sharma et al., 2015).

Em 1961, Ostby questionou-se sobre a função do coágulo sanguíneo. Segundo o trabalho de vários autores, na cicatrização de fraturas ósseas, o coágulo sanguíneo é considerado um fator muito importante, assim sendo, no tratamento endodôntico o sangramento não deve ser considerado um fator a temer, embora não se soubesse explicar a importância do coágulo.

Uns anos mais cedo em 1958, Ostby defendia que enquanto houvesse a mais pequena gota de sangue o tratamento endodôntico não deveria ser feito, mas em 1957 no seguimento dos resultados de um estudo experimental sobre o efeito do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) no interior do canal radicular concluíram que esta premissa deveria ser revista (Ostby, 1961).

Ostby decidiu então analisar a formação do tecido periodontal no interior do canal após remoção total da polpa, na presença de um coágulo sanguíneo. O estudo decorreu em animais e em seres humanos. Foram utilizados 3 cães de idades entre os 8 e os 11 meses aos quais foram extraídos 8 dentes, os ápices cortados e foram imediatamente reimplantados. Seguidamente à abertura da câmara pulpar, a polpa foi removida e, na zona cervical do canal foi colocado um tampão feito de gutta-percha com uma camada de chloropercha por cima. Nos humanos foram utilizadas 9 pessoas de idades entre os 21 e os 42 anos e foram utilizados 17 dentes cujos diagnósticos variavam entre polpa intacta, pulpíte crónica, necrose parcial da polpa e polpa necrosada com radiotransparência periapical. No caso dos dentes que estavam vitais o tratamento foi realizado numa só sessão, a câmara pulpar foi inicialmente lavada com peróxido de hidrogénio a 30%, seguida da lavagem com uma solução de cloreto de benzalcónio a 1% em álcool a 70%. Depois de seca fez-se a extirpação da polpa com limas Hedstrom e por fim o canal foi preenchido com EDTAC que ia sendo renovado a cada 5 minutos. Para assegurar um bom sangramento as limas iam para além do ápex. Uma ponta de gutta-percha coberta por uma pasta de chloropercha foi inserida no canal garantindo que a zona apical do canal ficaria desimpedida. Em três casos foi feita uma extirpação parcial da polpa deixando a parte apical intacta (Ostby, 1961).

Já no caso dos dentes com polpa necrosada o procedimento foi o mesmo, mas realizado em duas sessões. À exceção de um caso só depois dos resultados dos testes bacteriológicos e de se ter a certeza de estarem completamente esterilizados é que se avançou com o procedimento. No fim de cada tempo de observação os dentes eram cirurgicamente removidos (Ostby, 1961).



Os resultados foram variados, no caso dos dentes de animais todos os dentes continham tecido vivo, no entanto, a extensão do tecido bem como a estrutura do mesmo variou de caso para caso. Quanto à extensão variou de 300 micrómetros a 5 milímetros e quanto à estrutura

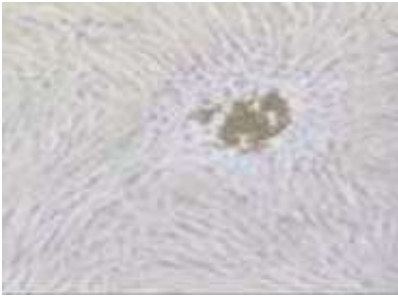
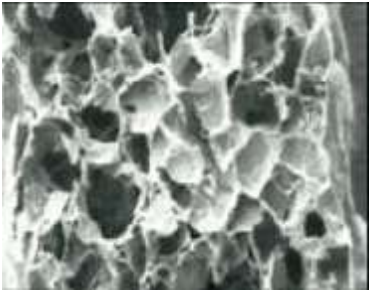
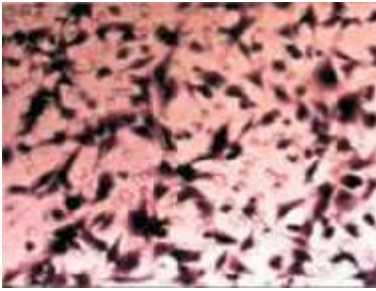
um caso mostrou tecido de granulação enquanto nos outros surgiu tecido fibroso. Havia grandes diferenças na estrutura do tecido que aparecia em áreas distintas da raiz. O estudo feito ao conteúdo dos canais radiculares mostrou que o coágulo sanguíneo era gradualmente substituído por tecido de granulação que posteriormente era transformado em tecido conjuntivo fibroso, este processo decorria a partir do forâmen e ia percorrendo o canal. Numa observação após 35 dias foi encontrado num canal na zona do forâmen um aglomerado de fibras de colagénio embora existisse ainda tecido de granulação à volta de um aglomerado e fibrina. Noutra observação havia um canal com tecido conjuntivo com uma série de fibras paralelas às paredes do canal, possuía uma vascularização normal e linfócitos e macrófagos em quantidades adequadas, e junto a esta área foi encontrado tecido de granulação com um vasto conjunto de vasos sanguíneos dilatados. Foram também encontrados fibroblastos, fibras de colagénio delicadas e escassas e ainda junto das paredes dos capilares foram observadas células com aspeto indiferenciado. Os canais acessórios apresentavam tecido fibroso mesmo em raízes que continham inicialmente polpa necrosada. Apesar de ser complicada a sua observação foi possível em 2 casos detetar tecido vital com infiltrado celular e acompanhado de aglomerados de fibras quando o período de observação foi maior (Ostby, 1961).



Dadas as limitações desta experiência não foi possível tirar conclusões clínicas definitivas, mas os resultados permitiram uma nova base lógica para a endodontia. No entanto ficou-se a saber que um coágulo sanguíneo está preparado e estruturado para que em determinadas condições permita o aparecimento de um tecido fibroso normal, e saber isto foi fundamental para mudar a visão na terapêutica da prática endodôntica. (Ostby, 1961)

2.1.3. Hipóteses terapêuticas

Tabela 1 - Hipóteses terapêuticas em desenvolvimento na endodontia regenerativa. Adaptado de: (Murray et al., 2007)

| Técnica | Imagem | Vantagens | Desvantagens |
|--|---|---|---|
| <p>Revascularização do canal radicular</p> <p>(abertura do ápice do dente até 1mm para permitir sangramento no interior dos canais radiculares)</p> |  | <ul style="list-style-type: none"> -Menor risco de rejeição imunitária -Menor risco de transmissão patogénica | <ul style="list-style-type: none"> -Poucos relatos de casos publicados até à data -Potencial risco de necrose se o tecido for reinfetado |
| <p>Terapia com células estaminais</p> <p>(células estaminais autólogas ou alogénicas são colocadas no dente via matriz injetável)</p> |  | <ul style="list-style-type: none"> -Rápido -Fácil colocação -Menos doloroso -Os tecidos dentários que contém estas células são fáceis de colher | <ul style="list-style-type: none"> -Baixa sobrevivência celular -As células não produzem nova polpa funcional -Elevado risco de complicações |

| | | | |
|---|---|--|--|
| <p>Implantação pulpar</p> <p>(tecido pulpar cultivado em laboratório em folhas e implantado cirurgicamente)</p> |  | <p>-As folhas com células são fáceis de cultivar</p> <p>-Mais estável do que uma injeção com células dissociadas</p> | <p>-As folhas não possuem vascularização por isso apenas pequenas construções são possíveis</p> <p>-Deve ser bem planejado para encaixar com precisão no canal</p> |
| <p>Implante de scaffold:</p> <p>(células pulpares são colocadas numa scaffold 3D feita de polímeros e cirurgicamente implantadas)</p> |  | <p>-A estrutura suporta a organização celular</p> <p>-Alguns materiais podem promover a vascularização</p> | <p>-Baixa sobrevivência celular após implantação</p> <p>- Deve ser bem planejado para encaixar com precisão no canal</p> |
| <p>Impressão celular 3D</p> <p>(dispositivo tipo jato de tinta dispensa camadas de células num hidrogel e é cirurgicamente implantado)</p> |  | <p>-Múltiplos tipos de células podem ser posicionados estrategicamente</p> | <p>- Deve ser bem planejado para encaixar com precisão no canal</p> <p>-A pesquisa inicial ainda não provou a sua funcionalidade <i>in vivo</i></p> |

| | | | |
|---|--|--|--|
| <p>Scaffolds injetáveis</p> <p>(hidrogéis polimerizáveis, unicamente ou contendo suspensões celulares e são colocados por injeção)</p> |  | <p>-Fácil colocação</p> <p>-Pode promover a regeneração ao substituir a matriz extracelular</p> | <p>-Controlo limitado sobre formação tecidual</p> <p>-Baixa sobrevivência celular</p> <p>-A pesquisa inicial ainda não provou funcionalidade <i>in vivo</i></p> |
| <p>Terapia genética (genes mineralizadores são transferidos para células pulpares vitais de dentes necróticos e sintomáticos)</p> |  | <p>-Pode evitar a limpeza e instrumentação dos canais radiculares</p> <p>-Pode evitar a necessidade de implantação de células estaminais</p> | <p>-A maioria das células num dente necrótico encontra-se morta</p> <p>-Difícil de controlar</p> <p>-Risco de problemas de saúde</p> <p>-Não aprovado pela FDA (Administração de alimentos e fármacos)</p> |

2.2. Células estaminais (Adultas e Embrionárias)

As células estaminais são células não especializadas que se distinguem pelas suas capacidades de proliferação e diferenciação em inúmeras outras células, variando quer no sítio onde se encontram quer nos tipos de células que podem formar (Fig.4) (Egusa, Sonoyama, Nishimura, Atsuta, & Akiyama, 2012).

Existem duas fontes principais de células estaminais as células estaminais adultas e as células estaminais embrionárias, estas últimas são classificadas como células pluripotentes já que se conseguem diferenciar em todo o tipo de células das três camadas germinativas. Por outro lado, as células estaminais adultas são multipotentes o que significa que apenas se conseguem diferenciar num número limitado de tipos celulares da mesma camada da gástrula (Egusa et al., 2012).

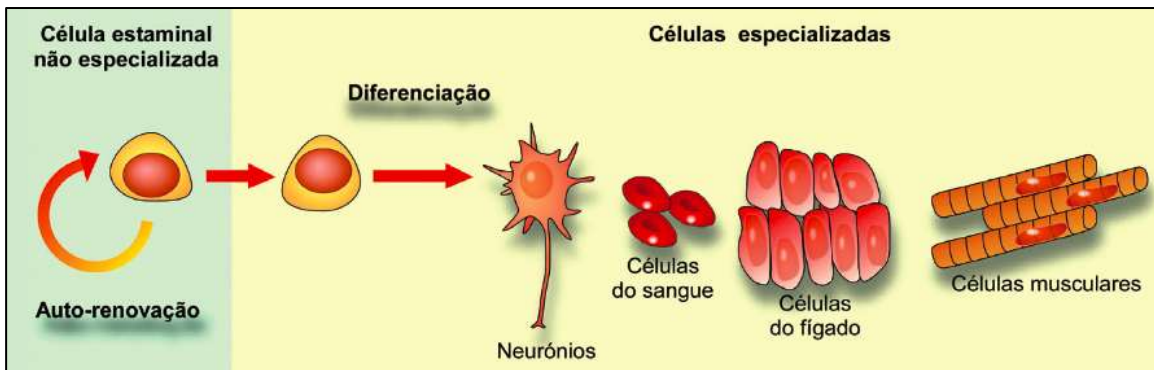


Figura 4 - Representação esquemática das propriedades das células estaminais. São células não especializadas que são capazes de se auto-renovar e dar origem a novas células não especializadas (fundo verde), mas também se podem diferenciar em vários tipos de células especializadas (fundo amarelo). Adaptado de: (Bragança, Tavares, & Belo, 2010)

As células estaminais são fundamentais na engenharia de tecidos pulpares. A alternativa às células estaminais seria o transplante de tipos celulares variados constituintes da polpa e a sua organização espacial de forma correta copiando a arquitetura original. Como é de esperar esta alternativa é muito difícil de conseguir e o uso de células estaminais é a escolha mais simples e lógica (Sharma et al., 2015).

As células estaminais embrionárias como já foi referido são células pluripotentes que no embrião têm o importante papel de se dividirem inúmeras vezes e dar origem a tecidos tais como osso, cartilagem, tendão, ligamentos, tecido conjuntivo e outros (Caplan, 1991).

As células estaminais embrionárias (pluripotentes) são as que apresentam o melhor potencial

de reparação e regeneração de tecidos, no entanto podem acarretar problemas de segurança e éticos. Sendo assim as células estaminais adultas como é o caso das células estaminais mesenquimais (MSC), tornam-se mais praticáveis porque não levantam problemas de segurança e éticos além de que se podem encontrar em quase todos os tecidos do organismo como por exemplo no tecido adiposo, na medula óssea, na pele, nalguns tecidos dentários e ainda no cordão umbilical. Estas células apresentam uma excelente opção para a engenharia de tecidos uma vez que têm a vantagem de se auto-renovarem com facilidade e de se conseguirem diferenciar noutras células quando colocadas em microambientes estranhos (Sharma et al., 2015).

Estas células estaminais adultas e as suas sucessoras dividem-se e diferenciam-se conforme os fatores de crescimento que existem no microambiente em que se encontram, os chamados nichos das células estaminais. O que se tenta recriar na terapia regenerativa é precisamente estes microambientes (Marí-Beffa, Segura-Egea, & Díaz-Cuenca, 2017).

2.2.1. Células estaminais mesenquimais (MSC)

As células estaminais adultas também conhecidas como células estaminais somáticas ou pós-natais estão presentes em vários tecidos e têm o importante papel de se auto-renovarem e diferenciarem para cuidar de lesões e manter os tecidos saudáveis. Este tipo de células é bastante promissor para aplicações clínicas (Egusa et al., 2012). São caracterizadas como multipotentes (Saber, 2009).

Estas células dão origem a tipos celulares intermédios antes de atingirem um estado completamente diferenciado, esse tipo celular intermédio é designado célula precursora ou progenitora. Pensa-se que este tipo de célula progenitora se diferencia numa via celular mais limitada (Saber, 2009).

As células estaminais adultas normalmente dão origem a tipos celulares do tipo do tecido onde se encontram, mas vários estudos ao longo dos anos provaram que as células têm plasticidade celular ou seja conseguem perfeitamente dar origem a tipos celulares de outra linhagem (Saber, 2009).

Muitas delas estão presentes em tecidos mesenquimatosos e por isso referimo-las como células estaminais mesenquimatosas ou mesenquimais (MSC). Estas encontram-se em inúmeros locais da cavidade oral e como referido mais à frente em locais designados nichos das células estaminais (Egusa et al., 2012).

Por definição têm a característica de se poderem dividir um número infinito de vezes sendo o seu destino definido por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos, no entanto quando entram num caminho específico de diferenciação comprometem a variedade e são encaminhadas para um tipo concreto de tecidos com funções características (Fig.5) (Caplan, 1991).

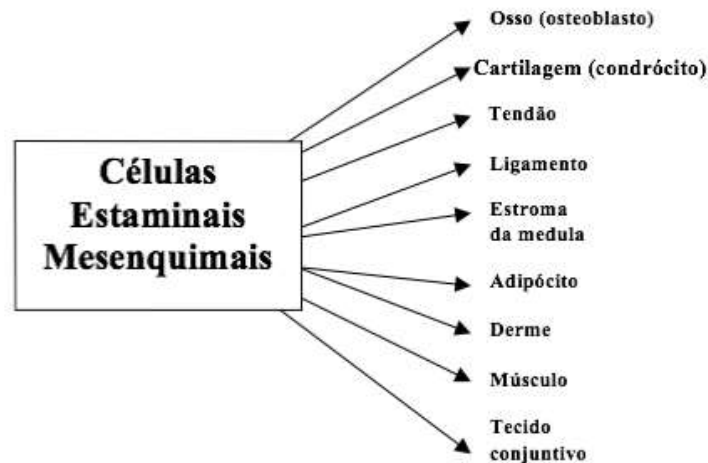


Figura 5 – Exemplos das diferentes linhagens em que as células estaminais mesenquimais são teoricamente capazes de se diferenciar dando origem a diferentes fenótipos. Adaptado de: (Caplan, 1991)

A sua evolução depende de sinais ou fatores emitidos por células vizinhas (regulação parácrina) e por elas próprias (regulação autócrina) (Caplan, 1991).

As MSC podem ser isoladas e manipuladas e caracteristicamente aderem a recipientes tratados para a cultura de células. Em 1999 as células da medula óssea da crista ilíaca foram classificadas como MSC e caracterizadas como multipotentes após a sua diferenciação em diferentes linhagens de acordo com a sua morfologia bem definida e pela presença de marcadores consistentes na sua superfície sob condições *in vitro* controladas, (Pittenger, 1999). Desde então inúmeros estudos têm confirmado a grande plasticidade destas células (Egusa et al., 2012).

No entanto as MSC ainda não foram caracterizadas especificamente, uma vez que na medula óssea existem também fibroblastos que as podem contaminar aquando da aspiração e eles podem juntamente com as MSC proliferar, o problema é que os dois tipos de células têm uma morfologia semelhante e os fibroblastos apresentam marcadores na membrana que também se encontram nas MSC, por isso os marcadores que caracterizam os MSC ainda não estão corretamente identificados (Ishii et al., 2005).

Foi assumido que as MSC se encontram nos tecidos dentários uma vez que em processos normais do organismo quando as condições são propícias, no caso de uma lesão por exemplo, os tecidos periodontais e pulpares têm a capacidade de se regenerarem naturalmente após tratamentos dentários (Egusa et al., 2012).

A Sociedade internacional terapia celular Internacional (ISCT) propôs que se estabelecessem critérios mínimos para definir as MSC, e assim se definiram como células mesenquimais do estroma, aderentes a recipientes tratados para a cultura de células quando em condições de cultura standard, devem também expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR, para além disto devem ter a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. Foram também recentemente encontrados os marcadores CD271 e MSC antigénio-1. Foi proposto que se utilizasse, para além dos marcadores proteicos membranares anteriores, marcadores para o mRNA específicos das MSC (Egusa et al., 2012).

