

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

OS EFEITOS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA NA TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA

Trabalho submetido por
Cassandra Anna Alice Eveno
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

junho de 2025

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

OS EFEITOS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DA POLPA DENTÁRIA NA TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA

Trabalho submetido por
Cassandra Anna Alice Eveno
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Evguenia Pavlovna Bekman Gaspar

e coorientado por
Professor Doutor João Albernaz Neves

junho de 2025

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Evguenia Pavlovna Bekman Gaspar, pela confiança, disponibilidade e orientação cuidadosa em todas as etapas deste trabalho. Obrigada pela sua benevolência.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João Albernaz Neves, por ter sido um professor dedicado e inspirador em clínica, sempre disponível para ajudar. Obrigada pelo seu apoio precioso.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por todas as maravilhosas oportunidades que me proporcionou, uma academia belíssima.

Aos meus pais, por todo o amor e apoio que me deram, agradeço do fundo do coração. Amo-vos imenso.

Ao meu irmão, pela sua cumplicidade, os seus risos e a sua força tranquila, obrigada por estares sempre presente.

Aos meus amigos, com quem tanto vivi e partilhei, um enorme obrigada por toda a alegria, o carinho e o amor que tornaram estes anos inesquecíveis.

À minha família, que sempre me incentivou a perseguir os meus sonhos.

E a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, nesta maravilhosa aventura, uma grande obrigada.

RESUMO

As cáries dentárias provocam lesões na estrutura dentária e, em casos graves, podem levar à necrose da polpa. Tradicionalmente, o tratamento envolve a remoção do tecido pulpar, resultando na perda da vitalidade do dente, o que o torna mais frágil. Mesmo que o tratamento seja bem-sucedido, a perda da vitalidade pulpar compromete a sensibilidade e a função imunológica do dente, reduzindo a resistência a estímulos externos e enfraquecendo-o estruturalmente. No entanto, a polpa dentária possui uma elevada capacidade de regeneração funcional, sendo fundamental para a manutenção e reparação do tecido periodontal em resposta a diferentes tipos de danos. A sua preservação é, portanto, de grande importância.

Diversas pesquisas têm apresentado novas alternativas aos tratamentos endodônticos convencionais. A terapia endodôntica regenerativa é considerada uma dessas alternativas, especialmente para dentes jovens com raízes imaturas e ápice aberto, que representam desafios devido à sua fragilidade. Esta terapia baseia-se numa abordagem biológica que visa substituir o complexo polpa-dentina danificado por um novo tecido vital.

O potencial clínico das células estaminais na regeneração do tecido pulpar danificado é atualmente o foco de numerosos estudos. As células estaminais apresentam várias características promissoras, como o seu potencial diferenciativo, elevada taxa de proliferação e propriedades imunossupressoras, que as tornam uma solução viável para terapias de regeneração pulpar. Recentemente, foram realizados progressos significativos na regeneração pulpar através da engenharia de tecidos, combinando células estaminais, biomateriais e fatores de crescimento, abrindo novas perspectivas quanto ao sucesso deste tratamento. O objetivo desta revisão narrativa é explorar em profundidade o uso das células estaminais derivadas da polpa dentária e os seus efeitos na terapia de regeneração dos tecidos pulpare.

Palavras-chave: “células estaminais”; “polpa dentária”; “endodontia regenerativa”; “engenharia tecidular”.

ABSTRACT

Dental caries cause lesions in the tooth structure and, in severe cases, can lead to pulp necrosis. Traditionally, treatment involves the removal of the pulp tissue, resulting in the loss of tooth vitality, which makes the tooth more fragile. Even when the treatment is successful, the loss of pulp vitality compromises the tooth's sensitivity and immune function, reducing its resistance to external stimuli and weakening it structurally. However, dental pulp has a high capacity for functional regeneration and is essential for the maintenance and repair of periodontal tissue in response to different types of damage. Its preservation is therefore of great importance.

Various studies have presented new alternatives to conventional endodontic treatments. Regenerative endodontic therapy is considered one such alternative, especially for young teeth with immature roots and open apices, which pose challenges due to their fragility. This therapy is based on a biological approach that aims to replace the damaged pulp-dentin complex with new vital tissue.

The clinical potential of stem cells in the regeneration of damaged pulp tissue is currently the focus of numerous studies. Stem cells have several promising characteristics, such as their differentiation potential, high proliferation rate, and immunosuppressive properties, which make them a viable solution for pulp regeneration therapies. Recently, significant progress has been made in pulp regeneration through tissue engineering, combining stem cells, biomaterials, and growth factors, opening new perspectives for the success of this treatment. The aim of this narrative review is to explore in depth the use of stem cells derived from dental pulp and their effects on the regeneration therapy of pulp tissues.

Keywords: “stem cells”; “dental pulp”; “regenerative endodontics”; “tissue engineering”.

RESUMÉ

Les caries dentaires provoquent des lésions au niveau de la structure dentaire et, dans les cas graves, peuvent entraîner une nécrose pulpaire. Traditionnellement, le traitement consiste en l'ablation du tissu pulpaire, ce qui entraîne la perte de la vitalité de la dent et la rend plus fragile. Même lorsque le traitement est un succès, la perte de vitalité pulpaire compromet la sensibilité et la fonction immunitaire de la dent, réduisant sa résistance aux stimuli externes et fragilisant sa structure. Cependant, la pulpe dentaire possède une grande capacité de régénération fonctionnelle et joue un rôle essentiel dans le maintien et la réparation du tissu parodontal en réponse à différents types de dommages. Sa préservation est donc d'une grande importance.

Diverses études ont présenté de nouvelles alternatives aux traitements endodontiques conventionnels. La thérapie endodontique régénérative est considérée comme l'une de ces alternatives, notamment pour les dents jeunes présentant des racines immatures et des apex ouverts, qui posent des défis en raison de leur fragilité. Cette thérapie repose sur une approche biologique visant à remplacer le complexe pulpo-dentinaire endommagé par un nouveau tissu vital.

Le potentiel clinique des cellules souches dans la régénération du tissu pulpaire endommagé fait actuellement l'objet de nombreuses études. Les cellules souches présentent plusieurs caractéristiques prometteuses, telles que leur potentiel de différenciation, leur taux de prolifération élevé et leurs propriétés immunosuppressives, ce qui en fait une solution viable pour les thérapies de régénération pulpaire. Récemment, des progrès significatifs ont été réalisés dans la régénération pulpaire grâce au génie tissulaire, combinant cellules souches, biomatériaux et facteurs de croissance, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour le succès de ce traitement. Le but de cette revue narrative est d'explorer en profondeur l'utilisation des cellules souches dérivées de la pulpe dentaire et leurs effets sur la thérapie de régénération des tissus pulpaire.