2.2.2. Células estaminais (mesenquimais) dentárias

Estudos recentes revelaram que os tecidos da cavidade oral são fontes ricas de células estaminais adultas já que conseguimos encontrar MSC em muitos deles. Para além disso estes tecidos são bastante acessíveis. As características destas células tornam-nas ideais para utilizar no âmbito das estratégias na endodontia regenerativa, para substituir tecidos ou órgãos através da manipulação celular *in vitro* e da criação de um ambiente extracelular adequado (Egusa et al., 2012).

Uma vez que o propósito é formar tecido dentário podemos escolher células estaminais com

origem nos tecidos dentários para a engenharia de tecidos, embora qualquer célula estaminal possa ser utilizada para o mesmo efeito (Sharma et al., 2015).

Estas células podem ser encontradas nos “nichos de células estaminais” que são zonas específicas no dente onde se encontram alojadas (Fig.6). Estes nichos para além das células estaminais incluem a matriz extracelular (ECM) e fatores solúveis que são fundamentais para a renovação e manutenção das próprias células estaminais (Sharma et al., 2015).

Nos nichos do dente podemos encontrar dois tipos de células estaminais, células estaminais epiteliais (EpSC) e células estaminais mesenquimais (MSC), as mais utilizadas (Egusa et al., 2012).

Enquanto vários progressos significativos foram feitos com as MSC, não há muita informação disponível para as EpSC em humanos. Isto acontece porque as células EpSC dentárias tais como os ameloblastos e precursoras de ameloblastos são eliminadas logo após a erupção do dente, sendo assim, as células epiteliais que são capazes de dar origem a ameloblastos *in vitro* ou *ex vivo* e podem ser estimuladas para formar esmalte não se encontram presentes no dente adulto humano (Bluteau, Luder, De Bari, & Mitsiadis, 2008).

Na cavidade oral, vários tipos de células estaminais mesenquimais foram isolados e categorizados: células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED), células estaminais da papila apical (SCAP), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC), (Sharma et al., 2015) células estaminais precursoras do folículo dentário (DFSC), células progenitoras do germen dentário (TGPC) (Egusa et al., 2012) e células estaminais derivadas da gengiva humana (GMSC) (Suchánek et al., 2016).

As populações de células estaminais dos tecidos dentários variam dependendo da sua origem e nível de maturação. Durante a maturação os tecidos dentários duros não possuem células estaminais, ao contrário dos tecidos moles e por isso ajudam na auto-regeneração e regeneração dos tecidos duros que os envolvem. O único tecido duro dentário que não pode ser reparado é o esmalte porque não contacta diretamente com tecidos moles (Suchánek et al., 2016).

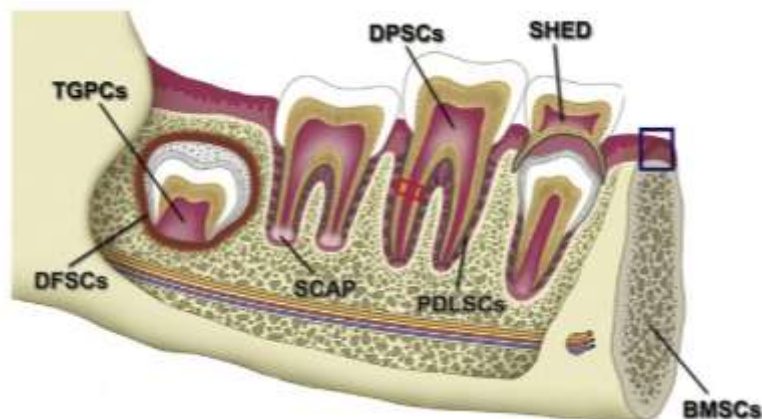


Figura 6 – Representação esquemática da mandíbula que mostra a localização de células estaminais dentárias. As iniciais serão explicadas nos próximos temas. Adaptado de: (Egusa et al., 2012)

Tabela 2 - Ordem cronológica da descoberta das células estaminais de origem dentária.

| | | | |
|---|------|-------|---|
| ↓ | 2000 | DPSC | (Gronthos, Mankani, Brahim, Robey, & Shi, 2000) |
| | 2003 | SHED | (Miura et al., 2003) |
| | 2004 | PDLSC | (Seo et al., 2004) |
| | 2005 | DFPC | (Morsczeck et al., 2005) |
| | 2006 | SCAP | (Sonoyama et al., 2006) |

2.2.2.1. DPSC

Não há muitos anos, em 2000, foram pela primeira vez identificadas células estaminais na polpa dentária (DPSC) (Fig.6) e descobriu-se que estas apresentavam características fenotípicas similares às células estaminais da medula óssea (BMSC) (Gronthos et al., 2000).

Até então a identificação e isolamento de uma população de células progenitoras odontoblásticas da polpa nunca tinha sido concretizada (Gronthos et al., 2000).

Gronthos et al. fizeram um estudo onde isolaram uma população de células de rápida

proliferação da polpa humana dentária que foram comparadas com as BMSC por serem células com características de células estaminais. Apesar destas partilharem a mesma imunofenotipagem *in vitro* notou-se que em estudos funcionais as primeiras não formavam adipócitos ao contrário das BMSC. Quando as células da polpa dentária humana foram transplantadas para ratos imunocomprometidos estas formaram uma estrutura do tipo dentinário juntamente com células do tipo dos odontoblastos humanos que se encontravam à volta de um tecido intersticial do tipo da polpa dentária humana. Por outro lado, as BMSC formavam osso lamelar com osteócitos e osteoblastos que circundavam tecido vascular fibroso com hematopoiese ativa e adipócitos (Gronthos et al., 2000).

Apesar de já se saber bastante acerca do desenvolvimento do dente ainda pouco se sabe sobre as populações celulares precursoras no organismo pós-natal, pensa-se que os odontoblastos surgem da proliferação de uma população precursora que se encontra no tecido pulpar (Gronthos et al., 2000).

Sabemos que em determinadas condições algumas células da polpa podem-se diferenciar em células do tipo dos odontoblastos com capacidade de formar nódulos mineralizados *in vitro*, por outro lado sabemos que as BMSC têm essa mesma capacidade e que têm também a capacidade de se diferenciarem em células das múltiplas linhagens de células do estroma. Segundo este estudo essas mesmas células da polpa humana apresentam uma expressão proteica similar às BMSC. Por analogia calculou-se que o tecido da polpa dentária adulta poderia também conter uma população de células estaminais multipotentes que foram designadas DPSC (Dental Pulp Stem Cell) (Gronthos et al., 2000).

A qualidade e características das linhagens de células estaminais pulpares varia com a denteição (pré-decíduos, primária, secundária) e com nível de maturação (Suchánek et al., 2016).

Os dentes mais frequentemente utilizados para o isolamento de DPSC são os primeiros pré-molares (Fig.7) e os terceiros molares isto porque são frequentemente extraídos numa idade ainda jovem (Suchánek et al., 2016).

Por motivos ortodônticos os primeiros pré-molares são extraídos pouco depois da erupção

por volta dos 12 anos, a juventude dos tecidos dentários e a raiz ainda não completamente desenvolvida faz destes dentes uma fonte ideal de células estaminais. Já os terceiros molares são extraídos para prevenir complicações, como inflamações, ou por motivos ortodônticos por volta dos 16-30 anos, isto implica um dente maioritariamente desenvolvido (Suchánek et al., 2016).



Figura 7 - Dois primeiros pré-molares superiores antes do isolamento da polpa dentária. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

- Extração da Polpa Dentária

Para garantir que o tecido pulpar extraído está o mais intacto possível é necessário utilizar um método de extração que permita a menor destruição possível e que varia consoante o nível de maturação do dente (Suchánek et al., 2016).

Como referido anteriormente a polpa dentária é constituída por tecido conjuntivo e odontoblastos fechados dentro da câmara pulpar. Durante o processo de desenvolvimento do dente o tecido pulpar fica cada vez mais aprisionado no tecido dentário duro (paredes da câmara pulpar) até que só resta um pequeno orifício (0.25-0.35 mm) no ápex radicular (forâmen apical fisiológico) que permite a passagem dos nervos e vasos sanguíneos (Suchánek et al., 2016).

Os três métodos mais comuns de extração da polpa dentária são: (1) Extração da polpa dentária através do ápex fisiológico; (2) Dividir o dente utilizando fórceps; (3) Dividir o dente utilizando uma broca (Suchánek et al., 2016).

O primeiro método é considerado o mais fácil, rápido e qualitativamente mais eficiente, no

entanto, só pode ser realizado em dentes com o forâmen apical aberto (aproximadamente >2mm), sendo assim é reservado exclusivamente para dentes que não estão ainda completamente desenvolvidos (isolamento de polpa dentária imatura da primeira e segunda dentição) ou dentes que apresentam reabsorção radicular (isolamento de polpa dentária da primeira dentição) (Suchánek et al., 2016).

Sendo assim para realizar o primeiro método o primeiro passo é cuidadosamente separar a polpa dentária da dentina (normalmente utilizando uma agulha). O passo seguinte é puxar a polpa utilizando uma pinça (pinças de aço inoxidável, modelo ADSON) (Fig.8a) (Suchánek et al., 2016).

Quando o forâmen apical é demasiado estreito para a remoção da polpa teremos de utilizar um dos outros métodos que envolvem a desagregação do tecido duro que envolve a polpa. Nestes dois métodos para aceder ao tecido pulpar divide-se o dente em dois pela junção amelocimentária usando fórceps (esmagando a junção) (Fig.8b) ou uma broca. Ao utilizar a broca esta deverá ser diamantada, risca vermelha, 200,000rpm num contra-ângulo de alta rotação, neste caso deve-se arrefecer o dente com spray de água e fazer um corte horizontal na junção (Fig.8c) (Suchánek et al., 2016).

Existe também a hipótese de utilizar uma broca em forma de disco e fazer um corte vertical, mas este método é considerado mais arriscado no que diz respeito à integridade e qualidade da polpa obtida (Fig.8d). Após o corte a polpa é removida da mesma forma descrita no primeiro método (Suchánek et al., 2016).

É importante referir que o método da broca poderá ter um impacto negativo na polpa recolhida porque poderá haver um aquecimento excessivo durante o corte. Apesar de estes métodos mecânicos serem relativamente mais complicados, demorados e menos eficazes na quantidade de tecido recolhido (em comparação com o primeiro método), permitem aos investigadores um maior alcance a nível de dadores/tecidos doados (Suchánek et al., 2016).

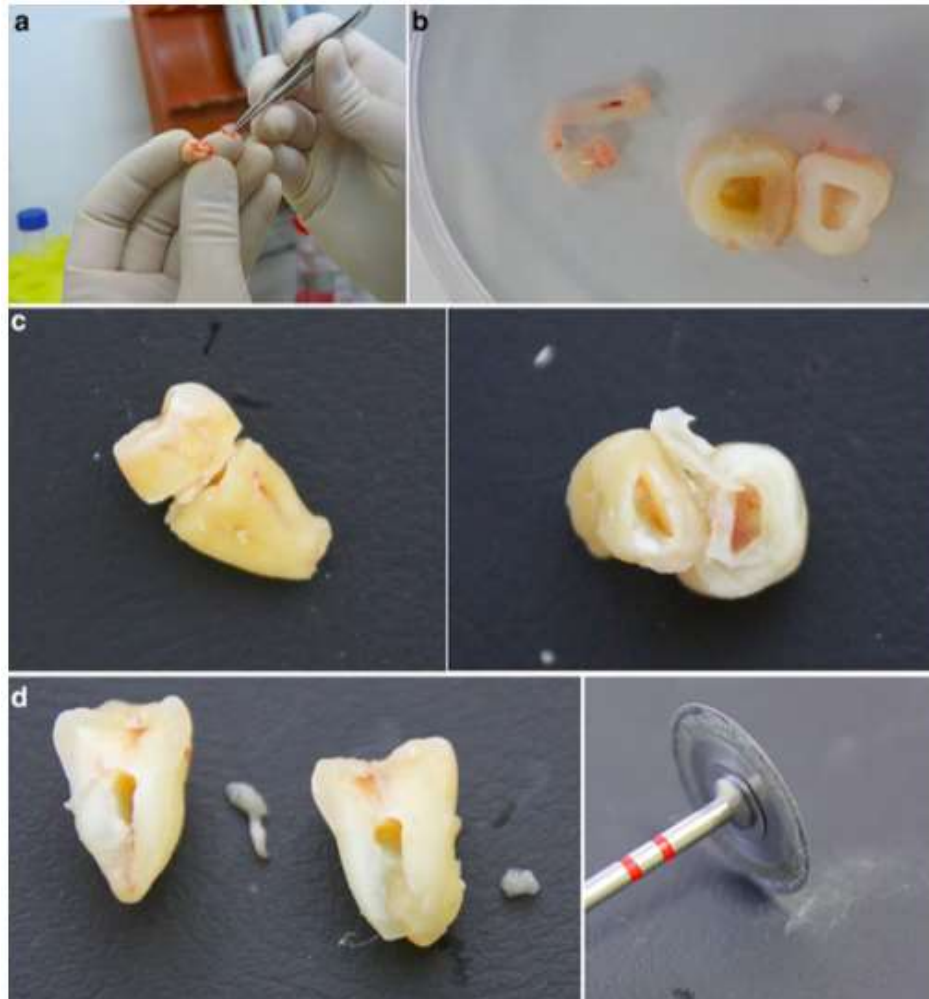


Figura 8- Diferentes técnicas para a extração da polpa dentária (a) Extração do tecido pulpar de um dente com raízes não completamente desenvolvidas; (b) terceiro molar inferior em que a coroa foi separada da raiz através de forceps, do lado direito coroa e raiz, do lado esquerdo o tecido pulpar recolhido; (c) terceiro molar superior em que a coroa foi separada da raiz utilizando uma broca, do lado esquerdo o dente separado, do lado direito o dente com polpa ainda dentro do canal; (d) terceiro molar superior separado através de um corte vertical com uma broca em disco que está do lado direito, do lado esquerdo podemos observar a polpa entre as duas metades. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

2.2.2.2. SHED

As SHED (Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous teeth) são células do tipo mesenquimais presentes na polpa de dentes decíduos esfoliados naturalmente (Fig.6) (Egusa et al., 2012).

Em 2003 um estudo feito por Miura et al. demonstrou que os dentes decíduos humanos esfoliados contêm, tal como o cordão umbilical, células estaminais multipotentes que podem ser uma importante fonte para aplicações clínicas.

A coroa que resta dos dentes decíduos esfoliados contém polpa remanescente que inclui tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e odontoblastos. Para isolar as células estaminais das outras células presentes na polpa fizeram-se diluições da suspensão de células para obter células únicas retiradas da polpa remanescente que foram colocadas em cultura de baixa densidade. Aconteceu que 12 a 20 destas culturas a partir de uma única célula dos dentes esfoliados foram capazes de formar colónias aderentes, característica comum às células estaminais mesenquimais (Miura et al., 2003).

Essas células foram de seguida misturadas com fosfato tricálcico de hidroxiapatite (HA TCP) cerâmica em pó (Zimmer, Warsaw, IN) e transplantadas em subcutâneo para ratos imunocomprometidos, e demonstraram conseguir formar osso e dentina. (Miura et al., 2003).

As SHED são consideradas uma população de células altamente proliferativa capaz de se diferenciar numa variedade de tipos celulares incluindo adipócitos e odontoblastos (Miura et al., 2003).

Neste estudo provou-se que os dentes esfoliados humanos possuem uma outra população de células estaminais de localização diferente das células estaminais identificadas anteriormente e que não só são provenientes de uma fonte muito acessível como também são capazes de fornecer material suficiente para aplicações clínicas como por exemplo engenharia de tecidos (Miura et al., 2003).

Estas células não só possuem as características principais das células estaminais, auto-

renovação e multidiferenciação como também conseguem induzir a formação de uma matriz óssea com uma estrutura lamelar e recrutar células do hospedeiro. Este comportamento está de acordo com o comportamento dos dentes decíduos que estão programados para ao esfoliarem haver uma reabsorção da raiz acompanhada de crescimento ósseo à sua volta, o que poderá explicar essa característica (Egusa et al., 2012).

Em comparação com as BMSC e as DPSC, as SHED mostraram uma taxa de proliferação maior e uma população final duplicada (Miura et al., 2003).

As restrições éticas associadas ao uso de células estaminais embrionárias juntamente com a dificuldade de acesso a células estaminais adultas autólogas fez com que as SHED se tornassem uma alternativa bastante promissora para a engenharia de tecidos dentários já que o tecido está disponível e é de fácil acesso. Para além disso, como referido anteriormente estas possuem uma taxa de proliferação superior às células estaminais de dentes permanentes (Saber, 2009).

No entanto há um fator importante a ter em conta, a quantidade de células estaminais presentes nos dentes esfoliados decíduos vai diminuído à medida que a polpa recua (e vai sendo substituída por gengiva). O que indica que os dentes decíduos que caem espontaneamente têm pouca ou nenhuma polpa e por isso pouca ou nenhuma população de SHED. Sendo assim para garantir que existe uma população de células estaminais suficientes para isolar por regra geral só se utilizam dentes que possuam pelo menos 1/3 do comprimento original da raiz (após o início da reabsorção da dentição primária) e para os dentes multirradiculares é melhor isolar se tiverem a furca ainda presente (Fig.9) (Suchánek et al., 2016).

A idade de preferência para extrair os dentes decíduos para isolar as células estaminais da polpa é entre os 5 e 9 anos. Deve-se ter em atenção se existem lesões de cárie presentes, nesse caso o dente já não pode ser utilizado (Suchánek et al., 2016).

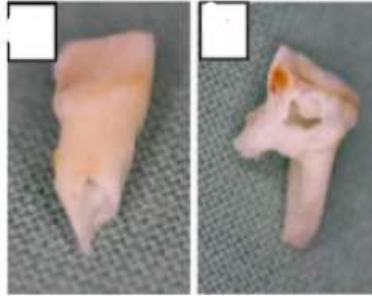


Figura 9 – Dois dentes decíduos para extração da polpa dentária. Do lado esquerdo incisivo central superior decíduo onde a raiz está reabsorvida e o canal radicular amplamente aberto; do lado direito segundo molar inferior decíduo após a divisão da coroa usando uma broca para abrir a camara pulpar. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

2.2.2.3. PDLSC

Outra fonte de células estaminais adultas do tipo mesenquimais é o ligamento periodontal (Fig.6), são conhecidas como PDLSC (Periodontal Ligament Stem Cell), e podem ser isoladas até de dentes já extraídos, o que se torna uma vantagem (Egusa et al., 2012).

O ligamento periodontal é a estrutura que faz a conexão entre o osso alveolar e o cimento mantendo o dente *in situ* e preservando a homeostase dos tecidos duros (Suchánek et al., 2016).

Após algumas experiências em animais verificou-se que estas células têm a capacidade de regenerar os tecidos periodontais (Egusa et al., 2012).

Em 2004 Seo et al. provou a presença de células estaminais multipotentes no ligamento periodontal e caracterizou-as molecularmente. Utilizou tecido do ligamento periodontal para isolar as células estaminais identificadas pela presença de marcadores das células estaminais. Essas células foram por sua vez transplantadas para ratos imunocomprometidos com o intuito de avaliar a capacidade de regeneração de tecidos periodontais e reparação do mesmo (Seo et al., 2004).

Segundo os resultados as PDLSC expressavam os marcadores mesenquimais STRO-1 e CD146/MUC18 das células estaminais e quando transplantadas para ratos imunocomprometidos conseguiram gerar cimento e uma estrutura do tipo do ligamento periodontal (Seo et al., 2004).

Pode-se, a partir deste estudo, concluir que o ligamento periodontal contém células estaminais com potencial de regeneração dos tecidos do periodonto o que poderá ser muito promissor para a regeneração tecidular (Seo et al., 2004).

A presença das PDLSC foi também apoiada por Trubiani et al. que isolou e caracterizou uma população de MSC do ligamento periodontal, a imunofenotipagem e as propriedades morfológicas mostraram que as células expandidas *ex vivo* do ligamento periodontal foram similares às células mesenquimais da medula óssea e às células perivasculares do cordão umbilical (Trubiani O, Di Primio R, Traini T, 2005).

Trubiani et al. utilizaram PDL-MSCs expandidas *ex vivo* induzidas para osteogênese, inseridas em *scaffolds* tridimensionais biocompatíveis. Após 4 semanas de incubação observou-se uma biomassa celular que cobria parcialmente a *scaffold*. Isto indica que o ligamento periodontal pode ser uma eficiente fonte autóloga de células estaminais (Trubiani et al., 2008).

As PDLSC são frequentemente isoladas do tecido mole junto à raiz por baixo da junção amelocimentária (JAC), e são normalmente isoladas dos primeiros pré-molares e terceiros molares de dadores que têm o periodonto saudável (Suchánek et al., 2016).

Segundo estudos mais recentes põe-se a hipótese de as características das PDLSC poderem depender do local onde estas se encontram, isto é, se estiverem mais próximas da superfície radicular não têm tanta capacidade de regeneração óssea como as que se encontram mais próximas do osso alveolar (Wang et al., 2011).

Como se sabe após a extração de um dente apenas uma parte do ligamento periodontal fica preso à superfície radicular, o resto permanece na superfície do alvéolo. Inúmeros estudos foram realizados com o ligamento da superfície radicular mas em relação ao ligamento remanescente no alvéolo não se sabia se tinha o mesmo potencial estaminal (Wang et al., 2011).

Em 2011 Wang et al. isolou e caracterizou essas células estaminais do ligamento remanescente da superfície do osso alveolar e concluiu que estas apresentavam maior potencial de diferenciação do que as da superfície radicular no que dizia respeito a diferenciação adipogénica e osteogénica.

O potencial clínico das PDLSC foi realçado pela demonstração de que estas células podem ser isoladas a partir de ligamento periodontal criopreservado e conseguem manter as suas características de células estaminais tornando-se assim uma fonte promissora de MSCs (Saber, 2009). A extração do ligamento periodontoal é feita raspando a superfície radicular do dente após extração (Fig.10) (Suchánek et al., 2016).

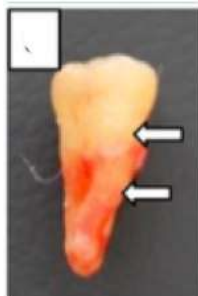


Figura 10 - Terceiro molar superior, a seta mais a baixo indica a área da raiz coberta pelo ligamento periodontal e por isso a fonte de PDLSC, a seta de cima indica a JAC. Adaptado de: (Suchánek, Browne, Kleplová, & Mazurová, 2016)

2.2.2.4. DFSC

As DFSC (Dental Follicle Stem Cells) são as células estaminais localizadas no folículo dentário (Fig.6) (Suchánek et al., 2016).

O folículo dentário é composto por tecido ectomesenquimatoso laxo derivado do tecido conjuntivo que envolve o órgão de esmalte e a papila dentária do dente antes da erupção. É função do folículo dentário coordenar a erupção do dente (Morsczeck et al., 2005). Assim que a camada epitelial (bainha radicular de Hertwig) que separa este tecido da dentina se desintegra e o folículo dentário toca na dentina rapidamente se diferencia em tecido periodontal incluindo o osso alveolar, cimento e ligamento periodontal (Suchánek et al., 2016).

Em 2005 Morsczeck et al. induziu a diferenciação *in vitro* das células do folículo dentário humano com dexametasona e insulina, e isolou células de dois folículos dentários individuais com capacidade de adesão a uma superfície de plástico característica das células MSC. Além disso, ambas as linhagens celulares foram capazes de se diferenciar em estruturas do tipo membranas com focos mineralizados (Morsczeck et al., 2005).

Estas condições experimentais ajudam a isolar as células estaminais presentes dado que a insulina acelera o fenótipo das células progenitoras, mas não tem qualquer efeito nas outras, por outro lado a dexametasona induz a expressão do fenótipo das células multipotentes

(Morsczeck et al., 2005).

A recolha do tecido é relativamente fácil uma vez que não está firmemente colado ao dente. Existe sempre a questão do tempo, para que isto seja possível a fonte mais comum é o terceiro molar extraído de dadores jovens (entre 10-14 anos) (Suchánek et al., 2016).

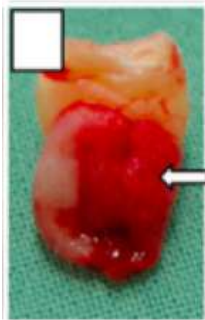


Figura 11 - Terceiro molar inferior com tecido do folículo dentário na área marcada pela seta. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

2.2.2.5. SCAP

As SCAP (Apical Papilla Stem Cell) são células estaminais da papila apical que foram encontradas no tecido da papila dentária na zona apical das raízes de dentes em desenvolvimento (Fig.6) (Egusa et al., 2012).

Em 2006 Sonoyama provou a existência de uma nova população de células estaminais, as SCAP, usando um miniporco (que foram por eles considerados um modelo viável para o conceito de regeneração tecidual dentária) transplantou SCAP e PDLSC com o propósito de formar um complexo de raiz-periodonto capaz de suportar uma coroa de porcelana com um funcionamento normal.

Neste estudo detetou-se que o tecido da papila apical da raiz do dente na zona exterior do forâmen apresentava o marcador de superfície das células estaminais mesenquimais STRO-1 (antígeno de superfície celular resistente a tripsina), indicando que a papila apical na zona radicular poderia conter uma população de células estaminais (Sonoyama et al., 2006).

Sabe-se que a papila dentária contribui para a formação do dente e mais tarde converte-se em

tecido pulpar. Após o início do desenvolvimento da raiz, a papila dentária divide-se em polpa dentária e papila apical (Suchánek et al., 2016). Apesar de as suas características histológicas ainda não estarem bem definidas sabe-se que são distintas morfologicamente, para além de que a papila apical apresenta menos componentes celulares e vasculares em comparação com a polpa (Sonoyama et al., 2008).

Quer as SCAP quer as DPSC são fortes diferenciadoras dentinogénicas e osteogénicas tal como as MSC da medula óssea, no entanto são mais fracas na diferenciação adipogénica (Sonoyama et al., 2008).

Em comparação com as DPSC, as SCAP apresentam uma melhor proliferação *in vitro* e melhor regeneração da matriz dentinária quando transplantadas para ratos imunocomprometidos (Egusa et al., 2012).

Segundo Sonoyama et al. as SCAP proliferam 2 a 3 vezes mais rápido do que as da polpa dentária imatura adjacente, contém menos componentes celulares e vasculares, e ainda MSC. Uma vez que a papila apical tem origem na crista neural as suas células estaminais possuem vários marcadores neurogénicos (Suchánek et al., 2016).

A descoberta destas células estaminais na papila apical pode explicar um fenómeno descrito nalguns casos clínicos onde a apexogénese pode ocorrer em dentes permanentes imaturos mesmo quando infetados com periodontite perirradicular ou abcessos. É provável que as SCAP sobrevivam a esta necrose pulpar por se encontrarem próximas do sistema vascular dos tecidos periapicais. Sendo assim após desinfeção endodôntica, e sob influência da bainha de Hertwig, estas células podem gerar odontoblastos primários que completam a formação radicular (Saber, 2009).

A bainha radicular de Hertwig (HERS) tem um papel importante na formação radicular. Durante a formação do dente, após a formação da coroa, o mesenquima apical continua a proliferar para formar o periodonto enquanto os epitélios interno e externo do órgão de esmalte se unem e produzem uma dupla camada epitelial chamada bainha radicular de Hertwig (Zeichner-David et al., 2003).

As SCAP são isoladas da papila apical de um dente que ainda não está completamente

desenvolvido, os dentes mais adequados para extrair são os primeiros pré-molares até aos 12 anos e os terceiros molares entre os 12 e os 16 anos (Suchánek et al., 2016).

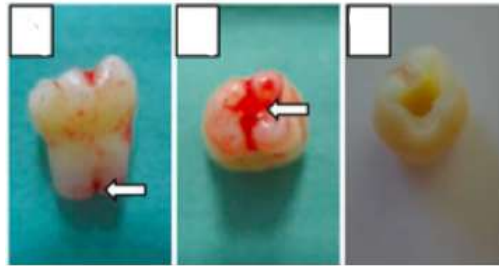


Figura 12 - Três dentes para extração de células estaminais da papila apical. À direita terceiro molar inferior com raízes ainda não completamente desenvolvidas; no centro terceiro molar inferior com raízes ainda não desenvolvidas com a papila apical a cobrir o orifício radicular; à esquerda mesmo dente do centro mas após a extração do tecido pulpar. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

A papila apical localiza-se na área de crescimento radicular por baixo da polpa dentária (Fig.12). A polpa dentária e papila apical estão separadas por papila apical unida a uma zona rica em células apicais que não aderem à polpa dentária e portanto permite a separação entre as duas (Suchánek et al., 2016).

Enquanto os tecidos da papila dentária e apical podem ser removidos de dentes imaturos quer da primeira dentição como da segunda, é raro encontrar dentes decíduos imaturos indicados para extração que não apresentem lesões de cárie, sendo assim as SCAP e DPSC são consideradas como linhagens de células estaminais de dentição secundária (Suchánek et al., 2016).

2.2.2.6. TGPC

As TGPC (Tooth Germ Progenitor Cells) são células estaminais cuja fonte é o gérmen dentário (Fig.6) (Ikeda et al., 2008).

Em 2008 Ikeda et al. identificaram células estaminais no mesenquima do gérmen dentário do terceiro molar na fase de campânula. Essas células apresentavam alta atividade proliferativa

e capacidade para se diferenciarem *in vitro* em linhagens das três camadas germinativas incluindo osteoblastos, células neurais e hepatócitos.

O desenvolvimento dentário ocorre desde a crista neural e vai passando por quatro fases morfológicas (botão, capuz, campânula e maturação final (Fig. 13(A), (B), (C), (D) respectivamente)). No estudo acima referido foi utilizado mesenquima dentário quase no final da fase de campânula (Ikeda et al., 2008).

É no final da fase de campânula que ocorre a diferenciação e calcificação, nesta fase o germen dentário consiste em três componentes (órgão de esmalte, mesenquima dentário (papila dentária) e folículo dentário) (Fig. 13(G)) (Ikeda et al., 2008).

A papila dentária é um tecido mesenquimal localizado entre o órgão de esmalte no topo e o folículo dentário na base que eventualmente se irá transformar em tecido pulpar. É primeiramente responsável pela morfogênese da coroa e mais tarde fica responsável pela morfogênese das raízes (na forma de papila apical) (Suchánek et al., 2016).

Os dentes mais adequados para obter este tipo de células estaminais são os terceiros molares quando as raízes ainda não estão formadas, para que isso seja possível terá de ser antes dos 14 anos (Fig. 13(F)) (Suchánek et al., 2016).

O conhecimento atual do potencial de diferenciação das TGPC ainda é mínimo e requer mais pesquisa (Suchánek et al., 2016).

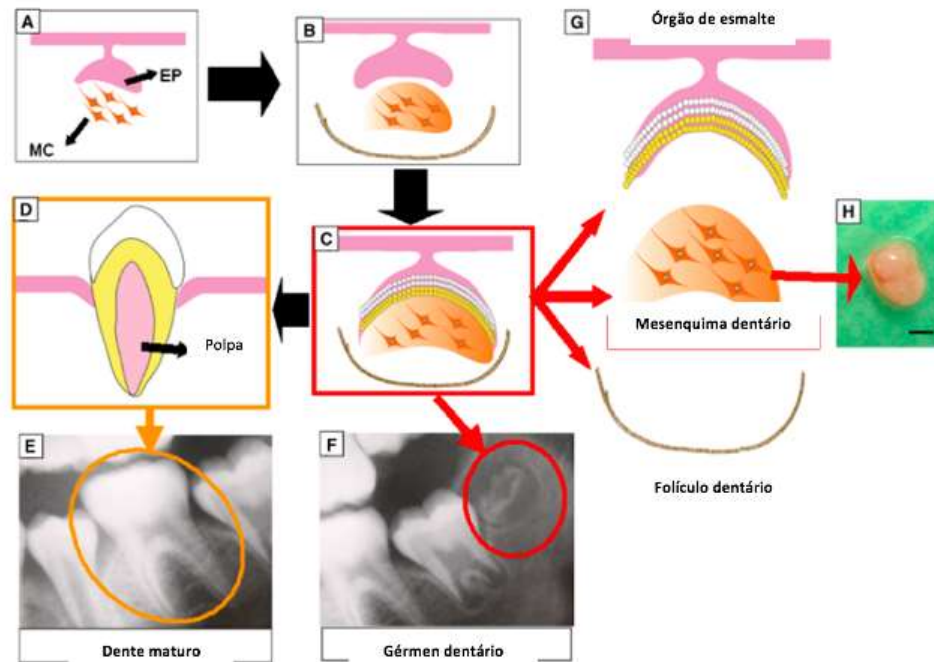


Figura 13 - Desenvolvimento dentário e mesenquima dentário. (A) fase de botão; células epiteliais em crescimento (EP) e células mesenquimais a proliferar (MC). (B) fase de capuz; o botão epitelial alarga formando uma estrutura redonda. (C) fase de campânula. (D) maturação do dente; dente maduro já com polpa. (E) radiografia de um dente maduro. (F) radiografia do gérmen dentário do terceiro molar na mandíbula. (G) as três partes do gérmen dentário no final da fase de campânula. (H) mesenquima dentário (polpa ou papila dentária). Adaptado de: (Ikeda et al., 2008)

A extração do gérmen dentário designa-se germectomia (Fig.14), um processo idêntico é utilizado na extração do tecido do folículo dentário (DFSC) (Fig.11) (Suchánek et al., 2016).

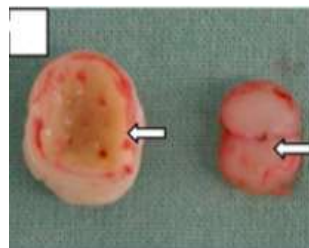


Figura 14 - Terceiro molar inferior na fase de campânula (pós germectomia), do lado esquerdo o dente, do lado direito a polpa. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

2.2.2.7. GMSC

As GMSC (Gengiva-derived Mesenchymal Stem Cells) são células estaminais localizadas na gengiva humana, normalmente encontram-se na camada espinhosa. Esta população para além de ser muito homogénea apresenta marcadores normais das MSC assim como expressão positiva para marcadores de proteínas da matriz extracelular. Estas células já foram diferenciadas com sucesso em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Suchánek et al., 2016).

A gengiva é um tecido mole da mucosa oral que forma uma proteção física aos tecidos dentários fechando o espaço entre o esmalte dentário exposto e o ligamento periodontal que envolve o cimento. Tem ainda capacidades imunomodulatórias e anti-inflamatórias o que permite ajudar os outros tecidos a regenerar (Suchánek et al., 2016).

Um estudo foi feito em 2009 onde concluíram que as GMSC removidas de tecido extraído mantiveram a expressão do marcador Octamer-4 (Oct-4) e a capacidade de se auto-renovarem e formarem tecidos do tipo conectivo com colagénio tipo I. Estes resultados indicaram que as GMSC representam uma nova população de células estaminais (Zhang et al., 2009).

O Oct-4 é uma proteína comum das MSC (Zhang et al., 2009).

Nem todos os dentes extraídos têm uma quantidade de gengiva para investigação suficiente mas quando há esta vem agarrada à superfície radicular e para a sua extração é raspada juntamente com algum ligamento periodontal que também fica agarrado (Suchánek et al., 2016).

2.2.3. Células estaminais de fontes não dentárias

Para além das fontes dentárias utilizadas para isolar células estaminais existem outras fontes não dentárias possíveis, sendo a mais utilizada a medula óssea (BMSC) (Fig.6) (Sharma et al., 2015).

Estas são células progenitoras multipotentes raras, que apesar da heterogeneidade têm uma grande capacidade de replicação e diferenciação em diferentes tipos de tecido conjuntivo nomeadamente osteogénico, condrogénico, adipogénico ou linhagens neurogénicas não

mesenquimais (Egusa et al., 2012).

Apesar de poderem ser facilmente isoladas a aspiração da amostra é um tanto ou quanto invasiva para o dador. No entanto a crista ilíaca é a fonte de células estaminais mais documentada pois desde cedo que se utiliza este local para recolher medula óssea para o tratamento da leucemia (Egusa et al., 2012).

Contudo existe um fator a ter em conta que é a idade do dador que pode alterar o potencial destas células, não só a sua capacidade de formar osso diminui como também a capacidade de expansão *in vitro* é menor com o aumento da idade, por outro lado também se sabe que a idade do dador parece ter um efeito mínimo no padrão da expressão genética (Egusa et al., 2012).