Mots-clés : “cellules souches” ; “pulpe dentaire” ; “endodontie régénérative” ; “ingénierie tissulaire”.

ÍNDICE GERAL

I- INTRODUÇÃO	13
1. As lesões pulpares: cáries profundas e lesões periapicais	13
2. Terapias endodônticas convencionais e os seus limites	15
3. Rumo a uma regeneração pulpar: potencial das células estaminais dentárias....	17
II- DESENVOLVIMENTO.....	19
1. Mecanismos biológicos da regeneração pulpar	19
1.1. Estrutura e funções da polpa dentária.....	19
1.1.1. Vascularização pulpar	19
1.1.2. Inervação e papel sensorial.....	20
1.1.3. Organização histológica	20
1.1.4. Composição celular	21
1.1.5. Função imunitária e vigilância tecidual	21
1.2. Histologia da formação dos tecidos pulpares	22
1.2.1. Origem embrionária e sinalização do desenvolvimento.....	22
1.2.2. Os estádios do desenvolvimento.	22
1.2.3. Vascularização, inervação e diferenciação odontoblástica.....	23
1.2.4. Complexo dentina-polpa.	24
1.2.5. Origem das células estaminais pulpares	24
1.3. Os desafios da regeneração vascular e nervosa	25
1.3.1. Revascularização pulpar	25
1.3.2. Reinervação pulpar	26
1.4. Resposta imunitária e papel na cicatrização ou falha regenerativa	26
1.4.1. Detecção de patógenos e ativação da imunidade inata.....	26
1.4.2. Cascata inflamatória e papel das células imunitárias	27
1.4.3. Ligação entre inflamação e cicatrização.....	27
1.4.4. Riscos e falência regenerativa	28
2. Regeneração endodôntica	29
2.1. Princípio da engenharia de tecidos	30
2.2. As células estaminais.....	30
2.2.1. Tipos de células estaminais dentárias.....	32
2.2.1.1. Células estaminais do ligamento periodontal	34
2.2.1.2. Células estaminais da papila apical	34
2.2.1.3. Células estaminais do folículo dentário.....	35
2.2.1.4. Células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos	35
2.2.1.5. Células estaminais da polpa dentária.....	36

2.2.2.	Características das DPSC	37
2.2.2.1.	Localização e identificação	37
2.2.2.2.	Características biológicas	38
2.2.2.3.	Vantagens específicas das DPSCs.....	38
2.2.2.4.	Fatores de crescimento e capacidade de diferenciação	40
2.3.	“Scaffold”	41
2.4.	Fatores de crescimento	42
3.	Engenharia tecidual aplicada à endodontia	43
3.1.	Papel das células estaminais da polpa	43
3.2.	Biomateriais e suportes estruturais	43
3.2.1.	PRP e PRF	44
3.3.	Factores de crescimento e ambiente regenerativo	45
3.3.1.	BMP.....	46
3.3.2.	FGF.....	46
3.3.3.	VEGF.....	47
3.3.4.	PDGF.....	47
3.3.5.	NGF e BDNF.....	47
3.3.6.	TGF- β	48
3.4.	Uma regeneração vasculo-nervosa integrada.	48
3.5.	Estratégias emergentes e inovações técnicas.....	49
3.5.1.	Abordagem “Cell-free”.....	51
3.5.2.	Abordagem “Cell-Based”	52
3.6.	Obstáculos actuais e perspectivas clínicas.....	53
3.6.1.	Limitações clínicas e biológicas	53
3.6.2.	Desinfecção e toxicidade	54
3.6.3.	Protocolos actuais.....	54
3.6.4.	Perspectivas futuras	55
III-	CONCLUSÃO.....	57

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1 Diagrama de uma secção de um molar humano adulto.	13
Figura 2 Esquema do conceito atual de terapia pulpar.	16
Figura 3 O processo de desenvolvimento dentário.....	23
Figura 4 Diagrama esquemático das diferentes fontes de onde podem ser isoladas células estaminais dentárias.	33

LISTA DE SIGLAS

ESE - European Society of Endodontology / Sociedade Europeia de Endodontologia
RCT - Root Canal Treatment / Tratamento Endodôntico
MTA - Mineral Trioxide Aggregate / Agregado Trióxido Mineral
VPT - Vital Pulp Therapy / Terapia Pulpar Vital
REP - Regenerative Endodontic Procedure / Procedimento Endodôntico Regenerativo
DPSC - Dental Pulp Stem Cells / Células Estaminais da Polpa Dentária
VEGF - Vascular endothelial growth factor / Fator de Crescimento Endotelial Vascular
FGF-2 - Fibroblast growth factor 2 / Fator de Crescimento dos Fibroblastos 2
PDGF - Platelet-derived growth factor / Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PAMP - Pathogen Associated Molecular Pattern / Padrão Molecular Associado a Patogénio
PRR - Pattern Recognition Receptors / Recetores de Reconhecimento de Padrões
TLR - Toll-like receptor / Recetor do Tipo Toll
NLR - Nod-like receptors / Recetores do Tipo Nod
NET - Neutrophils Extracellular Traps / Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
LPS – Lipopolysaccharide / Lipopolissacarídeo
DAMP - Damage Associated Molecular Pattern / Padrão Molecular Associado a Dano
AAE - American Association of Endodontists / Associação Americana de Endodontistas
SC - Stem Cell / Célula Estaminal
ESC - Embryonic Stem Cell / Célula Estaminal Embrionária
ASC - Adult Stem Cell / Célula Estaminal Adulta
MSC - Mesenchymal Stem Cell / Célula Estaminal Mesenquimatosa
DSC - Dental Stem Cell / Célula Estaminal Dentária
SHED - Stem Cell from Human Exfoliated Deciduous teeth / Célula Estaminal de Dente Decíduo Exfoliado Humano
SCAP - Stem Cell from Apical Papilla / Célula Estaminal de Papila Apical
PDLSC - Periodontal Ligament Stem Cell / Célula Estaminal do Ligamento Periodontal
DFPC- Dental Follicle Progenitor Cell / Célula Progenitora do Folículo Dentário
GFSC - Gingival Fibroblast Stem Cell / Célula Estaminal de Fibroblasto gengival
GFAP - Glial fibrillary acidic protein / Proteína Ácida Fibrilar Glial
NeuN - Neuronal Nuclei / Núcleo Neuronal
MHC - Major histocompatibility complex / Complexo Principal de Histocompatibilidade

PGE2 - Prostaglandin E2 / Prostaglandina E2

IDO – Indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme / Enzima Indoleamina 2,3-dioxigenase

TGF- β - Transforming growth factor beta / Fator de Crescimento Transformador Beta

MCP-1 - Monocyte Chemoattractant Protein-1 / Proteína Quimioatrativa de Monócitos-1

EDN1 - Endothelin 1 / Endotelina 1

HUVEC - Human umbilical vein endothelial cell / Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana

BDNF - Brain-derived Neurotrophic Factor / Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

NGF - Nerve Growth Factor / Fator de Crescimento Nervoso

ECM - Extracellular Matrix / Matriz Extracelular

dECM - Demineralized extracellular matrix / Matriz Extracelular Desmineralizada

TDM - Treated Dentin Matrix / Matriz de Dentina Tratada

PLGA - Poly Lactic-co-Glycolic Acid / Ácido Polilático-co-Glicólico

PCL – Polycaprolactone / Policaprolactona

PRP - Platelet-rich Plasma / Plasma Rico em Plaquetas

PRF- Platelet-rich Fibrin / Fibrina Rica em Plaquetas

IGF-1 - Insulin-like Growth Factor 1 / Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1

BMP - Bone Morphogenetic protein / Proteína Morfogenética Óssea

FGF - Fibroblast Growth Factor / Fator de Crescimento dos Fibroblastos

CF-RET - Cells-Free Regenerative Endodontic Therapy / Terapia Endodôntica Regenerativa Sem Células

CB-RET - Cells-Based Regenerative Endodontic Therapy / Terapia Endodôntica Regenerativa Baseada em Células

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid / Ácido Etilenodiamino tetra-acético

I- INTRODUÇÃO

1. As lesões pulpares: cáries profundas e lesões periapicais

A polpa dentária é um tecido conjuntivo altamente especializado, situada no centro do dente, que desempenha um papel essencial na vitalidade do dente, assegurando a inervação, vascularização e a defesa imunitária dos tecidos dentários (Ghannam et al., 2023). Num dente saudável, existe uma camada protetora de esmalte que impede a invasão de microrganismos através da dentina e até à polpa (Galler et al., 2021). A **figura 1** mostra a localização da polpa dentária no interior de um molar humano.

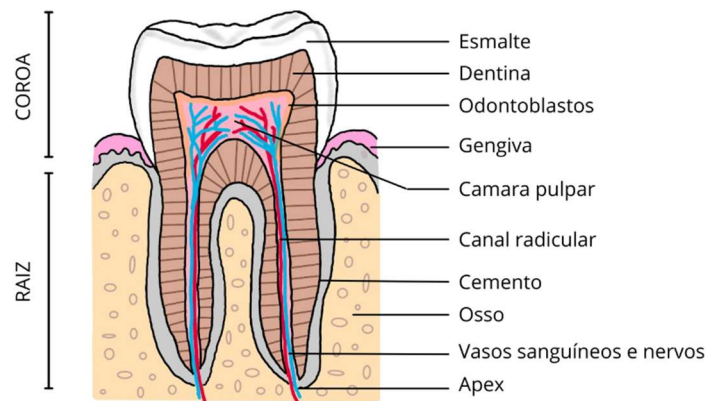


Figura 1 Diagrama de uma secção de um molar humano adulto.

O esmalte e a dentina envolvem a polpa dentária, a qual é predominantemente constituída por fibroblastos e contém a vascularização e a inervação responsáveis pela nutrição e sensibilidade do dente (adaptado de Sharpe, 2016).

A cárie dentária é uma doença induzida por um biofilme microbiano, alimentado por uma ingestão de hidratos de carbono fermentáveis, que produz metabólitos ácidos capazes de se disseminar através do esmalte e da dentina, iniciando respostas imunitárias pulpares mesmo antes de as bactérias atingirem a câmara pulpar (Duncan et al., 2019; Pohl et al., 2024). Estes produtos bacterianos ativam mecanismos inflamatórios locais que podem evoluir para uma pulpíte (Galler et al., 2021).

A inflamação pulpar pode apresentar-se de forma reversível ou irreversível. A forma reversível caracteriza-se por uma inflamação ligeira a moderada, que regride quando se elimina o fator agressor. Já a pulpite irreversível ocorre quando há uma infecção bacteriana que ultrapassa o ponto de retorno e compromete de maneira permanente, a capacidade de regeneração de polpa. (Ghannam et al., 2023).

A gravidade da cárie influencia diretamente o risco de exposição pulpar. De acordo com a Sociedade Europeia de Endodontia (*European Society of Endodontology, ESE*), uma cárie é considerada profunda quando existe evidência radiográfica de uma cárie a atingir o terço interno ou o quarto interno da dentina, o que aumenta o risco de envolvimento pulpar e exige uma avaliação cuidadosa da vitalidade tecidular (Duncan et al., 2019).

Se a contaminação bacteriana atinge a polpa, pode provocar uma inflamação irreversível, conduzindo à necrose pulpar. Esta infeção pode, em seguida, estender-se à polpa radicular causando uma periodontite apical (Farges, 2015; Pohl et al., 2024). A polpa dentária, estando confinada por tecido mineralizado, reage inicialmente com um aumento da pressão intracanal, que se estende ao ápice radicular, podendo provocar assim um abscesso periapical (Shah et al., 2020). As lesões periapicais podem manifestar-se clinicamente como granulomas apicais ou quistos radiculares e ambas têm origem inflamatória. Assim, a mesma etiologia, a necrose pulpar, conduz a diferentes patologias clínicas (Galler et al., 2021).

Adicionalmente, a necrose pulpar em dentes permanentes imaturos constitui um verdadeiro desafio clínico, pois interfere com o desenvolvimento radicular. A interrupção da fisiologia normal da polpa impede a maturação do ápice radicular e compromete a resistência estrutural do dente, aumentando o risco de fraturas cervicais ou verticais (Lambrichts et al., 2017; Peng et al., 2017).

2. Terapias endodônticas convencionais e os seus limites

Perante uma pulpite irreversível ou necrose pulpar, a solução terapêutica mais comum é o tratamento endodôntico não cirúrgico. O tratamento endodôntico (*Root Canal Treatment, RCT*) tem como objetivo eliminar os tecidos infectados de forma a reduzir a pressão intracanal ao nível da polpa dentária e aliviar a dor (Shah et al., 2020). O objetivo do RCT é limpar, conformar e selar tridimensionalmente o sistema canalar para eliminar a infecção existente ou prevenir uma reinfecção (Karamifar et al., 2020).