Para além da crista ilíaca, estas células podem ser recolhidas de ossos orofaciais como a maxila e a mandíbula que são fontes possíveis e relativamente acessíveis para a extração destas células, em situações como a colocação de um implante ou extração de um dente incluso em que já se tem acesso ao osso (Egusa et al., 2012).

Num estudo feito em 2006 verificou-se que as células do estroma da medula óssea da crista ilíaca formam osso mais compacto com tecido hematopoiético e respondem melhor *in vitro* e a induções osteogénicas e adipogénicas *in vivo* em comparação com as células do estroma da medula óssea orofaciais que respondem melhor à formação de osso *in vivo*. Com isto podemos concluir que as células do estroma da medula óssea no mesmo indivíduo podem ter respostas diferentes *in vivo* e *in vitro* dependendo do local (Akintoye et al., 2006).

Noutro estudo em 2010 após a implantação em ratos concluiu-se que as BMSC da mandíbula formam nódulos ósseos maiores e mais mineralizados em comparação com a implantação de BMSC de osso longos, sendo assim prevê-se uma maior capacidade e potencial osteogénico por parte das BMSC mandibulares (Aghaloo et al., 2010).

São estas características das células estaminais da medula óssea que poderão garantir bons resultados para a regeneração de ossos faciais (Egusa et al., 2012).

Como desvantagem entre os ossos faciais e a crista ilíaca é a quantidade da amostra que no

primeiro caso terá de ser bastante mais pequena, sendo assim era importante que fossem criados alguns protocolos para estudos futuros (Egusa et al., 2012).

2.3. Scaffold

As *scaffold* são estruturas semelhantes a um andaime que mimetizam a estrutura e função biológica da matriz extracelular, quer na sua composição química quer na estrutura física. A função da matriz extracelular vai muito para além do suporte físico das células, esta fornece um substrato que contém ligandos para a adesão e migração celular e regula a proliferação devido à presença de fatores de crescimento (Ma, Kotaki, Inai, & Ramakrishna, 2005).

O ideal seria que as *scaffold* conseguissem ter o mesmo papel *in vitro* que a matriz extracelular tem *in vivo* (Ma et al., 2005).

A *scaffold* pode ser implantada sozinha ou em combinação com células estaminais e fatores de crescimento para reproduzir um ambiente tridimensional físico-químico e biológico de diferenciação celular e construção tecidual (Saber, 2009).

Características ideais de uma *scaffold* (Saber, 2009):

- Deve ser porosa para permitir a colocação de células e fatores de crescimento;
- Deve permitir o transporte eficaz de nutrientes, oxigénio e desperdício;
- Deve ser biodegradável, sem deixar quaisquer bioprodutos tóxicos;
- Deve ser substituída por tecido regenerativo mantendo a morfologia da estrutura do tecido final;
- Deve ser biocompatível;
- Deve ter força mecânica e física adequada.

Quanto aos tipos de *scaffold* existentes: (a) *Scaffold* biológica/natural e (b) *Scaffold* artificial

(a) *Scaffold* biológica/natural:

Consiste em polímeros naturais tais como colagénio e glicosaminoglicanos, que oferecem uma boa biocompatibilidade e bioatividade (Saber, 2009), e o alginato (Devillard et al., 2015).

O colagénio é o componente maioritário da matriz extracelular e fornece uma boa força de tração aos tecidos. Quando o colagénio faz o papel de *scaffold* permite uma boa substituição do tecido natural, permitindo um posicionamento das células e fatores de crescimento, após a sua degradação (Saber, 2009).

No entanto já foi observado algumas vezes que as células pulpares em matrizes de colagénio sofrem uma contração acentuada o que pode afetar a regeneração do tecido pulpar (Saber, 2009). Foi também referenciado que a compactação da *scaffold* após a proliferação celular resulta numa falta de contacto das células com a dentina (Devillard et al., 2015).

(b) *Scaffold* artificial:

São polímeros sintéticos com características físico-químicas controladas assim como taxa de degradação, microestrutura e força mecânica, por exemplo (Saber, 2009):

-Ácido polilactico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), e os seus co-polímeros, ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

-Hidrogéis sintéticos que incluem polímeros à base de polietilenoglicol (PEG).

-*Scaffolds* modificadas com péptidos de adesão da superfície celular, assim como arginina, glicina, ácido aspártico (RGD) para melhorar a adesão celular e a síntese de matriz na rede tridimensional.

-*Scaffold* contendo componentes inorgânicos como hidroxiapatite (HA), fosfato tricálcio (TCP) e polifosfato de cálcio (CPP), que são utilizados para aumentar a condutividade óssea, e mostraram ser muito eficazes na engenharia de tecidos com DPSC.

-*Scaffolds* com microcavidades preenchidas para aumentar a adesão celular.

Um estudo foi feito em 2015 com o intuito de produzir uma *scaffold* biológica que pudesse ser moldada de forma a reproduzir a geometria do cone de gutta-percha (GP) (Fig.15) com precisão e permitir a diferenciação de MSC em osteoblastos (Devillard et al., 2015).

Foi utilizada uma *scaffold* composta de colagénio e alginato colocada num molde de alginato de sódio para produzir o formato de um cone de GP. Antes do congelamento foram colocadas SCAP para avaliar as interações entre ambas. O tecido reconstruído foi avaliado após 8 dias em cultura. Foram avaliados o módulo de elasticidade, a compactação tecidular e a diferenciação celular (Devillard et al., 2015).

O método de fabricação utilizado permitiu a mimetização do formato da gutta-percha com alta precisão e reprodutibilidade. As células estaminais colocadas nesta *scaffold* composta conseguiram-se espalhar, sobreviver e proliferar, foram ainda capazes de se diferenciar em osteoblastos e produzir uma matriz extracelular óssea calcificada. Observou-se que não apresentava contração após 8 dias, preservando a sua forma e diâmetro da ponta (Devillard et al., 2015).

Pode-se concluir que esta *scaffold* composta pode apresentar inúmeros benefícios em comparação com os materiais sintéticos (Devillard et al., 2015).

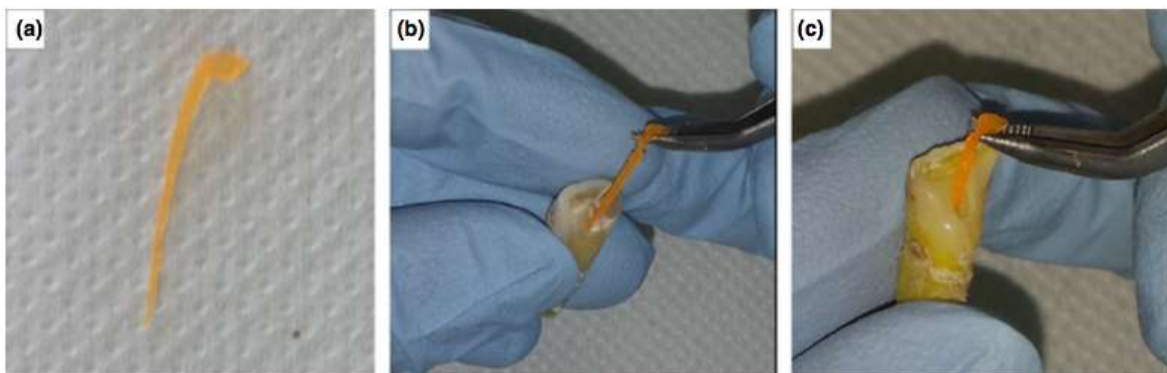


Figura 15 - Implantação de uma *scaffold* composta num dente humano extraído. (a) o cone de GP composto antes da implantação; (b-c) cone de GP a ser inserido no canal radicular. Adaptado de: (Devillard et al., 2015)

Vários relatórios mostraram que as células da polpa podem ser isoladas, multiplicadas em cultura e depositadas numa matriz *scaffold* onde as células da cultura irão formar um novo tecido idêntico ao da polpa original (Saber, 2009).

Sendo assim podemos concluir que há a possibilidade de se formar polpa e dentina em canais sem polpa. No entanto quando as *scaffolds* com células são colocadas nos canais que têm apenas uma zona pequena de vascularização, que é o ápex, é necessário um aumento da vascularização para suportar a vitalidade das células e *scaffold* implantadas. Isto pode ser otimizado através do acrescento de fatores de crescimento (Saber, 2009).

Com o uso de técnicas atuais como designs computadorizados e impressões 3D, as *scaffolds* podem ser fabricadas em formas geométricas específicas com uma série de superfícies bioativas. Estas *scaffolds* têm o potencial de fornecer ambientes condutores dos fatores de crescimento e de tipos celulares específicos (Saber, 2009).

2.4. Fatores de crescimento

Para o sucesso da regeneração do complexo pulpo-dentinário é fundamental conjugar todos os componentes da tríade da engenharia tecidual: células estaminais, fatores de crescimento e *scaffolds* e por isso os fatores de crescimento têm um papel indispensável na endodontia regenerativa (Zeng et al., 2016).

Os fatores de crescimento são proteínas que se ligam a recetores da célula e que induzem a proliferação celular e/ou a diferenciação da mesma. Existem vários fatores de crescimento e muitos são bastante versáteis, isto é, conseguem estimular a divisão celular em vários tipos celulares enquanto outros são específicos (Murray et al., 2007).

Os fatores de crescimento têm um papel fundamental no recrutamento celular, migração, proliferação e diferenciação. Estes podem surgir de diversas fontes como o coágulo sanguíneo, plasma rico em plaquetas (PRP), plasma rico em fibrina (PRF) (Zeng et al., 2016).

A matriz dentinária parece ser um local de reservatório destes fatores, já foi comprovado que estes podem ser libertados quando a dentina é danificada e no processo de regeneração da

mesma (Zeng et al., 2016). A dentina possui muitas proteínas capazes de estimular respostas tecidulares. A desmineralização dos tecidos dentários leva a uma libertação de fatores de crescimento que depois terão um papel importante na sinalização para alguns eventos da dentinogênese terciária, uma resposta de reparação pulpo-dentinária (Murray et al., 2007).

Uma das questões colocada nas terapias de regeneração pulpar é se após a preparação do canal (instrumentação mínima seguido de uma irrigação abundante com hipoclorito de sódio (NaOCl) e ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA)) estes fatores continuam a ter a capacidade de ser libertados a partir da matriz dentinária para o canal radicular (Zeng et al., 2016).

Estudos provaram que quando se provoca o sangramento apical, na tentativa de regeneração, as células estaminais são arrastadas para dentro da câmara pulpar, algumas *scaffold* também, no entanto resta saber se os fatores de crescimento estão presentes neste sistema de revascularização (Zeng et al., 2016).

Um estudo foi feito por Zeng et al. em 2016 com o propósito de investigar a libertação de fatores de crescimento para o canal radicular após o procedimento de irrigação seguindo o protocolo de endodontia regenerativa da associação americana de endodontia (AAE).

Nesse estudo, foram utilizados sessenta segmentos radiculares de dentes monoradiculares. Os canais radiculares foram irrigados com 1.5% NaOCl + 17% EDTA, 2.5% NaOCl + 17% EDTA, 17% EDTA, ou água desionizada. O perfil dos fatores de crescimento libertados após a irrigação foi estudado. Ensaios de imunoabsorção enzimática validaram a libertação do fator de transformação do crescimento beta 1 (TGF- β 1) e do fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) 4 horas, 1 dia e 3 dias após irrigação (Zeng et al., 2016). Como resultado confirmaram a presença de 11 fatores de crescimento dos 41 fatores de crescimento testados. Concluiu-se que o modelo do segmento radicular utilizado neste estudo simulou o cenário clínico e indicou que o protocolo atual de irrigação libertou uma quantidade significativa de TGF- β 1 mas não de bFGF. Os fatores de crescimento libertados no canal radicular induziram a migração celular (Zeng et al., 2016).

Atualmente, um grande número de fatores de crescimento já foi identificado, com funções

específicas que podem ser úteis nas terapias de regeneração tecidual. Muitos podem ser utilizados para controlar a atividade das células estaminais, assim como aumentar a proliferação das mesmas induzindo a sua diferenciação noutro tipo celular ou estimulá-las para sintetizarem matriz mineralizada (Murray et al., 2007).

Os fatores de crescimento especialmente os da família do fator de transformação do crescimento beta (TGF β) são importantes na sinalização celular para a diferenciação dos odontoblastos e estimulação da secreção da matriz dentinária. Estes fatores de crescimento são secretados pelos odontoblastos e depositados dentro da matriz dentinária. Onde se mantêm protegidos numa forma ativa pela interação com outros componentes da matriz (Murray et al., 2007). Nesta família, os fatores de crescimento importantes no desenvolvimento e regeneração dentária são as proteínas morfogenéticas do osso (BMPs). O fator BMP2 estimula a diferenciação de células estaminais adultas da polpa em células com morfologia odontoblástica em cultura. Os efeitos dos fatores TGF β 1-3 e BMP7 observados em cultura são semelhantes. Os fatores BMP-2, -4 e -7 induzem a formação de dentina reparadora *in vivo* (Murray et al., 2007).

Verificou-se que a aplicação do fator de crescimento insulín-like-1 juntamente com colagénio induz a dentinogénese reparadora (Lovschall, Fejerskov, & Flyvbjerg, 2001). Vários estudos mostram o potencial que poderá ter a adição de fatores de crescimento antes de uma proteção pulpar ou incorporados nos materiais restaurativos e endodônticos, para estimular a regeneração da dentina e da polpa. Futuramente, estes fatores de crescimento poderão ser usados em conjunto com células estaminais para a substituição pulpar completa de dentes com polpa necrosada (Murray et al., 2007).

Um fator ainda desconhecido é o que regula a transição das células estaminais em repouso para um estado ativo de proliferação, migração, diferenciação e secreção de matriz após uma lesão do tecido pulpar (Nakashima & Akamine, 2005).

Tabela 3 - Fonte, atividade e utilidade de alguns fatores de crescimento mais comuns. Adaptada de: (Murray et al., 2007)

| | Fator | Fonte primária | Atividade | Utilidade |
|------------|------------------------------------|----------------------------|--|--|
| BMP | Proteína morfogenética óssea | Matriz óssea | Induz diferenciação de osteoblastos e mineralização do osso | Utilizada para induzir as células estaminais a sintetizarem e secretarem matriz mineralizada |
| CSF | Fator estimulador de colónias | Ampla variedade de células | São citoquinas que estimulam a proliferação de células estaminais ósseas pluripotentes específicas | Pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais |
| EGF | Fator de crescimento da epiderme | Glândulas submaxilares | Promove a proliferação de células mesenquimais, gliais e epiteliais | Pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais |
| FGF | Fator de crescimento fibroblástico | Ampla variedade de células | Promove a proliferação de várias células | Pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais |

| | | | | | |
|--------------------------------|--|---|--------|--|--|
| IGF | Fator de crescimento insulínico I ou II | I-fígado de variedade de células | II- de | Promove a proliferação de vários tipos celulares | Pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais |
| IL | Interleucinas IL-1 a IL-13 | Leucócitos | | São citocinas que estimulam as respostas imunitárias humoral e celular | Promove a atividade inflamatória celular |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas | Plaquetas, células endoteliais, placenta | | Promove a proliferação de tecido conjuntivo, células gliais e do músculo liso | Pode ser utilizado para aumentar o número de células estaminais |
| TGF-α | Fator de crescimento transformado r-alfa | Macrófagos, células cerebrais e queratinócitos | | Pode ser importante para a normal cicatrização | Induz desenvolvimento epitelial e de estrutura tecidual |
| TGF-β | Fator de transformação do crescimento - beta | Matriz de dentina, células TH1 ativadas, células (<i>T-helper</i>) e células <i>natural killer</i> (NK) | | Anti-inflamatório, promove a cicatrização, inibe a proliferação de macrófagos e linfócitos | Está presente na matriz dentinária e tem sido utilizado para promover a mineralização de tecido pulpar |

| | | | | |
|------------|------------------------------|--|--|---|
| NGF | Fator de crescimento nervoso | Proteína secretada pelo tecido alvo de um neurónio | Crítico para a sobrevivência e manutenção de neurónios simpáticos e sensoriais | Promove o crescimento de neurónios e sobrevivência celular neuronal |
|------------|------------------------------|--|--|---|

2.4.1. Proteína morfogénica óssea (BMP)

As proteínas morfogénicas ósseas (BMPs) são fatores de crescimento multifuncionais que pertencem à superfamília do fator de transformação do crescimento beta (TGF β) (Saber, 2009).

As BMPs estão repetidamente envolvidas no desenvolvimento embrionário do dente e parecem ser muito importantes para a regeneração de dentes adultos. As suas redes de sinalização são bastante complexas e reguladas em pelo menos três níveis: a nível extracelular, na membrana e domínios intracelulares. Por sua vez, os antagonistas da BMP como a folistatina, nogina e cordina são também responsáveis pela biodisponibilidade dos morfogénios (Nakashima & Akamine, 2005).

Morfogénios são fatores secretados que regulam a morfogénese durante as interações epitelial-mesenquimal (Nakashima & Akamine, 2005).

As primeiras BMP foram identificadas pela sua capacidade de induzir formação óssea ectópica quando implantada na pele de roedores. Até à data foram identificados e caracterizados cerca de 20 membros da família BMP. Estes têm diferentes perfis de expressão, diferentes afinidades para os recetores e por isso atividades *in vivo* únicas (Saber, 2009).

Durante a formação do dente as BMP ditam quando irá ocorrer a iniciação, morfogénese, citodiferenciação e secreção da matriz (Saber, 2009).

As BMP assim como outros fatores de crescimento têm sido utilizados com sucesso na

proteção pulpar direta o que encorajou a adição de fatores de crescimento às células estaminais para a endodontia regenerativa (Saber, 2009).

Existem duas estratégias para a utilização de BMPs para a regeneração dentinária. A primeira é a terapia *in vivo* onde as BMP ou genes das BMP são diretamente aplicados na polpa exposta ou removida. A segunda estratégia é terapia *ex vivo* (Fig. 16), consiste no isolamento das DPSC, na sua diferenciação em odontoblastos com BMP ou genes das BMP recombinantes e por fim o seu transplante para regenerar dentina (Saber, 2009).

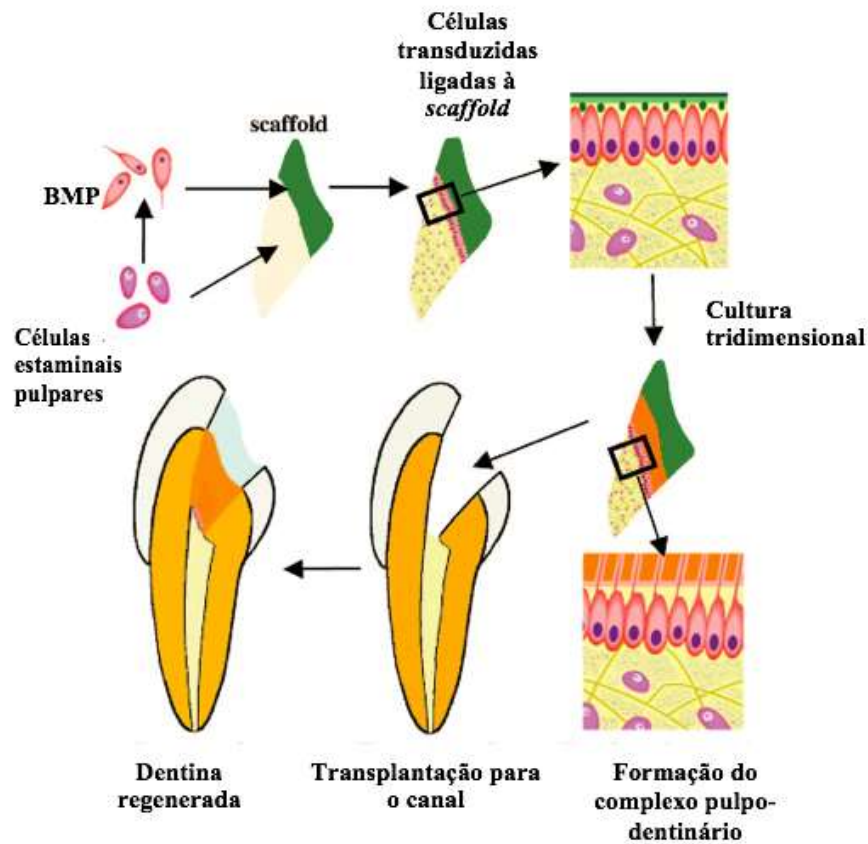


Figura 16 – Formação do complexo pulpo-dentinário utilizando uma técnica de endodontia regenerativa. As células estaminais da polpa são transduzidas com o gene BMP e ligadas a uma *scaffold* para se diferenciarem *in vitro* em odontoblastos. O complexo pulpo-dentinário é depois transplantado para a cavidade onde se encontra polpa previamente removida. Adaptado de: (Nakashima & Akamine, 2005)

O papel da BMP-2 é alegadamente importante na formação dentinária. A BMP-2 recombinante estimula a diferenciação de DPSC em células do tipo dos odontoblastos em cultura, aumenta a atividade da fosfatase alcalina e acelera a expressão do gene da sialofosfoproteína da dentina (DSPP) *in vitro* assim como aumenta a formação de tecidos duros *in vivo* (Saber, 2009).

Efeitos idênticos foram demonstrados para a BMP-7, também conhecida como proteína osteogénica-1 que promove a dentinogénese reparadora e mineralização pulpar em alguns modelos animais (Saber, 2009).

Lin et al. realizaram um estudo em que utilizaram um vector adenoviral que permite induzir a expressão de BMP-7 em culturas de células de polpas humanas. A expressão de BMP-7 levou a um aumento da actividade da fosfatase alcalina bem como a indução da expressão de DSPP, o que indica que a BMP-7 consegue promover a diferenciação de células pulpares em células do tipo dos odontoblastos e promover a mineralização *in vitro* (Lin, Qin, Zhang, Xiao, & Ling, 2007).

No caso da proteína BMP-4 esta é secretada pelas células mesenquimais regulando a bainha radicular de Hertwig durante o desenvolvimento da raiz prevenindo a elongação e mantendo a proliferação celular. A BMP-4 tem sido utilizada como um agente de regulação da formação radicular numa variedade de aplicações de engenharia tecidual (Saber, 2009).

O fator de crescimento TGF- β e a BMP regulam a proliferação celular, diferenciação e apoptose, controlando o desenvolvimento e a manutenção de vários tecidos. Os seus sinais são transmitidos por acumulação no núcleo das proteínas supressoras de tumor SMAD, previamente fosforiladas pela proteína recetora serina/treonina cinase (RS/TKs), levando à ativação da transcrição de vários genes (Kretzschmar, Doody, & Massagué, 1997).

No que diz respeito à via de sinalização das BMP estas têm interação com dois recetores da superfície celular (I e II) que são glicoproteínas. No início as BMP ligam-se aos recetores tipo II e os recetores IA ou IB são recrutados e fosforilados induzindo uma resposta intracelular (Fig.17) (Bragança et al., 2010).

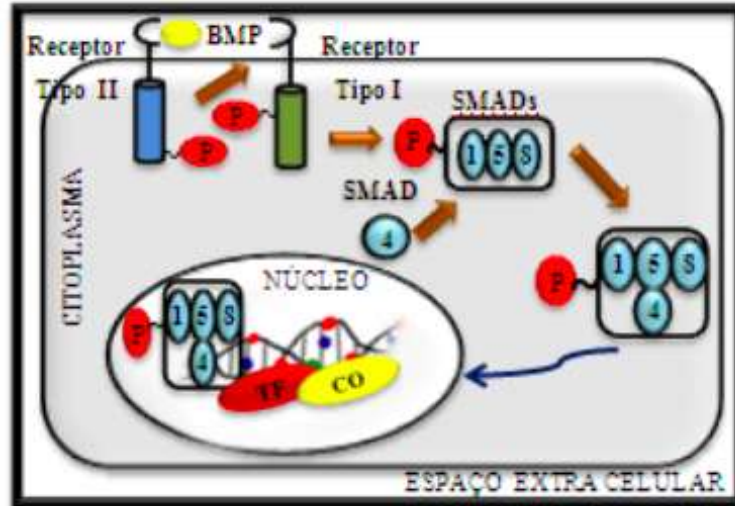


Figura 17 - Via de sinalização das BMP. Estas ligam-se inicialmente ao recetor tipo II que é fosforilado (P) e recruta o recetor tipo I que também é fosforilado. De seguida o recetor I promove a fosforilação do complexo SMAD 1, 5 e 8, estes unem-se à SMAD-4 formando o complexo SMAD 1, 5, 4, 8 que penetra a membrana nuclear e liga-se aos fatores de transcrição (TF) e aos co-reguladores (CO) inibindo ou ativando a expressão genética. Adaptado de: (Bragança et al., 2010)

2.5. Obtenção de células estaminais

2.5.1. Dador

Teoricamente qualquer dente vital e os tecidos que o envolvem são uma fonte possível de células estaminais, no entanto devem-se restringir as fontes de tecidos dadores para aquelas em que há mais probabilidade de fornecerem populações de células estaminais factíveis e viáveis, para os tecidos onde haverá menor impacto no processo de extração tanto para as populações de células como para o dador (Suchánek et al., 2016).

1. Fonte de tecidos dentários

Diferentes linhagens de células estaminais só podem ser isoladas de um dador jovem e com um desenvolvimento saudável (Suchánek et al., 2016).

2. Saúde do dador

A nível da historia médica geral existem certas condições como por exemplo predisposições genéticas que podem causar viés na pesquisa assim como podem influenciar as qualidades do material de pesquisa (Suchánek et al., 2016).

Há também que ter em atenção o impacto da extração do tecido no dador (Suchánek et al., 2016).

3. Estado clínico do tecido

As condições do tecido e o ambiente onde se encontra podem ser um problema, por exemplo, lesões de cárie representam um risco de contaminação bacteriana, inflamações nos tecidos moles podem ter impacto no material de pesquisa, dentes já erupcionados estão contaminados pela microflora oral, raízes completamente formadas complicam o processo de isolamento de polpa dentária (Suchánek et al., 2016).

2.5.2. Recolha de tecidos dentários e transporte

A recolha de tecidos para pesquisa de células estaminais faz-se nas mesmas condições que uma extração normal, no entanto devemos ter em atenção a preservação do material biológico

e sobretudo a saúde do doente/dador (Suchánek et al., 2016).

Há dois métodos de extração comumente utilizados: a extração simples e a extração cirúrgica, ambos são executados com anestesia local (Suchánek et al., 2016).

-A extração simples é realizada no caso de dentes totalmente erupcionados, em que são utilizados inúmeros instrumentos dentários incluindo o boticão e fórceps para quebrar as fibras do ligamento periodontal e alargar o alvéolo dentário permitindo a remoção segura do dente intacto (Suchánek et al., 2016).

-A extração cirúrgica é utilizada no caso de dentes impactados ou não erupcionados (é a forma mais comum de remover tecido para isolamento das células estaminais) (Fig.18) (Suchánek et al., 2016).

O procedimento envolve levantar uma aba de mucoperiósteo na gengiva que cobre o dente a extrair. De seguida corta-se o osso que envolve o dente de modo a permitir que se consiga a quantidade de osso a ser removido. Nesta altura dependendo da situação ora o cirurgião remove o dente por completo (que é preferível) ou faz odontosecção. Uma vez seccionado os tecidos dentários para pesquisa ficam automaticamente comprometidos (Suchánek et al., 2016).

Após a extração é recomendável que se desinfete o dente usando uma solução desinfetante que normalmente se usa na cavidade oral para diminuir a presença de bactérias. Por fim o dente deverá ser mergulhado por completo na solução salina de Hank juntamente com antibióticos e antifúngicos (esta solução tem na sua composição 1 ml de solução salina de Hank, 9 ml de água para injeção, 200µl/10 ml gentamicina, 200µl/10 ml streptomina, 200µl/10 ml penicilina) para eliminar por completo a presença de quaisquer bactérias remanescentes (Suchánek et al., 2016).



Figura 18 - Procedimento de extração cirúrgica de um terceiro molar inferior. Na primeira imagem a ortopantomografia. Segunda e terceira imagens mostram a aba de mucoperiósteo. Na quarta imagem o osso que cobre o dente é removido. Na quinta imagem extração do dente utilizando o boticão. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

A temperatura da solução durante o transporte é importante que seja de 4°C. Apesar das células estaminais serem teoricamente resistentes à hipoxia e sobreviverem mais tempo do que as células somáticas, é essencial que sejam isoladas dos tecidos extraídos o mais depressa possível (não mais do que 24h depois da extração). Por este motivo é importante investir numa preparação preliminar para impedir o desperdício de tempo desnecessário (Suchánek et al., 2016).

2.5.3. Isolamento de células estaminais dentárias

Para a engenharia tecidual *in vitro* o primeiro passo é isolar células com o fenótipo certo e colocá-las em ambientes de cultura adequados. Normalmente estas células são colocadas numa superfície bidimensional antes de serem colocadas numa *scaffold* tridimensional (Huang, Sonoyama, Chen, & Park, 2006).

A utilização de células estaminais autólogas é ideal uma vez que reduz a probabilidade de uma rejeição imunitária ou transmissão de agentes patogénicos. Recolher as células do

próprio doente torna-se um processo mais fácil não só na sua obtenção como em relação a problemas legais e éticos, contudo, por vezes as células do próprio dador podem não ser adequadas para o tratamento (Murray et al., 2007).

A cultura de células é um termo que se refere ao crescimento e manutenção de células num ambiente controlado fora do organismo. Uma cultura de células estaminais bem sucedida mantém as células saudáveis, separadas e não especializadas (Saber, 2009).

O isolamento de células pulpares com potencial para se diferenciarem em odontoblastos é um passo crítico para a regeneração de tecido pulpar e formação de nova dentina (Huang et al., 2006).

Para produzir dentina nova através do tecido pulpar regenerado é necessário que as células estaminais pulpares se fixem à parede de dentina tratada e que proliferem e se diferenciem em odontoblastos de maneira a formar dentina (Huang et al., 2006).

As células estaminais dentárias são isoladas normalmente numa de duas abordagens: A digestão enzimática dos tecidos (ED) ou o crescimento espontâneo de partes do tecido original (OG) (Suchánek et al., 2016).

Na digestão enzimática o tecido depois de extraído é mergulhado numa solução de enzimas digestivas (normalmente solução salina de Hank (HBSS) com colagenase I diluída (3 mg/ml), dispase (4mg/ml) e tampão fosfato (PBS) de concentração 1x) durante 30-60 min, dependendo do tamanho do tecido extraído, a 37°C. O resultado da ED é uma única suspensão de células que contém vários tipos de células e restos de vasos e matriz extracelular (Fig.19). Não é fundamental remover o que não é importante da suspensão mas é uma possibilidade. Independentemente disso a suspensão de células estaminais é centrifugada (600 g (força g), 2000 rpm por 5 min) e o *pellet* celular é colocado em frascos de cultura onde é ressuspenso num meio para amplificação. Após 7 dias as células estaminais aderem ao frasco de cultura. Nesta altura todo o material restante é removido com o meio e novo meio de amplificação é adicionado (Fig.20) (Suchánek et al., 2016).

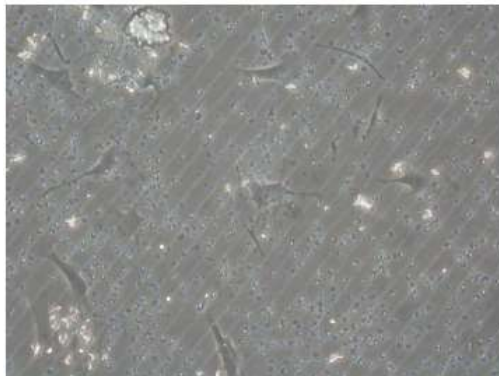


Figura 19 – Cultura primária de células estaminais da polpa dentária 6 dias após o cultivo juntamente com o remanescente do tecido de origem. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

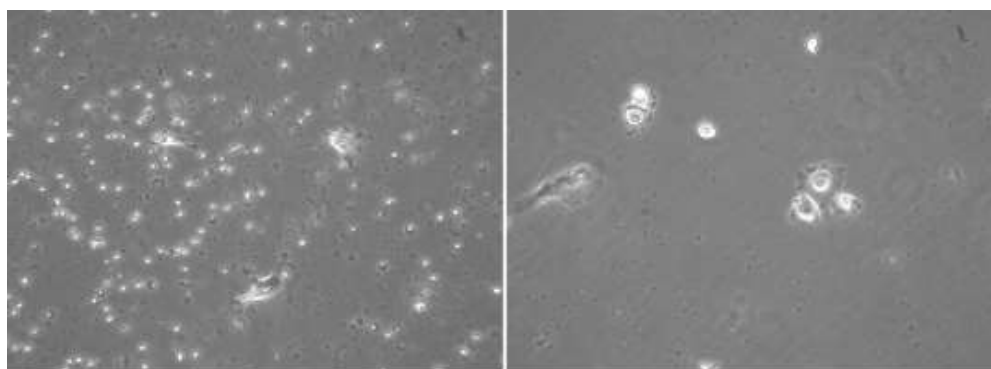


Figura 20 - A mesma linhagem de células estaminais da polpa antes e depois de se alterar o meio respectivamente. Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

O crescimento espontâneo é tecnicamente mais fácil e rápido que o anterior. O tecido é cortado em pedaços inferiores a 2mm e mergulhados num frasco de cultura completamente em meio de amplificação. Passados 3 a 5 dias podem-se observar células aderentes ao frasco de cultura por baixo e à volta do pedaço de tecido (Fig.21) (Suchánek et al., 2016).

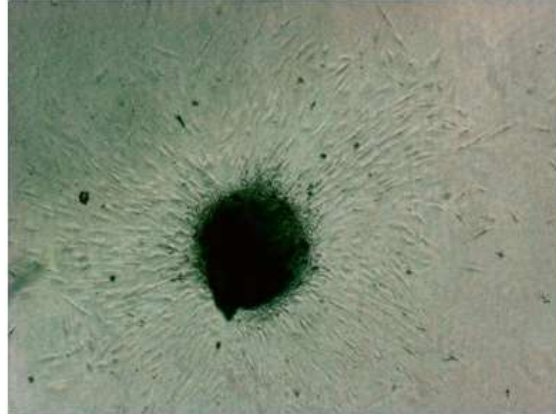


Figura 21 - Um pedaço de tecido dentário da polpa com células em crescimento à sua volta (12 dias após cultura). Adaptado de: (Suchánek et al., 2016)

Estudos recentes indicam que o método de isolamento das células provavelmente tem influência na linhagem de células estaminais isoladas. Alguns investigadores compararam os dois métodos referidos e concluíram que o método OG tinha uma menor expressão dos marcadores celulares, e menor taxa de proliferação (Suchánek et al., 2016).

É o caso de Huang et al. que em 2006 compararam estes dois métodos de isolamento de células dentárias pulpares e chegaram à conclusão que as células isoladas por digestão enzimática tiveram uma maior taxa de proliferação (Huang et al., 2006).

Concluíram também que a escolha do método de isolamento das células pulpares pode afetar a distribuição das populações celulares obtidas, uma superfície dentinária tratada mecânica e quimicamente pode promover a diferenciação das células pulpares em odontoblastos com processos que se estendem para os túbulos dentinários e que a matriz de colagénio pode não ser uma *scaffold* adequada para a regeneração de tecido pulpar (Huang et al., 2006).

2.5.4. Amplificação de células estaminais dentárias

Após o isolamento das linhagens de células estaminais é necessário expandir a sua população para quantidades relevantes para investigação (a quantidade de células isoladas depende do tecido de origem e do método de extração). Dependendo do objetivo futuro da população de células é importante escolher as condições adequadas de amplificação e ambiente, soro utilizado no meio (xenogénico, autólogo ou nenhum) e co-cultura (interações epitelial/ectodérmica- mesenquimal) uma vez que afetam a qualidade da população de células estaminais resultante (Suchánek et al., 2016).

No que diz respeito a medicina regenerativa deve-se evitar usar soro xenogénico uma vez que o seu uso levanta algumas questões éticas, legais e médicas desde resultados enviesados, contaminação viral, bacteriana e fúngica e alteração permanente no código genético da população de células estaminais (Suchánek et al., 2016).