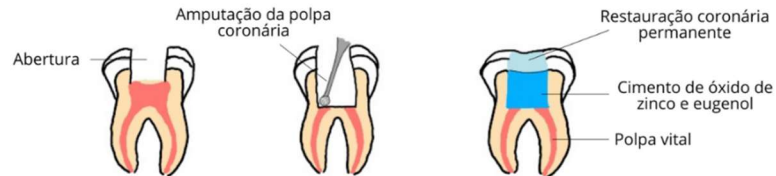
Apesar da sua eficácia, o RCT apresenta limitações clínicas. Entende-se por falha endodôntica o reaparecimento dos sintomas clínicos e a presença de radiotransparência periapical (Karamifar et al., 2020). Além disso, este tratamento tecnicamente exigente pode provocar efeitos secundários indesejáveis como descoloração da coroa, fratura radicular ou persistência de inflamação periapical (Duncan et al., 2019). Relativamente aos dentes permanentes imaturos com ápices abertos, o objetivo principal é preservar a polpa para promover a maturação radicular e reduzir o risco de fraturas radiculares cervicais e verticais (Meschi et al., 2020). Historicamente, a apexificação foi o tratamento de referência para dentes imaturos necróticos, mas não permite o desenvolvimento completo da raiz nem o espessamento das paredes dentinárias (Murray, 2022). A apexificação refere a aplicação de uma barreira mineralizada, como o MTA (*Mineral Trioxide Aggregate*), que permite o encerramento do ápice radicular, mas sem promover a maturação radicular nem restaurar as funções vitais do tecido pulpar (Siddiqui et al., 2021).

Em resposta a estas limitações, abordagens mais conservadoras ganharam popularidade, nomeadamente os tratamentos pulpares vitais (*Vital pulp therapy, VPT*). Estas técnicas, como a proteção pulpar direta ou indireta, pulpotomia ou apexogénese, visam preservar a vitalidade do tecido pulpar remanescente, especialmente em pacientes jovens cujos dentes apresentam um ápice imaturo (Kahler et al., 2023). O procedimento de tratamento da polpa é decidido em função da profundidade da inflamação pulpar e do desenvolvimento radicular (Shah et al., 2020), como ilustrado na **figura 2**. O tratamento dos dentes permanentes imaturos necrosados representa um desafio importante, uma vez que a conclusão de desenvolvimento radicular é afetada pelas perturbações da fisiologia normal da polpa. Os procedimentos endodônticos modernos visam manter a vitalidade do tecido pulpar e induzir a sua regeneração (Lambrichts et al., 2017).

A. Proteção pulpar direta



B. Pulpotomia



C. Pulpectomia

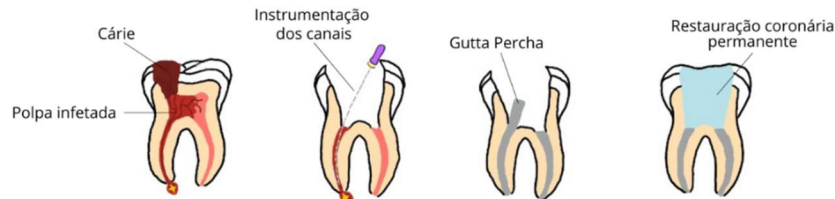


Figura 2 Esquema do conceito atual de terapia pulpar.

(A) Proteção pulpar direta. É uma técnica utilizada para evitar a necrose da polpa dentária quando se encontra ligeiramente exposta. (B) Pulpotomia. É um procedimento minimamente invasivo, indicado clinicamente em casos de pulpites sem envolvimento patológico das raízes. (C) Pulpectomia. Consiste num tratamento endodôntico que implica a remoção completa do tecido pulpar. (adaptado de Kwack & Lee, 2022).

Em comparação com o tratamento endodôntico convencional (RCT), as VPT apresentam várias vantagens terapêuticas: são mais rápidas, tecnicamente menos exigentes e associadas a menos efeitos indesejáveis. Nesta ótica, as estratégias modernas de preservação da polpa impõem-se como soluções menos invasivas e mais conservadoras, particularmente adequadas a dentes jovens ou em casos em que a vitalidade pulpar ainda pode ser mantida (Duncan et al., 2019).

3. Rumo a uma regeneração pulpar: potencial das células estaminais dentárias

A preservação da vitalidade pulpar é atualmente um dos fundamentos das abordagens modernas em medicina dentária conservadora e endodontia. Permite manter as funções essenciais da polpa, nomeadamente a dentinogénese primária e secundária, os mecanismos de defesa através da dentinogénese terciária, bem como as funções proprioceptivas do dente. Estas funções asseguram a longevidade do dente e a estabilidade dos tecidos envolventes (Bjørndal et al., 2019; Duncan et al., 2019).

Esta opção terapêutica baseia-se numa melhor compreensão da capacidade da polpa se defender e regenerar. Quando o agente irritante é eliminado, a polpa conserva a capacidade e o potencial de ativar os seus mecanismos de defesa, através do aumento da atividade dos odontoblastos existentes (dentinogénese terciária reacional), ou pelo recrutamento de células progenitoras capazes de se diferenciar em células do tipo odontoblástico e de produzir dentina reparadora (dentinogénese terciária reparadora) (Bjørndal et al., 2019; Zhang & Yelick, 2021). Dependendo da intensidade e profundidade da invasão bacteriana, as células pulpares viáveis são capazes de iniciar um processo de reparação via resposta inflamatória (Shah et al., 2020). No entanto, se a inflamação se tornar crónica, pode provocar uma perda funcional permanente do tecido e uma diminuição das capacidades de defesa, comprometendo assim a viabilidade pulpar a longo prazo (Fages et al., 2015).

As técnicas regenerativas como o REP (*Regenerative Endodontic Procedure*) surgem atualmente como uma alternativa com o objetivo de restaurar a função pulpar e permitir o desenvolvimento radicular completo (Shah et al., 2020). Este processo envolve as células estaminais da polpa (*Dental Pulp Stem Cells, DPSC*), capazes de se dividir, manter a sua niche e participar na formação de novos tecidos pulpares e pontes de dentina (Zhang & Yelick, 2021). O REP reflete uma estratégia inovadora, baseada nos princípios da engenharia tecidual, abrindo caminho a uma endodontia menos invasiva, mais respeitadora da biologia pulpar e potencialmente mais duradoura a longo prazo (Duncan et al., 2019).