Geralmente as células estaminais dentárias são amplificadas e diferenciadas aos 37°C a 5% CO₂ atmosférico. Para manter uma taxa de proliferação alta as células estaminais cultivadas devem ser passadas para o meio de amplificação quando a população atinge os 70% de confluência (se a confluência for superior a 70% há uma diminuição da proliferação devido à inibição fisiológica de contacto) (Suchánek et al., 2016).

2.5.5. Sistemas de cultura

A comunidade científica reconhece dois ambientes básicos de cultura de células estaminais para amplificação e diferenciação: Sistemas de cultura aderentes; Sistemas de cultura não aderentes (formação-esférica/suspensão); existe ainda um terceiro tipo de ambiente de diferenciação, Sistemas de co-cultura (Suchánek et al., 2016).

No geral, enquanto nos sistemas de cultura não aderentes a passagem das células é mais fácil e o crescimento celular não é limitado pela área da superfície dos frascos, nos sistemas de cultura aderentes é mais fácil de controlar visualmente permitindo avaliar a heterogeneidade celular. Já os sistemas de co-cultura fornecem um sitio específico de interação o que leva a

uma diferenciação específica de linhagens de células estaminais adultas (Suchánek et al., 2016).

-Sistema de cultura aderente

Estes sistemas consistem num frasco de cultura que permite a adesão das células estaminais. No final da cultura, o frasco é lavado com solução salina tampão fosfato que remove com segurança todo o meio de cultura. Assim que as células estaminais são o único elemento do frasco a sua superfície é coberta por completo por tripsina o que vai descolar as células da superfície do frasco. A tripsina é neutralizada passados 5 minutos por uma solução de α -MEM (meio essencial mínimo de Eagle alfa) e soro (concentração de 20%). A suspensão resultante de células cultivadas é centrifugada (600g, 2000rpm por 5 min). Após centrifugação o sobrenadante é removido e o *pellet* celular resultante é resuspenso num novo meio de cultura e colocado num novo frasco, numa concentração de 2500 células por cm^2 . Este sistema de cultura é o sistema padrão na pesquisa de células estaminais (à exceção da cultura e diferenciação de linhagens celulares que não aderem (células neurais e hematopoiéticas)) (Suchánek et al., 2016).

-Sistema de cultura não aderente ou formação esférica/suspensão

As esferas são culturas de células estaminais flutuantes que ao contrário do método anterior não aderem à superfície do frasco de cultura. Nestes sistemas de esferas o meio normalmente não possui soro, contém fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e fator inibidor da leucina (LIF) e repousa sobre uma superfície super-hidrofílica (não aderente) num frasco ou num frasco de cultura (Suchánek et al., 2016).

Segundo Jensen e Parmar a aplicabilidade deste sistema coloca algumas questões no ar, nomeadamente se as propriedades dos tipos celulares cultivados são sensíveis aos métodos de cultura utilizados, se há uma variação na densidade celular conforme o sistema usado, assim como com as concentrações dos fatores no meio, método, frequência de passagem e número de passagens após isolamento (Jensen & Parmar, 2006).

Há ainda alguns investigadores que referem haver um aumento da heterogeneidade das células da esfera com o aumento do número de passagens, havendo assim na mesma esfera

células em estados diferentes de diferenciação desde células progenitoras a tipos celulares específicos (Suchánek et al., 2016).

-Sistema de co-cultura

O sistema de co-cultura de várias células estaminais dentárias é utilizado não tanto para a amplificação, mas sim para a diferenciação. Estes sistemas de co-cultivações aplicados à pesquisa de células estaminais dentárias baseia-se no conhecimento da gênese tecidual (epitelial-mesenquimal co-cultura/ectodérmica-mesenquimal co-cultura).

Foi demonstrado por Bai et al. que a co-cultura de DFSC e SCAP (de rato) pode levar à formação de partículas do tipo ósseo (Bai et al., 2010).

Estes sistemas são uma ferramenta promissora para o pesquisas futuras uma vez que conseguem replicar o ambiente *in vivo* original com mais rigor que os sistemas de tipo celular único acima descritos (Suchánek et al., 2016).

2.5.6. Meio de amplificação

O meio de cultivo, assim como qualquer componente do ambiente extracelular pode afetar as propriedades de células cultivadas. Devido à grande heterogeneidade dos meios usados nas várias pesquisas de células estaminais dentárias é importante ter em conta o objetivo final e a partir daí escolher o meio mais indicado. É por isso importante que ao escolher um método de pesquisa se tenha sentido crítico para avaliar atentamente a validade dos métodos preliminares e os seus resultados para chegar a uma conclusão cientificamente credível e resultados a partir dos quais se pode trabalhar (Suchánek et al., 2016).

Existem três grupos principais de meios de amplificação: Meio sem soro; Meio com soro alogénico; Meio com soro xenogénico. Atualmente os meios sem soro são ideais devido à ausência de riscos relacionados com os meios alogénicos e xenogénicos (transferência de vírus) (Suchánek et al., 2016).

-Meio sem soro

Este meio é a combinação de meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco, insulina, transferrina, suplemento de selenite de sódio e fator embriotrófico. O meio sem soro é bastante promissor para o futuro da cultura de células estaminais dentárias, no entanto, atualmente não é ainda totalmente eficaz quando utilizado com algumas linhagens de células estaminais e a sua eficácia no aumento da proliferação de células estaminais continua baixa. Na atualidade este meio é utilizado como um meio complementar para os processos de amplificação e diferenciação dos meios com soro xenogénico ou alogénico (Suchánek et al., 2016).

Segundo um estudo em que se utilizou um meio sem soro para amplificação de PDLSC e SHED, as células cultivadas parcialmente num meio sem soro (juntamente com um outro meio) apresentaram mais marcadores característicos de células estaminais do que os que foram amplificados unicamente com o meio xenogénico. Mostraram também capacidade de diferenciação idêntica, no entanto a taxa de proliferação era significativamente mais baixa (Tarle, Shi, & Kaigler, 2011).

-Meio com soro alogénico

O mais comum é o plasma humano (HP) ou o plasma rico em plaquetas (PRP). Está provado que o PRP, devido ao seu conteúdo, é mais eficaz para manter as propriedades das células, para uma taxa de proliferação elevada, para a atividade imunossupressora e migração celular (Suchánek et al., 2016).

As desvantagens deste soro são os perigos envolvidos na transferência de um material heterólogo que pode transportar doenças (HIV, Hepatite), metabolitos de fármacos e ainda dependendo do dador, uma concentração irregular dos fatores de crescimento e outros componentes que variam fisiologicamente. No entanto isto poderá ser contornado utilizando diferentes dadores (Suchánek et al., 2016).

-Meio com soro xenogénico

Este meio contém entre 2-20% de soro de feto de bezerro/soro de bovino onde concentrações

superiores a 10% são mais comuns. Algumas vantagens deste soro incluem o alto conteúdo em fatores de crescimento, e a baixa concentração de fatores de inibição. A desvantagem é que a concentração normalmente utilizada juntamente com os nutrientes do soro, as proteínas e enzimas, não é estável e varia dependendo da fisiologia da espécie. No geral quanto maior a concentração de soro de bovino no meio melhor a adesão celular, maior o número de colónias formadas, e maior o potencial de proliferação. No entanto estes fatores estão a contrabalançar com outros não tão positivos como instabilidade cromossomal, transformações malignas, e, em concentrações superiores a 20%, toxicidade (Suchánek et al., 2016).

Para minimizar estes fatores e manter só os pretendidos é recomendado um meio com soro de bovino <10% e para compensar adicionam-se fatores de crescimento como fatores de crescimento derivados do plasma, e fatores de crescimento epidérmicos (Suchánek et al., 2016).

2.5.7. Diferenciação de células estaminais dentárias

De acordo com a sua origem as células estaminais de tecidos dentários estão pré programadas para se diferenciarem em linhagens específicas, e por isso é difícil, no entanto não é impossível, induzi-las a diferenciarem-se noutras linhagens (Suchánek et al., 2016).

Os resultados do processo de diferenciação de uma célula estão altamente dependentes do ambiente extracelular o que significa que é necessária uma preparação e pesquisa rigorosas. Devemos escolher o melhor sistema de cultura, o método de diferenciação mais correto, e seguir a sua evolução para produzir resultados válidos (Suchánek et al., 2016).

2.5.8. Criopreservação de células estaminais

De entre os vários métodos de criopreservação atuais não existe nenhum que seja claramente o melhor, há ainda muitas perguntas a serem respondidas nomeadamente: qual é o melhor agente crioprotetor e em que concentração deverá ser utilizado para reduzir ou eliminar os

efeitos secundários da criopreservação? ; Quantas células devem ser criopreservadas para obter um resultado viável após descongelamento? ; Qual é o processo ideal de criopreservação, tempo de armazenamento e temperatura para manter a quantidade máxima possível de células viáveis? (Suchánek et al., 2016).

Antes da criopreservação a população de células estaminais deve ser removida do sistema de cultura, após centrifugação o *pellet* celular é resuspenso utilizando o meio de cultura escolhido e a quantidade de células viáveis é calculada. É aconselhado para criopreservar populações de células estaminais a quantidade de pelo menos 1 milhão de células (Suchánek et al., 2016).

Para evitar danos às próprias células causado pela criopreservação em si é utilizado um crioprotetor (por exemplo glicerol ou dimetilsulfóxido - DMSO) na concentração máxima de 10% (uma vez que o DMSO é citotóxico) à temperatura ambiente durante 30 min, para permitir ao crioprotetor entrar nas células mas não as danificar. O DMSO concentrado deverá ser pré-misturado antes que toque nas células porque liberta calor durante o processo de diluição. Por fim as células tratadas deverão ser imediatamente congeladas com nitrogénio líquido (Suchánek et al., 2016).

As células estaminais mais frequentemente criopreservadas são as SHED e as DPSC do terceiro molar quer seja para pesquisas futuras ou utilização médica (Suchánek et al., 2016).

2.5.9. Bioética, Legislação e Regulamentos da pesquisa com células estaminais

O principal objetivo da pesquisa biomédica com células estaminais é aliviar e evitar sofrimento, por problemas genéticos ou adquiridos, causado pela ausência de saúde (Suchánek et al., 2016).

Devido à interdisciplinaridade do conhecimento e da rede de pesquisa por todo o mundo é fundamental unificar padrões permitindo a integridade da informação, divulgação da mesma e respeito pelos elementos do estudo no que diz respeito à sua saúde e direitos (Suchánek et al., 2016).

O consenso internacional sobre as diretrizes de pesquisa com células estaminais é transmitido pela sociedade internacional de pesquisa com células estaminais (ISSCR), organização independente sem fins lucrativos, fundada em 2002 e que todos os anos faz uma atualização dos padrões para investigação e estudos clínicos com células estaminais, fornece também modelos de documentos legais relacionados com a doação e transferência de biomaterial (Suchánek et al., 2016).

O consórcio internacional de redes das células estaminais (ICSCN) fornece os contactos e meios para vincular as legislações e regulamentos nacionais de forma a promover melhores práticas e colaborações internacionais. Este consórcio tem representações em inúmeros países e reúne-se anualmente com o ISSCR (Suchánek et al., 2016).

Para além das organizações internacionais a ética e regulamento das pesquisas é restringida por consórcios supra-nacionais assim como a EuroStemCell, a Administração de alimentos e fármacos dos Estados Unidos da América (USFDA), academias nacionais de legislações e regulamentos e, eventualmente, pelo comité de supervisão das células estaminais (SCRO) (Suchánek et al., 2016).

O SCRO inclui não só representantes da comunidade ética e científica como também do público leigo (Suchánek et al., 2016).

O documento que sumariza os padrões profissionais institucionais e auto-regulamentos emitido pelo SCRO de acordo com os padrões do rascunho da ISSCR 2015 e (Hyun, 2010) divide-se em duas partes: Parte 1 – Respeito pelos participantes na pesquisa; Parte 2 – Integridade da empresa de pesquisa (Suchánek et al., 2016).

Parte 1- Respeito pelos participantes na pesquisa

O respeito pelos participantes na pesquisa é sempre acompanhado da questão do consentimento do doente/dador para fornecer informação genética, e o estado do doente/dador mental e físico atual e no futuro, isto impede os cientistas de tratar o biomaterial à vontade e sujeitá-lo a pesquisas não aprovadas previamente pelo dador e pelo SCRO. Estas questões requerem um consentimento escrito e legalmente válido que, de acordo com o rascunho da ISSCR 2015 deve conter as moradas tanto do dador como da organização com

interesse e os direitos e as obrigações de ambos, mais especificamente (Suchánek et al., 2016):

- Deve fornecer informação correta acerca dos riscos para o dador na remoção do tecido
- Deve fornecer informação precisa dos riscos, limitações, possíveis benefícios, e alternativas disponíveis para o tratamento do doente
- Deve descrever o tratamento e armazenamento do tecido (modificações genéticas, o tipo de recipiente, protocolo do descarte)
- Deve conter a divulgação completa de todas as informações
- Deve conter a informação privada do doente/dador (identificação, genoma), o tratamento e o protocolo do descarte
- Deve contemplar a acessibilidade futura do doente/dador para obter consentimento adicional, material ou informação
- Deve abranger o potencial comercial do material que foi doado e direitos de propriedade intelectual do dador/investigadores
- Deve incluir qual será o tratamento de descobertas acidentais
- Deve conter o tratamento e responsabilidade legal dos investigadores e da equipa médica no caso de haver algum imprevisto na saúde do doente/dador

Parte 2 – Integridade da empresa de pesquisa

O tratamento do material biológico segundo um protocolo válido, oportuno, fiável e reprodutível, executado segundo as Boas práticas laboratoriais (GPL); e relatado de uma forma acessível assegura a integridade da empresa de pesquisa. Isto torna-se importante para pesquisas futuras.

A USFDA fornece um conjunto de ferramentas passo-a-passo para a organização, operação, administração e relatórios institucionais do SCRO, que podem ser usados como base para a

construção dos padrões institucionais.

2.6. Vantagens e Desvantagens

Tabela 4 – Vantagens e desvantagens da endodontia regenerativa com células estaminais.

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Prolonga a vida do dente (Tomson, Berdal, & Stéphane, 2014) • A recolha de tecidos autólogos para obtenção de células estaminais é relativamente fácil (Murray et al., 2007) • As células estaminais conseguem induzir a formação de polpa regenerada (Murray et al., 2007) • O método de regeneração através de células estaminais já é utilizado para vários efeitos no ramo da medicina o que significa que é uma questão de tempo até se aplicar à medicina dentária (Murray et al., 2007) • As células estaminais são relativamente fáceis de crescer em laboratório, o que já foi conseguido várias vezes (Murray et al., 2007) | <ul style="list-style-type: none"> • Dadores com doenças específicas ou idade avançada podem não ter capacidade para doar células autólogas (Murray et al., 2007) • A cirurgia de recolha de tecidos para obtenção das células estaminais pode provocar sequelas pós-operatórias (infecção) (Murray et al., 2007) • As células estaminais após recolhidas devem ser isoladas e amplificadas o que torna esta técnica demorada (Murray et al., 2007) • As células podem ter um tempo de vida curto dificultando o procedimento (Murray et al., 2007) • O facto de existirem poucas células estaminais nos tecidos adultos (estudos indicam 1-4%) é um fator preocupante pois requer obrigatoriamente uma purificação do tecido levando o tempo de tratamento a aumentar (Murray et al., 2007) |

| | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none">• Se se utilizarem células estaminais autólogas estas não precisam de passar pela biópsia e por isso assim que o tecido pulpar estiver pronto pode ser logo transplantado (Murray et al., 2007)• Oferece a possibilidade de se poder controlar o número de células a ser utilizado para o transplante (Mao et al., 2012) (Murray et al., 2007)• Oferece a possibilidade de se poder selecionar a melhor subpopulação de células estaminais (melhor potencial de auto-renovação, capacidade de diferenciação, em comparação com as células progenitoras) (Mao et al., 2012) | <ul style="list-style-type: none">• Custo de todo o processo elevado (inclui: recolha das células, processamento, transporte e transplante) (Mao et al., 2012)• Risco de contaminação (Mao et al., 2012)• Necessidade de pessoal competente capaz de realizar estas técnicas (Mao et al., 2012)• Dificuldade em receber a aprovação legal (Mao et al., 2012)• O tratamento com células estaminais para doenças incuráveis parece ser mais bem aceite do que o mesmo para terapia de polpa vital (sendo que o custo será aproximadamente o mesmo) (Mao et al., 2012) |
|--|---|

2.7. Pesquisa atual

Em 2011 foi feito um estudo *in vivo* com células estaminais pulpares (subpopulação CD105+) autólogas, a primeira demonstração de regeneração pulpar completa. As CD105+ foram transplantadas para o canal radicular com o fator de crescimento SDF-1 (stromal cell-derived factor-1) após pulpectomia em dentes desenvolvidos de cão. Quanto aos resultados o canal radicular foi revestido com polpa regenerada, nervos e vasos ao dia 14, acompanhado de formação dentinária na parede do canal (Fig.22) (Iohara et al., 2011).

As análises de eletroforese 2D e a análise de reação em cadeia de polimerase de transcrição reversa em tempo real, mostraram que qualitativa e quantitativamente, bem como a nível dos padrões de expressão do mRNA da polpa regenerada, as “polpas” resultantes das células estaminais são idênticas às de uma polpa normal (Iohara et al., 2011).

Os seus dados mostraram pela primeira vez que células estaminais pulpares CD105+ com SDF-1 induzem a regeneração completa da polpa dentária incluindo a neurogênese e vasculogênese, *in vivo* em dentes de cães após pulpectomia. Este estudo clínico demonstra o potencial das células estaminais pulpares CD105+ para tratamento de regeneração endodôntica e conservação dos dentes na Medicina dentária (Iohara et al., 2011).

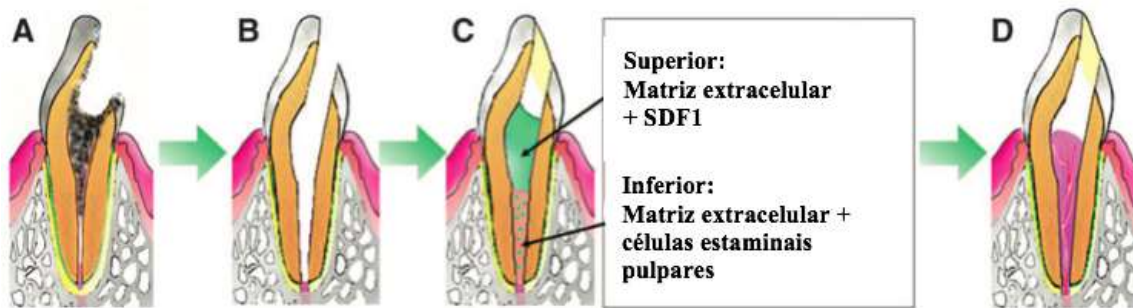


Figura 22 - Diagrama esquemático representativo do modelo canino de regeneração completa da polpa dentária num dente permanente e desenvolvido. (a) Dente com pulpite; (b) Remoção total da polpa e instrumentação para alargar o forâmen apical (cerca de 0.7mm) (c) irrigação e preenchimento com células estaminais pulpares na parte inferior e na superior o SDF-1 juntamente com uma scaffold de colagénio (d) Regeneração pulpar completa. Adaptado de: (Iohara et al., 2011)

Em 2016, João Botelho, no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, realizou um estudo *in vitro* onde usou vinte terceiros molares intactos que após preparação foram divididos em quatro grupos com cinco amostras cada um. O grupo de controlo (C) estava numa solução salina e o grupo de estudo (T) foi colocado em suplemento DMEM (meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco) a dois tempos diferentes: 1 dia e 7 dias. As amostras foram observadas no microscópio ótico com luz.

Os resultados mostraram um complexo pulpo-dentinário funcional com aparência histológica normal mostrando assim que é possível preservar o complexo pulpo-dentinário, após extração, dentária durante 7 dias (Botelho et al., 2017).

A preservação da polpa dentária nestas condições permite um estudo e compreensão dos tecidos no seu ambiente natural e num espaço tridimensional. Uma das maiores vantagens

deste modelo de estudo é a presença natural da tríade de engenharia tecidual: células estaminais, *scaffold* e fatores de crescimento (Botelho et al., 2017).

A heterogeneidade da localização dos nichos de células estaminais implica uma sinalização localizada para que haja auto-renovação, proliferação, diferenciação e mobilização de células estaminais e nesse sentido o dente tem características únicas de funcionamento que nenhum modelo 2D ou 3D consegue superar (Botelho et al., 2017).

No entanto são necessários mais estudos para perceber se há a possibilidade de preservar o complexo pulpo-dentinário por mais dias de forma a conseguir a preservação deste tipo de tecido no futuro (Botelho et al., 2017).

No presente ano, Nakashima et al. publicaram um estudo clínico piloto, realizado de Maio a Dezembro de 2013, para avaliar a segurança, potencial eficácia e viabilidade do transplante autólogo de DPSC e avaliar a utilidade da terapia com células estaminais num estudo de caso pela primeira vez.

As DPSC foram transplantadas com fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) em atelocolagénio para os dentes pulpectomizados (dentes após remoção da polpa) (Nakashima et al., 2017).

Segundo as diretrizes japonesas de pesquisa com células estaminais, baseado nas considerações éticas, apenas os casos em que a remoção pulpar é inevitável devem ser selecionados para este estudo (Nakashima et al., 2017).

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia, as diretrizes Japonesas de pesquisa com células estaminais, pelos padrões de gestão de fabrico e pelas Boas Práticas de Fabricação (GMP) (Nakashima et al., 2017).

Utilizaram cinco doentes com pulpite irreversível e monitorizaram-nos até 24 semanas após o transplante de DPSC. As DPSC foram isoladas de dentes previamente descartados e amplificadas segundo as GMP. A qualidade das DPSC foi verificada nas passagens 9 ou 10 através de análises de cariótipo (Nakashima et al., 2017).

Para fazer o isolamento e amplificação das DPSC foi utilizado soro autólogo isolado de sangue acabado de colher. Os dentes descartados foram extraídos e cortados longitudinalmente e de seguida colocados numa solução salina de Hank e transportados para uma instalação compatível com as GMP, em menos de 1 hora sob temperatura controlada (0-10°C) (Nakashima et al., 2017).

As células pulpares foram isoladas por digestão enzimática com soro autólogo e induzidas pelo G-CSF. A utilização deste tipo de soro teve o objetivo de evitar uma resposta/reação do sistema imunitário. As DPSC foram separadas antes de atingir 70% de confluência, e por fim criopreservadas (Nakashima et al., 2017).

No que diz respeito ao procedimento cirúrgico, primeiro removeu-se a cárie por completo, e nalguns casos houve a necessidade de se fazer uma parede em resina composta para permitir a retenção do grampo para o isolamento absoluto (Fig.23). De seguida foi removida a polpa dos dentes afetados e foi feita a instrumentação convencional, por fim a irrigação (NaOCL a 6% e H₂O₂ a 3% e mais tarde solução salina). Um cone de papel com minociclina ou levofloxacina 0.5% foi levado até ao ápex antes do transplante celular tal como num tratamento endodôntico normal. De seguida a câmara foi temporariamente preenchida com um cimento hidráulico (Cavition, utilizado devido à necessidade de colocar antibióticos na câmara) e resina composta (Nakashima et al., 2017).

Para o transplante, as DPSC autólogas criopreservadas foram levadas para a bancada do bloco operatório, descongeladas e suspensas numa *scaffold* de atelocolagénio juntamente com o G-CSF. O canal radicular foi secado com cones de papel, após irrigação, e ainda com EDTA a 3%. Metade da suspensão celular é transplantada para o canal radicular com uma cânula. Uma esponja gelatinosa é colocada na entrada do canal sem pressão e a câmara celada com cimento de ionómero de vidro e resina composta. Os dentes foram de seguida cobertos por uma coroa de resina nos doentes 1 e 3 (Fig.23) (Nakashima et al., 2017).

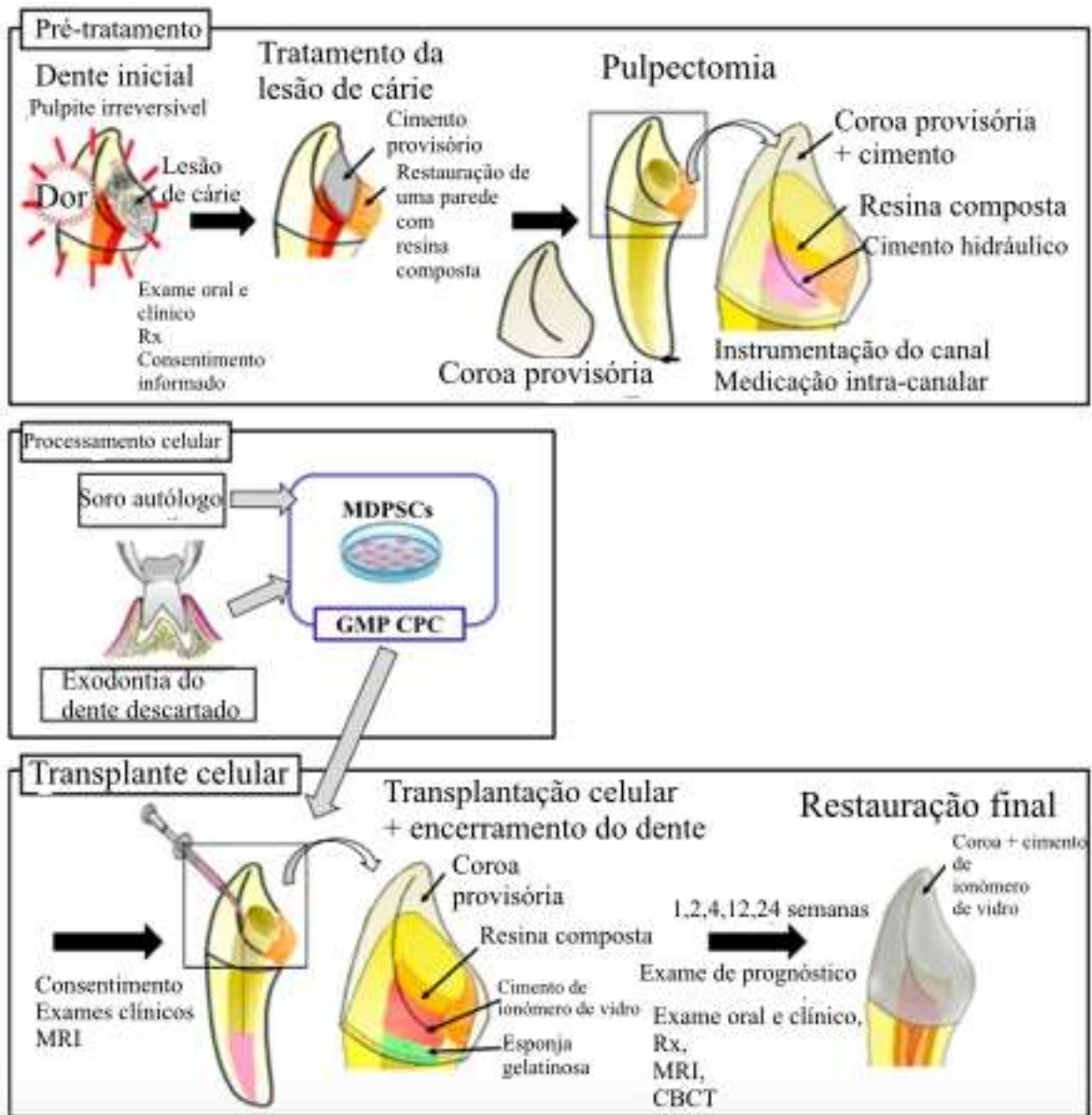


Figura 23 - Sequência passo-a-passo do estudo clínico, incluindo o tratamento de cáries e reconstrução de uma parede com resina composta seguido da pulpectomia, processamento celular e transplantação celular seguida de uma restauração final. (CBCT (cone beam computed tomography), CPC (cell processing center), GMP (good manufacturing practice), MDPSC (mobilized dental pulp stem cell), MRI (magnetic resonance imaging)). Adaptado de: (Nakashima et al., 2017)

Foi feito o *follow up* às 1, 2, 4, 12, 24, 28 e 32 semanas após o transplante de DPSC. Por ser um caso de estudo piloto pela primeira vez em humanos segundo os protocolos japoneses de pesquisa com células estaminais foram feitos testes de urina e sangue em todas as visitas exceto na das 2 semanas. Foram feitos eletrocardiogramas às 4 e 24 semanas bem como

examinações clínicas incluindo testes de percussão para testar a dor e sensibilidade. Fizeram-se também Rx para ver a lesão periapical na primeira visita, na visita antes do transplante, logo após o transplante e 4, 12, 28, 32 semanas (Nakashima et al., 2017).

Para avaliar a eficácia do tratamento foram realizados testes de sensibilidade pulpar como o teste pulpar elétrico (Vitality Scanner), em cada visita por três dentistas. Fizeram também o teste do frio com spray de dicolorofluorometano (Pulper), em cada visita (Nakashima et al., 2017).

Para avaliar a formação de dentina ao longo da parede dentinária às 16 e 28 semanas foi realizado um CBCT (Tomografia computadorizada de feixe cônico). As imagens foram por sua vez analisadas e feitas pelo menos 5 medidas, mediram-se as densidades da polpa dentária, da formação dentinária e dentina existente, a área de baixa densidade foi considerada a área de polpa dentária e assim os volumes da polpa foram também calculados (Nakashima et al., 2017).

Não houve anomalias cromossômicas estruturais significativas no cariótipo das células diploides, contudo houve algumas anomalias nos doentes. Não foram detetados efeitos adversos relacionados com a transplantação celular nas análises de urina, sangue ou eletrocardiograma (Nakashima et al., 2017).

No que diz respeito às imagens radiográficas estas mostraram que não houveram mudanças significativas nas áreas periapicais relacionadas com a terapia celular em 3 doentes (1, 3 e 5) e a lesão periapical foi diminuindo durante as 24 semanas de follow up. No doente 2 houve um ligeiro espessamento do ligamento às 12 semanas e uma pequena radiotransparência pré-operatória, e no doente 4 surgiu uma espessura do ligamento às 12 semanas e uma radiotransparência às 24 e 32 semanas (Fig. 24a) (Nakashima et al., 2017).

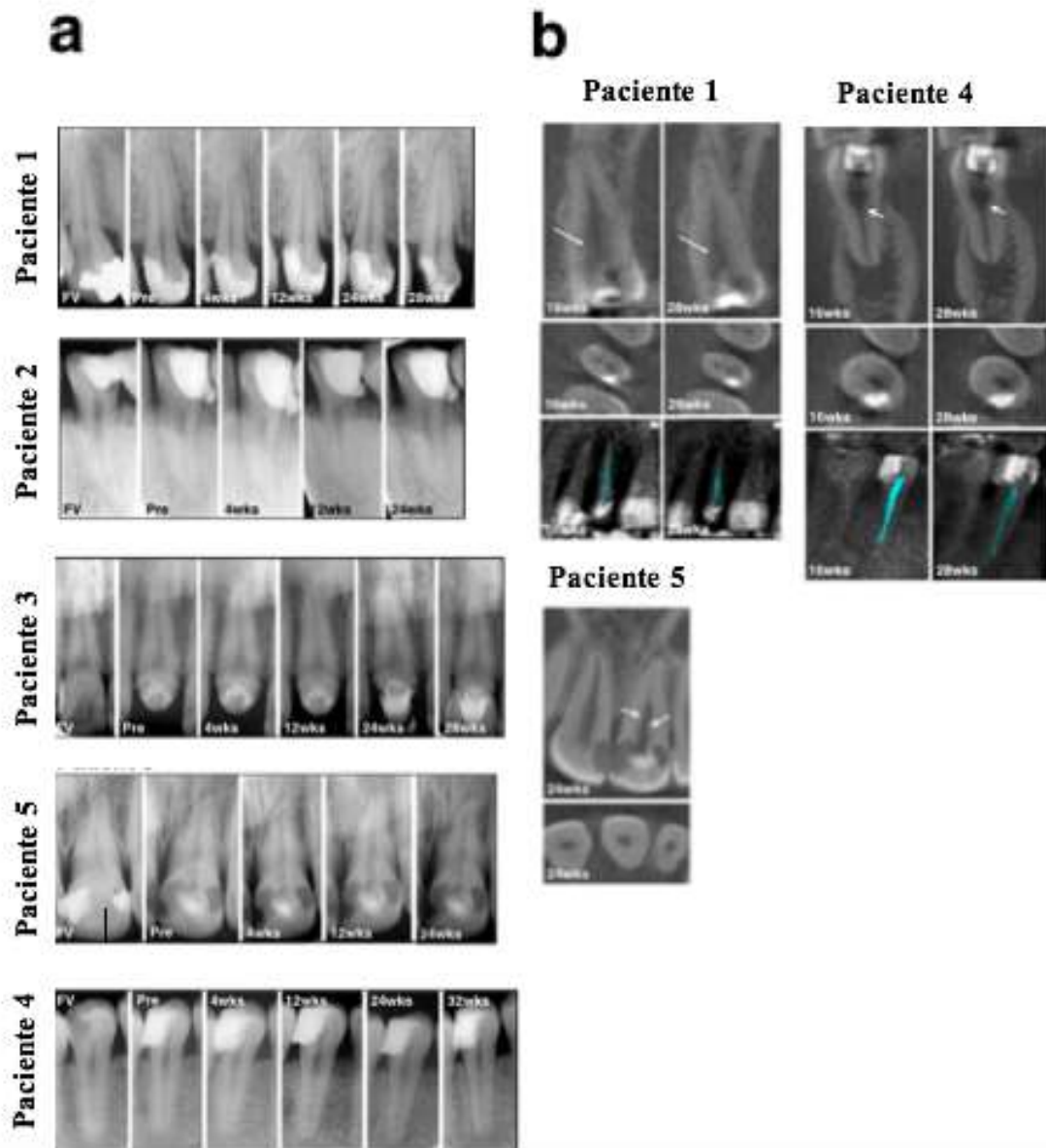


Figura 24- Análises radiográficas. (a) análise fotográfica de Rx que mostra as alterações evoluções dos tecidos periapicais e apicais e/ou formação de dentina lateral no canal radicular na primeira visita (FV), pré-transplantação mesmo antes do transplante celular (Pre), e 4, 12, 24/28 semanas (Wks) após transplantação de DPSC com G-CSF em dentes sem polpa em 5 doentes. (b) avaliação da tomografia computadorizada de feixe de cone (CBCT) para analisar a formação de dentina no canal radicular no terço coronário e axial em três doentes às 16 e 28/32 semanas. As setas indicam formação de nova dentina. As imagens demonstraram também uma diminuição nas áreas de baixa densidade às 28 semanas em comparação com 16 semanas. Adaptado de: (Nakashima et al., 2017)

A análise radiográfica do CBCT revelou que nos doentes 1, 4 e 5, às 28 semanas, apresentavam formação de dentina lateral (Fig. 24b) (Nakashima et al., 2017).

As avaliações clínicas e laboratoriais demonstraram que não houve quaisquer efeitos adversos ou toxicidade, o teste elétrico à polpa às 4 semanas demonstrou uma resposta bastante positiva. A intensidade do sinal da ressonância magnética (MRI) às 24 semanas foi idêntico ao de um dente com polpa normal do grupo de controlo. Finalmente a tomografia computadorizada demonstrou a formação de dentina funcional em três dos cinco doentes (Nakashima et al., 2017).

Os testes de vitalidade pulpar dão uma informação preciosa especialmente se juntarmos o teste elétrico com o teste do frio. A resposta negativa ao teste elétrico antes do transplante celular mudou para positiva passadas 4 semanas em quatro dos casos (doentes 1,3,4 e 5) o que indica que houve revascularização no tecido pulpar regenerado (Nakashima et al., 2017).

O teste elétrico demonstrou uma resposta negativa no doente 2 após 24 horas de follow up, pensa-se que seja por já haver uma radiotransparência periapical na altura do transplante, apesar de ter havido resposta positiva na primeira visita do doente (Nakashima et al., 2017).

Este estudo demonstrou resposta positiva aos testes de vitalidade pulpar para polpa normal no canal, indicando que tecido regenerado pode transmitir sinais sensoriais e recuperar o sistema vascular. A formação de dentina lateral foi vantajosa para prevenir a fratura dentária, no entanto a formação excessiva de dentina no meio do tecido regenerado poderá ser um problema e levar a menos vascularização do dente e fragilidade (Nakashima et al., 2017).