Perante as limitações dos tratamentos endodônticos convencionais e a emergência das terapias regenerativas, é essencial compreender os mecanismos biológicos subjacentes à regeneração pulpar. Restaurar eficazmente a vitalidade dentária requer um conhecimento aprofundado da estrutura, das funções e da dinâmica celular da polpa, bem como dos processos de vascularização, inervação e resposta imunitária envolvidos na reparação tecidual.

II- DESENVOLVIMENTO

1. Mecanismos biológicos da regeneração pulpar

1.1. Estrutura e funções da polpa dentária

A polpa dentária é uma massa de tecido conjuntivo altamente vascularizado e innervado, situada no centro do dente, num espaço fechado por tecidos mineralizados, incluindo a dentina, o esmalte e o cimento, e mantém a homeostasia e a viabilidade do dente (Shi et al., 2023). Este confinamento cria um ambiente de baixa capacidade de distensão, isso significa que qualquer aumento de volume, não pode ser facilmente acomodado. O que limita a expansão tecidular e aumenta a sensibilidade às variações de pressão, nomeadamente em casos de pulpíte (Chung et al., 2013; Pohl et al., 2024). Como ilustrado na **figura 1**, distinguem-se classicamente duas regiões, a polpa coronária, situada na coroa dentária, incluindo os cornos pulpares, e a polpa radicular, que se estende do colo do dente até ao ápice, no interior do canal radicular (Ghannam et al., 2023).

1.1.1. Vascularização pulpar

A polpa é irrigada por arteríolas que penetram pelo foramen apical provenientes do periodonto. Estas arteríolas atravessam a polpa radicular, formam 1 a 2 ramos principais na câmara pulpar e depois ramificam-se num plexo capilar periférico localizado sob a camada de odontoblastos (Ghannam et al., 2023).

A polpa apresenta uma pressão tecidular elevada, mas o seu fluxo capilar é importante, permitindo uma drenagem eficaz e a defesa contra agentes patogénicos pela eliminação de toxinas através dos túbulos dentinários. A regulação deste fluxo é assegurada principalmente por metabólitos locais e, em menor grau, pela inervação simpática (Rechenberg et al., 2016).

1.1.2. Inervação e papel sensorial

A inervação pulpar inclui fibras simpáticas não mielinizadas, as fibras C, que provêm do gânglio cervical superior e são responsáveis pela vasoconstrição das arteríolas. Inclui também fibras sensoriais aferentes mielinizadas, as fibras A, originárias dos ramos maxilar e mandibular do nervo trigêmio, que são responsáveis pela detecção de estímulos térmicos, mecânicos e nociceptivos. Estas últimas ramificam-se sob a zona rica em células para formar o plexo de Raschkow. As suas terminações nervosas livres, não mielinizadas, estendem-se através da zona de Weil, acelular, até se localizarem perto dos odontoblastos, podendo por vezes projetar-se nos túbulos dentinários (Ghannam et al., 2023 ; Pohl et al., 2024).

Os axónios da polpa e os neurónios dos gânglios trigeminais que os inervam expressam vários receptores e canais iónicos que são ativados por estímulos térmicos, químicos e mecânicos (Bae & Yoshida, 2020).

1.1.3. Organização histológica

A polpa está dividida em várias zonas funcionais. Primeiro, a camada odontoblástica, alinhada na interface dentina-polpa, composta por células colunares, os odontoblastos, cuja função principal é o desenvolvimento da dentina. Estes odontoblastos possuem prolongamentos que se estendem pelos túbulos dentinários. Segundo, a zona de Weil, acelular, rica em capilares e fibras nervosas. Segue-se a zona rica em células, que contém fibroblastos e células mesenquimais indiferenciadas, responsáveis por apoiar os odontoblastos através da sua capacidade de proliferação e diferenciação. Estas células podem também evoluir para fibroblastos ou macrófagos (Ghannam et al., 2023). Finalmente, o centro pulpar, que contém uma matriz extracelular composta por colágeno tipo I e III, ácido hialurónico, proteoglicanos e água, lembrando um tecido mesenquimal gelatinoso (Goldberg, 2010; Pohl et al., 2024).

1.1.4. Composição celular

A polpa apresenta uma grande diversidade celular, onde se encontram os fibroblastos pulpares dentários, o tipo celular mais abundante. Estes produzem a matriz extracelular, participam na angiogénese ao produzir e libertar fatores de crescimento angiogénicos como o fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor, VEGF*) e o fator de crescimento dos fibroblastos (*Fibroblast growth factor 2, FGF-2*), assim como na imunomodulação e na reparação dentina-polpa (Álvarez-Vásquez & Castañeda-Alvarado, 2022).

Os odontoblastos são células especializadas que produzem a dentina e possuem prolongamentos nos túbulos dentinários. Existem também as células estaminais pulpares, localizadas em nichos perivasculares, apresentando propriedades mesenquimais e neurais, devido à sua origem na crista neural (Galler et al., 2021).

1.1.5. Função imunitária e vigilância tecidular

A polpa contém células imunitárias residentes, mesmo na ausência de agressão, tais como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, assim como linfócitos T (CD4+, CD8+), B, NK e T reguladores (Pohl et al., 2024). Estas células colaboram com os fibroblastos, as células estaminais e os odontoblastos para assegurar uma defesa local rápida perante agressões microbianas, fazendo da polpa um tecido altamente especializado e no mesmo tempo, imunocompetente (Galler et al., 2021; Rechenberg et al., 2016).

1.2. Histologia da formação dos tecidos pulpaes

1.2.1. Origem embrionária e sinalização do desenvolvimento

O desenvolvimento da polpa dentária está intimamente ligado ao desenvolvimento geral do dente, a odontogênese. E depende de uma sinalização celular entre dois tecidos dentários, o epitélio oral e o mesênquima envolvente (Ghannam et al., 2023; Zhang & Yelick, 2021).

A polpa dentária é um tecido conjuntivo mole de origem mesenquimal, derivado da crista neural. Desenvolve-se a partir da papila dentária, originada das células mesenquimais induzidas pelo epitélio oral durante a organogênese (Galler et al., 2021; Shah et al., 2020). Estas interações epitélio-mesenquimais bidirecionais são essenciais para a iniciação e progressão do desenvolvimento dentário (Ghannam et al., 2023).

1.2.2. Os estádios do desenvolvimento.

Como ilustrado na **figura 3** a dentinogênese começa com um espessamento do epitélio oral, seguido da condensação das células mesenquimais subjacentes, e depois progride para estádios morfológicos distintos (Thesleff, 2013). O desenvolvimento da polpa ocorre em três etapas principais (Ghannam et al., 2023):

- A. Estádio do botão (*bud stage*): Esta fase começa na oitava semana de vida intrauterina com o aparecimento dos órgãos do esmalte. As células epiteliais da lâmina dentária proliferam e formam uma projeção em forma de botão no ectomesênquima adjacente.
- B. Estádio do capuz (*cap stage*): o botão epitelial alarga-se formando uma superfície côncava. Nesta fase, as células epiteliais orais formam os órgãos do esmalte, e as células mesenquimais formam a papila dentária, futura polpa.
- C. Estádio do sino (*bell stage*): esta é a etapa de morfodiferenciação e histodiferenciação da polpa. As células localizadas na periferia da papila dentária diferenciam-se em odontoblastos, iniciando assim a formação da dentina, a dentinogênese (Ghannam et al., 2023; Rathee & Jain, 2023).

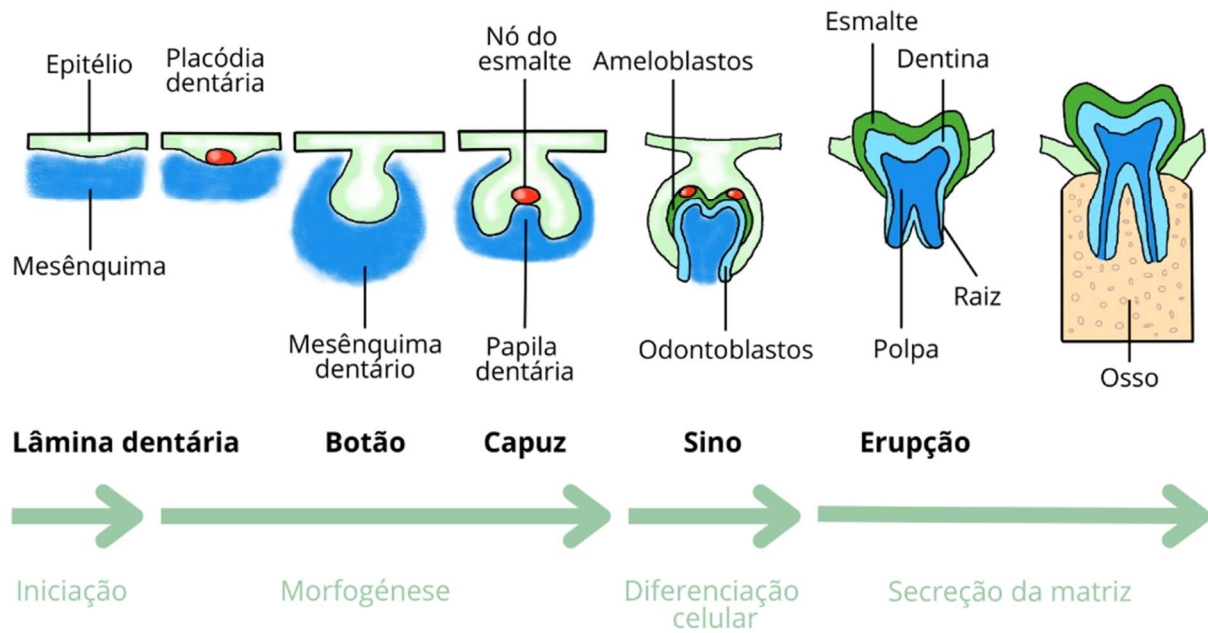


Figura 3 O processo de desenvolvimento dentário.

A placódia dentária e os nós do esmalte atuam como centros de sinalização que regulam a morfogênese dentária (adaptado de Thesleff, 2013).

1.2.3. Vascularização, inervação e diferenciação odontoblástica.

A vascularização e inervação da papila dentária, que posteriormente se tornará a polpa, caracteriza-se por uma elevada densidade celular desde o estágio inicial do botão e é composta principalmente por fibroblastos. Os vasos sanguíneos e as fibras nervosas associadas estabelecem-se cedo na papila, fornecendo nutrição ao órgão em crescimento. Inicialmente localizados no centro, os vasos e nervos estendem-se progressivamente para a periferia (Ghannam et al., 2023).

A diferenciação dos odontoblastos marca a transição entre a papila dentária e a polpa. Estas células pós-mitóticas, altamente polarizadas, secretam uma matriz colagénica denominada pré-dentina, que se mineraliza posteriormente para formar a dentina (Galler et al., 2021). Este processo de formação ocorre fisiologicamente e continuamente, para além do desenvolvimento inicial, com a formação da dentina primária durante a morfogênese radicular, e da dentina secundária, que é produzida

lentamente ao longo da vida. Cada odontoblasto possui um prolongamento citoplasmático na matriz mineralizada, formando os túbulos dentinários, característica histológica principal da dentina (Galler et al., 2021; Pohl et al., 2024).

A dentina é composta por cerca de 70% de fase mineral (hidroxiapatita), 20% de matriz orgânica (principalmente colágeno tipo I) e os restantes 10% são água. Aproximadamente 10% da fase orgânica é constituída por proteínas não colagénicas específicas, que regulam a mineralização (Goldberg, 2010).

1.2.4. Complexo dentina-polpa.

O complexo dentina-polpa constitui uma unidade biológica indissociável, tanto a nível funcional como ao nível do desenvolvimento (Galler et al., 2021; Pohl et al., 2024). A polpa fornece às células, os nutrientes e os sinais necessários para a formação e reparação da dentina, enquanto a dentina protege mecanicamente a polpa. Esta ligação estreita é particularmente importante durante o desenvolvimento radicular, em que a polpa deve permanecer funcional para assegurar a formação completa da raiz (Galler et al., 2021; Shah, 2020).

1.2.5. Origem das células estaminais pulpares

As DPSCs, envolvidas na regeneração pós-natal, poderão derivar dos pericitos presentes nos nichos perivasculars. Outras hipóteses sugerem uma origem glial, indicando uma transição glia-MSc a partir de células associadas aos nervos periféricos durante o desenvolvimento dentário. Estes dados reforçam a ideia de que a polpa não é apenas um tecido de suporte, mas também uma fonte dinâmica de células regenerativas, de origem neuroectodérmica (Zhang & Yelick, 2021).

1.3. Os desafios da regeneração vascular e nervosa

A revascularização e a reinervação são etapas essenciais para o sucesso da regeneração pulpar. A vascularização e a inervação, intimamente ligadas, são indispensáveis para a sobrevivência celular, a homeostasia do tecido regenerado, a percepção sensorial e a defesa imunitária local (Bae & Yoshida, 2020; Zhang & Yelick, 2021).