Com este estudo os investigadores mostraram que é seguro o transplante das DPSC em dentes onde a polpa foi removida. A eficácia dos componentes utilizados para a terapia regenerativa neste caso (DPSC+G-SCF) foi também comprovada pelo teste elétrico, ressonância magnética e CBCT. Com este estudo os investigadores concluíram que as DPSC são seguras e eficazes para a regeneração pulpar em humanos neste caso de estudo piloto (Nakashima et al., 2017).

Nakashima et al. referem, no entanto que são necessários testes clínicos com uma amostra maior antes da endodontia regenerativa com células estaminais da polpa dentária se tornar uma realidade (Nakashima et al., 2017).

2.8. Perspetivas futuras

É atualmente aceite que os tecidos dentários alojam células estaminais em nichos que têm a capacidade de se auto-renovarem e diferenciarem, é necessário que se desenvolvam técnicas para isolar e caracterizar as células estaminais bem como manipular o seu crescimento sob condições específicas *in vitro* que devem ser estabelecidas e otimizadas antes da terapia celular em si (Saber, 2009).

Ainda há muita pesquisa a fazer no que diz respeito à engenharia tecidual, grande parte dessa pesquisa relacionada com a biologia celular tal como o controlo da diferenciação e do crescimento celular, como por exemplo os componentes da matriz extracelular que afetam a função celular. Os conhecimentos de genética molecular e de imunologia vão contribuir para a produção de células ou sistemas de transplante celular que não sejam rejeitadas pelo sistema imunitário (Langer & Vacanti, 1993).

Outro fator importante é a fonte celular, estas podem vir do próprio organismo, de outros dadores da mesma espécie, organismos de outra espécie ou tecido embrionário. Após a escolha da fonte há que tentar equilibrar a ética, a segurança e a eficácia (Langer & Vacanti, 1993).

A criopreservação para preservação das células tem sido utilizada eficazmente para alguns tipos de células mas há necessidade de evoluir de forma a que se possam criar bancos de células para diferentes tipos de tecidos (Langer & Vacanti, 1993).

Outro fator em estudo são os materiais necessários para a engenharia tecidual, os materiais de origem natural têm vantagens pois contêm informação, como sequências de aminoácidos específicas, que facilitam a ligação celular ou a gestão do processo de diferenciação. Já os polímeros sintéticos permitem um controlo preciso sobre o peso molecular, propriedades

hidrofóbicas e tempo de degradação, no entanto podem não interferir com as células como se pretendia (Langer & Vacanti, 1993).

Atualmente há matérias bioespecíficos e biomiméticos que conseguem ambientes bioinertes ricos em ligandos para os recetores de adesão, curtas cadeias de aminoácidos (Arg-Gly-Asp) ou carboidratos e/ou partes funcionais de hormonas, enzimas e fatores de crescimento, estes materiais estão a ser exaustivamente estudados para esse fim (Vladkova, 2010).

Ser um material bioinerte significa que consegue não causar reações indesejáveis (por exemplo reações inflamatórias), quando em contacto com matéria viva (sangue, tecidos, células), dentro ou fora do corpo humano (Vladkova, 2010).

A engenharia de tecidos baseia-se na colocação de células num substrato seguido da sua cultura num reator biológico ou no próprio organismo. Este substrato, normalmente um polímero de biomaterial, deverá estimular não só a adesão e diferenciação celular como também a formação de matriz extracelular e regeneração celular (Vladkova, 2010).

É importante que haja uma exploração dos sistemas que controlam a libertação de moléculas em longos períodos de tempo uma vez que se tornam importantes para a administração de fatores de indução tecidual, fatores de crescimento e estimuladores da angiogénese (Langer & Vacanti, 1993).

As células estaminais são utilizadas há mais de 40 anos na medicina, têm utilizações em doenças como a leucemia e linfomas. A comunidade científica prevê que nos próximos anos se poderão utilizar células estaminais em doenças como diabetes, Parkinson, cancro, insuficiência cardíaca e até perturbações neurológicas. Para que isto seja possível é preciso saber mais acerca da biologia das células estaminais, os seus mecanismos até que a sua utilização seja uma prática clínica comum (Correia & Bragança, 2010).

2.8.1. Principais dificuldades

Se juntarmos *Scaffolds*, fatores de crescimento e células estaminais conseguimos formar tecido, no entanto o seu comportamento funcional normal ainda não foi totalmente conseguido o que indica que há fatores que estão a ser deixados de parte (Marí-Beffa et al.,

2017). Os passos críticos da regeneração pulpar continuam a ser a morfogênese do tecido pulpar juntamente com a angiogênese e neurogênese (Iohara et al., 2011).

Durante a investigação para as terapêuticas regenerativas foi dada especial atenção ao isolamento das células estaminais bem como às *scaffolds*, podendo indicar que talvez o problema esteja nos microambientes dentários, estes podem possivelmente estar a ser reconstruídos apenas parcialmente (Marí-Beffa et al., 2017).

Ainda são necessários inúmeros estudos sistemáticos com células estaminais, morfogênese, *scaffolds*, e desinfecção eficaz. Isto irá revolucionar o futuro da endodontia com os avanços na via de sinalização responsáveis pela morfogênese, e linhagem de células estaminais por exemplo com BMPs e *scaffolds* sintéticas (Nakashima & Akamine, 2005).

Os fatores que induzem a mineralização no tecido regenerado, incluindo os tipos celulares transplantados, *scaffold* e microambiente, precisam de continuar a ser estudados para impedir a formação excessiva de dentina no canal radicular. Esta dentina tem um papel crucial na homeostase da polpa e mecanismos de defesa incluindo a pressão sanguínea, extravasamento de células imunitárias, e regeneração dentinária (Nakashima et al., 2017).

Um obstáculo crítico que ainda é necessário ultrapassar é o controlo da infeção durante o tratamento canal por irrigantes e medicamentos intra-canais e após o transplante celular pela *scaffold* antimicrobiana, por exemplo a pasta de hidróxido de cálcio, amplamente utilizada no tratamento endodôntico tradicional, pode inibir a regeneração pulpar se se mantiver no canal radicular (Nakashima et al., 2017).

Outro obstáculo a ultrapassar é a formação de dentina para cobrir a polpa regenerada, prevenindo assim a microinfiltração (Nakashima et al., 2017).

Um fator limitante é que as células estaminais existem em relativa pouca quantidade nos tecidos adultos o que se torna preocupante para a pesquisa atual com células estaminais atrasando o desenvolvimento de novas terapias, a alternativa seriam amostras maiores o que por sua vez poderia comprometer o dador (Murray et al., 2007).

3. CONCLUSÃO

A regeneração tecidual é uma terapia que mimetiza os eventos que ocorrem no desenvolvimento e morfogénese embriológicos e ambos são igualmente regulados por genes e proteínas específicos, altamente selecionados. O objetivo final é formar um novo tecido que se relacione com o organismo tal como o tecido original. No caso da endodontia regenerativa a regeneração de tecidos aplica-se à polpa dentária com o objetivo de tornar o dente funcional de novo e com uma vida prolongada.

Durante anos fizeram-se estudos que provaram que, de alguma forma, este procedimento seria possível se juntássemos a tríade: células estaminais, *scaffold* e fatores de crescimento. Cada um destes tem sido exaustivamente estudado em particular, mas poucas vezes em simultâneo. Devido a questões legais e éticas foi difícil conseguir realizar este tipo de experiências em humanos coisa que só nos últimos anos começa a ser possível.

Atualmente há alguns problemas a salientar, nomeadamente a viabilidade do tratamento, a taxa de eficácia em comparação com o custo, e na parte prática existe a procura da *scaffold* ideal já que um dos problemas é conseguir a morfogénese pulpar perfeita.

A endodontia regenerativa com células estaminais tem sido um campo em que poucos se arriscam a entrar, mas ao mesmo tempo tem vindo a evoluir principalmente nos últimos anos com as técnicas de revascularização pulpar. Hoje em dia a endodontia convencional continua a ser o tratamento de eleição, havendo, no entanto, a necessidade de arranjar uma alternativa conservadora que permita manter os dentes na arcada dentária, vitais, por mais tempo.

É teoricamente possível produzir polpa vital normal *in vivo* a partir de células estaminais assim como se faz atualmente em muitos outros tecidos para curar doenças incuráveis noutros ramos da medicina, e com estudos piloto em humanos conseguimos perceber que a teoria se torna prática, e que de facto, é possível.

É de salientar que há muito ainda por descobrir e levará algum tempo para passar do laboratório à prática clínica, no entanto resta-nos contribuir para este tipo de investigação e aguardar que tal como todas as outras coisas exequíveis esta seja uma delas. É importante que as técnicas sejam bem definidas e facilmente aplicadas e os protocolos bem avaliados.

Com este trabalho podemos concluir que ainda que possa parecer um mito a endodontia regenerativa é cada vez mais uma realidade, e aos poucos aproximamo-nos de um futuro em que esta será a alternativa ideal à desvitalização dentária.

4. BIBLIOGRAFIA

- Aghaloo, T. L., Chaichanasakul, T., Bezouglaia, O., Kang, B., Franco, R., Dry, S. M., ... Tetradis, S. (2010). Osteogenic potential of mandibular vs. long-bone marrow stromal cells. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1293–1298. <https://doi.org/10.1177/0022034510378427>
- Akintoye, S. O., Lam, T., Shi, S., Brahim, J., Collins, M. T., & Robey, P. G. (2006). Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*, 38(6), 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.10.027>
- Arana-Chavez, V. E., & Massa, L. F. (2004). Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8), 1367–1373. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.006>
- Bai, Y., Bai, Y., Matsuzaka, K., Hashimoto, S., Kokubu, E., Wang, X., & Inoue, T. (2010). Formation of bone-like tissue by dental follicle cells co-cultured with dental papilla cells. *Cell and Tissue Research*, 342(2), 221–231. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1046-9>
- Bluteau, G., Luder, H. U., De Bari, C., & Mitsiadis, T. A. (2008). Stem cell for tooth engineering. *European Cells and Materials*, 16, 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(05\)00103-4](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(05)00103-4)
- Botelho, J., Cavacas, M. A., Borrecho, G., Polido, M., Oliveira, P., & Martins Dos Santos, J. (2017). Human ex vivo dentin-pulp complex preservation in a full crown model. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 7(1), 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.12.002>
- Bragança, J., Tavares, Á., & Belo, J. A. (2010). Células estaminais e medicina regenerativa: um admirável mundo novo. *canalBQ*, 4–17.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>

- Cavalcanti, B. N., Zeitlin, B. D., Nör, J. E., Dentistry, R., Paulo, S., & José, S. (2012). A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dental Materials*, 29(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.08.002>
- Correia, R., & Bragança, J. (2010). Células estaminais adultas em medicina. *Canal BQ nº7 - Revista Da Sociedade Portuguesa de Biquímica*, 18–23.
- Devillard, R., Rémy, M., Kalisky, J., Bourget, J. M., Kérourédan, O., Siadous, R., ... Fricain, J. C. (2015). In vitro assessment of a collagen/alginate composite scaffold for regenerative endodontics. *International Endodontic Journal*, 50(1), 48–57. <https://doi.org/10.1111/iej.12591>
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I., & Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*, 56(3), 151–165. <https://doi.org/10.1016/j.jpor.2012.06.001>
- Femiano, F., Femiano, L., Festa, V. M., Rullo, R., & Perillo, L. (2014). Reactionary and reparative dentinogenesis a review. *International Journal of Dental Clinics*, 6(4), 17–19.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and invivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Huang, G. T.-J., Sonoyama, W., Chen, J., & Park, S. H. (2006). In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell and Tissue Research*, 324(2), 225–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>
- Hyun, I. (2010). Review series the bioethics of stem cell research and therapy. *Journal of Clinical Investigation*, 120(1), 71–75. <https://doi.org/10.1172/JCI40435.no>
- Ikeda, E., Yagi, K., Kojima, M., Yagyuu, T., Ohshima, A., Sobajima, S., ... Ohgushi, H. (2008). Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, 76(5), 495–505. <https://doi.org/10.1111/j.1432->

0436.2007.00245.x

- Iohara, K., Imabayashi, K., Ishizaka, R., Watanabe, A., Nabekura, J., Ito, M., ... Nakashima, M. (2011). Complete pulp regeneration after pulpectomy by transplantation of CD105 + stem cells with stromal cell-derived factor-1. *Tissue Engineering Part A*, 17(15–16), 1911–1920. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0615>
- Ishii, M., Koike, C., Igarashi, A., Yamanaka, K., Pan, H., Higashi, Y., ... Kato, Y. (2005). Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1), 297–303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.118>
- Jensen, J. B., & Parmar, M. (2006). Strengths and limitations of the neurosphere culture system. *Molecular Neurobiology*, 34(3), 153–162. <https://doi.org/10.1385/MN:34:3:153>
- Kim, S. G. (2017). Biological molecules for the regeneration of the pulp-dentin complex. *Dental Clinics of North America*, 61(1), 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.08.005>
- Kinney, J. ., Balooch, M., Marshall, G. ., & Marshall, S. . (1999). A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. *Archives of Oral Biology*, 44(10), 813–822. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(99\)00080-1](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(99)00080-1)
- Kretzschmar, M., Doody, J., & Massagué, J. (1997). Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*, 389(6651), 618–22. <https://doi.org/10.1038/39348>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). *Tissue engineering*. (N. Pallua & C. V. Suscheck, Eds.), *Science* (Vol. 260). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02824-3>
- Lin, Z.-M., Qin, W., Zhang, N.-H., Xiao, L., & Ling, J.-Q. (2007). Adenovirus-mediated recombinant human bone morphogenetic protein-7 expression promotes differentiation of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 33(8), 930–5.

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.03.010>

- Lovschall, H., Fejerskov, O., & Flyvbjerg, A. (2001). Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Advances in Dental Research*, *15*, 108–112. <https://doi.org/10.1177/08959374010150010301>
- Ma, Z., Kotaki, M., Inai, R., & Ramakrishna, S. (2005). Potential of nanofiber matrix as tissue-engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, *11*(1–2), 101–109. <https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.101>
- Mao, J. J., Kim, S. G., Zhou, J., Ye, L., Cho, S., Suzuki, T., ... Zhou, X. (2012). Regenerative endodontics. Barriers and strategies for clinical translation. *Dental Clinics of North America*, *56*(3), 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.005>
- Marí-Beffa, M., Segura-Egea, J. J., & Díaz-Cuenca, A. (2017). Regenerative endodontic procedures: a perspective from stem cell niche biology. *Journal of Endodontics*, *43*(1), 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.011>
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(10), 5807–5812. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>
- Morsczeck, C., Moehl, C., W.Gotz, Heredia, A., Schaffer, T. E., Eckstein, N., ... Hoffmann, K. H. (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biology International*, *29*(7), 567–575. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.03.020>
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, *33*(4), 377–390. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>
- Nakashima, M., & Akamine, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of Endodontics*, *31*(10), 711–718. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000164138.49923.e5>

- Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Ariji, Y., & Matsushita, K. (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 61. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0506-5>
- Ostby, B. N. (1961). The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontologica Scandinavica*, 19, 324–353. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14482575>
- Pashley, D. H. (1996). Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 7(2), 104–133.
- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Saber, S. E. M. (2009). Tissue engineering in endodontics key elements for tissue engineering. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 51(4), 495–507.
- Schmalz, G., & Goldberg, M. (2011). Toward a strategic plan for pulp healing: From repair to regeneration. *Clinical Oral Investigations*, 15(1), 1–2. <https://doi.org/10.1007/s00784-010-0503-x>
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Mark Bartold, P., Batouli, S., Brahimi, J., ... Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*, 364(9429), 149–155. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16627-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16627-0)
- Sharma, L. A., Sharma, A., & Dias, G. J. (2015). Advances in regeneration of dental pulp – a literature review. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, 6(2), 85–98. <https://doi.org/10.1111/jicd.12064>
- Simon, S., & Smith, A. J. (2014). Regenerative endodontics. *British Dental Journal*, 216(6), 1–4. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.243>
- Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Bègue-kirn, C., Ruch, J.-V., & Lesot, H. (2003).

- Reactionary dentinogenesis. *Internationa Journal of Developmental Biology*, 39(1), 273–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2005.01585.x>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., ... Wang, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *Plos One*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34(2), 166–171. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- Suchánek, J., Browne, K. Z., Kleplová, T. S., & Mazurová, Y. (2016). *Protocols for dental-related stem cells isolation, amplification and differentiation*. (B. Zavan & E. Bressan, Eds.). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-33299-4>
- Tarle, S. A., Shi, S., & Kaigler, D. (2011). Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 66–73. <https://doi.org/10.1002/jcp.22304>
- Tomson, P., Berdal, A., & Stéphane, S. (2014). Regenerative endodontics : regeneration or repair? *American Association of Endodontics*, 40(4), 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.024>
- Trubiani, O., Orsini, G., Zini, N., Di Iorio, D., Piccirilli, M., Piattelli, A., & Caputi, S. (2008). Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 87(4), 986–993. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31837>
- Trubiani O, Di Primio R, Traini T, et al. (2005). Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18(2), 213–21.
- Vladkova, T. G. (2010). Review article surface engineered polymeric biomaterials with

- improved biocontact properties. *International Journal of Polymer Science*, 1–22. <https://doi.org/10.1155/2010/296094>
- Wang, L., Shen, H., Zheng, W., Tang, L., Yang, Z., Gao, Y., ... Jin, Y. (2011). Characterization of stem cells from alveolar periodontal ligament. *Tissue Engineering Part A*, 17(7–8), 1015–1026. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0140>
- Zeichner-David, M., Oishi, K., Su, Z., Zakartchenko, V., Chen, L. S., Arzate, H., & Bringas, P. (2003). Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Developmental Dynamics*, 228(4), 651–663. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10404>
- Zeng, Q., Nguyen, S., Zhang, H., Chebrolu, H. P., Alzebdeh, D., Badi, M. A., ... Yang, M. (2016). Release of growth factors into root canal by irrigations in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 42(12), 1760–1766. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.04.029>
- Zhang, Q., Shi, S., Liu, Y., Uyanne, J., Shi, Y., Shi, S., & Le, A. D. (2009). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 183(12), 7787–7798. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902318>