A polpa dentária é descrita como um tecido altamente vascularizado situado num ambiente inextensível, rodeado pelas paredes da dentina, tendo como único acesso o foramen apical. Este ambiente confinado acentua a necessidade de um sistema vasculonervoso funcional rapidamente estabelecido (Rombouts et al., 2016).

Um desafio importante para a regeneração vascular e nervosa na polpa dentária inclui a incapacidade de ultrapassar os limites anatómicos do fornecimento sanguíneo. Nas abordagens baseadas no “cell homing”, que detalharemos mais adiante, um problema recorrente é o tamanho necessário do foramen apical para uma revascularização pulpar adequada, dado que o fornecimento vascular nos dentes é limitado por este foramen (Lambrichts et al., 2017).

1.3.1. Revascularização pulpar

Como mencionado anteriormente, a polpa dentária é um tecido altamente vascularizado. A sua regeneração exige a reconstrução rápida de uma rede capilar capaz de assegurar as trocas gasosas, a oxigenação, o fornecimento de nutrientes e a eliminação de resíduos (Rombouts et al., 2016; Silva et al., 2017).

A angiogénese é a formação de novos vasos a partir de vasos já existentes. Este processo é regulado por fatores de crescimento angiogénicos, tal como o VEGF, o FGF-2, e o fator de crescimento derivado de plaquetas (*Platelet-derived growth factor, PDGF*), que estão presentes na matriz dentinária e podem ser libertados durante a sua degradação (Dissanayaka & Zhang, 2017).

1.3.2. Reinervação pulpar

A polpa é também um tecido altamente innervado, composto principalmente por fibras sensoriais responsáveis pela percepção de estímulos mecânicos, térmicos e dolorosos (Bae & Yoshida, 2020). Estas fibras também desempenham um papel trófico e imunomodulador. Assim, a regeneração nervosa constitui um objetivo central na formação de um tecido pulpar vital e funcional (Wei et al., 2022; Zhang & Yelick, 2021).

1.4. Resposta imunitária e papel na cicatrização ou falha regenerativa

A polpa dentária, confinada num espaço restrito pelos tecidos dentários mineralizados, responde com grande sensibilidade às agressões, cáries, traumatismos ou estímulos químicos. Esta resposta, que combina mecanismos inflamatórios inatos e adaptativos, desempenha um papel determinante no desfecho do processo regenerativo (Demarco et al., 2011).

1.4.1. Detecção de patógenos e ativação da imunidade inata

O sistema imunitário inato reconhece componentes microbianos conservados, comuns a um vasto conjunto de agentes patogénicos, desencadeando uma resposta inflamatória poucos minutos após a exposição. Para além disso, desempenha um papel essencial na ativação e orientação da resposta imunitária adaptativa (Kaur & Secord, 2021).

Os odontoblastos, situados na fronteira dentina-polpa, são as primeiras células expostas aos produtos bacterianos que se difundem através dos túbulos dentinários. Reconhecem estes PAMP (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) através dos seus PRR (*Pattern Recognition Receptors*), como os TLRs e os NLRs, o que desencadeia a secreção de citocinas, quimiocinas e péptidos antimicrobianos como o óxido nítrico e as β -defensinas (Cooper et al., 2014; Farges et al., 2015; Galler et al., 2021). Esta ativação permite o recrutamento de células imunitárias tal como os macrófagos e as células dendríticas (Shah et al., 2020).

1.4.2. Cascata inflamatória e papel das células imunitárias

A resposta inflamatória inicial mobiliza os neutrófilos, os primeiros a serem recrutados nos tecidos pulpare (Pohl et al., 2024). Estes participam na fagocitose, libertam os armadilhas extracelulares dos neutrófilos (*Neutrophils Extracellular Traps, NET*) e enzimas lisossomais que podem causar danos colaterais (Cooper et al., 2017; Rechenberg et al., 2016). Seguem-se os macrófagos, que se diferenciam em fenótipos M1 (pró-inflamatórios) ou M2 (anti-inflamatórios e reparadores) (Shah et al., 2020). As células dendríticas migram para os gânglios linfáticos para ativar os linfócitos T (Pohl et al., 2024).

Os linfócitos T e B são então recrutados progressivamente. Os T CD4+ diferenciam-se em células Th1 e Th2, dependendo das citocinas presentes, o que influencia o equilíbrio entre inflamação e resolução (Shah et al., 2020). A presença de mastócitos e eosinófilos mantém-se marginal (Pohl et al., 2024).

1.4.3. Ligação entre inflamação e cicatrização

A inflamação é um componente importante do processo de reparação e regeneração do tecido pulpar dentário. Trata-se de um mecanismo de defesa e de um pré-requisito para a reparação, pois a estimulação dos odontoblastos remanescentes produz dentina terciária reacional. Em caso de lesão mais profunda com destruição dos odontoblastos, as células estaminais da polpa são recrutadas para formar dentina reparadora (Bjørndal, 2019; Sharpe, 2016). No entanto, este processo é comprometido pela presença de agentes patogénicos ou dos seus produtos, como os lipopolissacarídeos (LPS), que alteram a diferenciação celular e a mineralização (Meschi et al., 2020).

A polpa também pode detectar sinais endógenos (e.g. *Damage Associated Molecular Pattern, DAMP*) provenientes de células necróticas, que ativam os receptores intracelulares e desencadeiam a formação de inflamassomas, conduzindo a uma inflamação crónica (Pohl et al., 2024).

1.4.4. Riscos e falência regenerativa

A transição entre uma inflamação protetora e uma inflamação crônica está regulada por um equilíbrio. Quando a resposta inflamatória se torna prolongada ou excessiva, conduz à alteração dos tecidos pulpare, inibe a diferenciação das células estaminais e compromete a cicatrização (Cooper et al., 2014; Galler et al., 2021). Um dos objetivos da endodontia regenerativa é a manutenção da vitalidade pulpar, que depende de uma resolução rápida e eficaz da inflamação (Duncan et al., 2019).

O estudo dos mecanismos biológicos envolvidos na regeneração pulpar, incluindo a complexidade da arquitetura vascular e nervosa, bem como a dinâmica da resposta imunitária, evidencia os desafios a superar para uma restauração funcional e duradoura dos tecidos pulpare. Estes elementos conduzem ao surgimento de estratégias terapêuticas inovadoras. Assim, a regeneração endodôntica assenta nos princípios da engenharia celular para promover uma reconstrução tecidular funcional.

2. Regeneração endodôntica

As REPs visam resolver a doença, restaurar os tecidos imunocompetentes perdidos e gerar tecidos não desenvolvidos tais como a finalização do desenvolvimento da raiz e da polpa associada. Como salienta a AAE (*American Association of Endodontists*), o objetivo desta terapia regenerativa é triplo: a resolução dos sinais e sintomas da periodontite apical, o desenvolvimento da raiz e o restabelecimento das respostas de vitalidade (Meschi et al., 2020).

A endodontia regenerativa reúne procedimentos biológicos concebidos para substituir estruturas do complexo pulpo-dentinário danificadas, graças à regeneração de um tecido pulpar funcional, innervado e vascularizado (Meza et al., 2019; Xie et al., 2021).

Existe uma distinção entre regeneração e reparação. A regeneração é a restauração de um tecido danificado por um tecido semelhante ao original, com o retorno da função biológica. Enquanto que a reparação é a substituição de um tecido danificado por um tecido diferente do original, frequentemente acompanhada de perda da função biológica (Lin et al., 2021). Por exemplo, de uma perspectiva clínica, embora a vitalidade da polpa dentária possa ser preservada por procedimentos VPT, como a proteção pulpar direta ou a pulpotomia, o tecido de reparação formada assemelha-se mais a um tecido conjuntivo fibroso mineralizada (uma cicatriz) do que a dentina tubular verdadeira (Ricucci et al., 2018). O objetivo final da endodontia regenerativa é atingir uma verdadeira regeneração, o que significa a restauração do tecido à sua anatomia e função originais, envolvendo a formação de dentina tubular, uma revascularização suficiente e uma reinervação eficaz (He et al., 2017).

A endodontia regenerativa é particularmente indicada para dentes permanentes imaturos que apresentam necrose pulpar, pois oferece o potencial para continuar o desenvolvimento da raiz e reforçar as paredes dentinárias finas (Hargreaves et al., 2013).

Estes procedimentos de endodontia regenerativa correspondem à aplicação dos princípios da engenharia de tecidos ao domínio da endodontia.

2.1.Princípio da engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é um campo de investigação multidisciplinar, focado na regeneração em vez da reparação. O seu objetivo é restaurar, manter e regenerar tecidos danificados ou perdidos, combinando os princípios da biologia, da medicina e da engenharia (Gong et al., 2016). Existem três princípios fundamentais nesta disciplina: as células progenitoras, os fatores de crescimento e uma “matriz” ou “scaffold” (Costa et al., 2023).

Todos os tecidos biológicos são derivados de células estaminais. O primeiro elemento necessário para a regeneração de tecidos é, portanto, uma fonte de células estaminais capazes de se diferenciar nos componentes do tecido desejado. Dependendo da sua origem e potencial de diferenciação, as células estaminais dividem-se em várias categorias, com diferentes aplicações clínicas e implicações éticas. No domínio da regeneração pulpar, a compreensão dos diferentes tipos de células estaminais e as suas propriedades biológicas é fundamental para desenvolver uma estratégia terapêutica adequada.

2.2. As células estaminais.

As células estaminais (SC) são células indiferenciadas que possuem duas propriedades fundamentais: a autorrenovação e a diferenciação em linhagens celulares especializadas (Demarco et al., 2011; Nuti et al., 2016). Desempenham um papel essencial no desenvolvimento embrionário, na regulação da homeostasia tecidular e na reparação de tecidos danificados (Hussain et al., 2022; Nuti et al., 2016). De acordo com a sua origem e o seu potencial de diferenciação, as células estaminais são classificadas em duas categorias: células estaminais embrionárias (ESC) e células estaminais adultas ou pós-natais (ASC). As ESCs são obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto e têm potencial teratogénico. São pluripotentes, capazes de gerar todos os tipos celulares do organismo, mas a sua utilização é limitada por considerações éticas devido à sua derivação a partir de embriões pré-implantacionais (Ding et al., 2011). Em contrapartida, as células estaminais adultas, entre as quais se incluem as células estaminais

mesenquimais (MSC), representam uma fonte celular mais ética, acessível e adequada para a engenharia de tecidos (Hussain et al., 2022).

As MSCs são um tipo celular altamente heterogêneo, com múltiplas origens em tecidos pós-natais. Estas células têm origem no mesoderma ou no ectoderma. São capazes de dar origem a diversos tipos celulares, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos e miofibroblastos, em resposta a estímulos de diferenciação ou inflamatórios (Li et al., 2023). As suas principais características são a capacidade de autorrenovação, a clonogenicidade e o potencial de diferenciação multipotente. Têm também a capacidade de regular a resposta imunitária e apresentam uma excelente capacidade de propagação sob condições específicas *in vitro* (Ding et al., 2011).

As MSCs foram identificadas em vários tecidos adultos, nomeadamente na medula óssea, no tecido adiposo, mas também em tecidos de origem dentária. Estes últimos oferecem uma vantagem considerável, pois a acessibilidade relativa dos dentes extraídos ou esfoliados permite o isolamento das MSCs dentárias sem prejuízo para o paciente (Kwack & Lee, 2022).

As células estaminais dentárias (*Dental stem cells, DSCs*), embora pertencentes à família das MSCs, distinguem-se pela sua origem embrionária. Provêm principalmente da crista neural, ao contrário da maioria das MSCs que têm origem mesodérmica (Li et al., 2023).

As DSCs mantêm as propriedades gerais das MSCs, tal como a autorrenovação, a plasticidade, a elevada capacidade de proliferação e o potencial de diferenciação em linhagens osteogénicas, odontogénicas, neuronais ou vasculares (Kwack & Lee, 2022). No entanto, as DSCs destacam-se por um elevado potencial proliferativo e uma capacidade aumentada de diferenciação neuronal e odontogénica. Por outro lado, apresentam um potencial reduzido para a diferenciação condrogénica e adipogénica (Li et al., 2023).

Devido a estas propriedades, as células estaminais dentárias revelam-se candidatas ideais para abordagens de terapias regenerativas, nomeadamente nos domínios da endodontia e da medicina regenerativa crânio-facial (Hussain et al., 2022).

2.2.1. Tipos de células estaminais dentárias

As células estaminais de origem dentária (DSCs) constituem uma categoria de MSCs provenientes dos tecidos buco-dentários, apresentando um forte potencial em medicina regenerativa (Sharpe, 2016). Estas células possuem uma multipotencialidade demonstrada *in vitro*, com a capacidade de se diferenciar em células odontoblásticas, osteoblásticas, condrocitárias, adipocitárias, neurais, miogénicas, fibroblásticas e endoteliais, conferindo-lhes um amplo espectro de aplicações biomédicas (Hussain et al., 2022; Mitsiadis et al., 2011; Nuti et al., 2016). Em particular, demonstraram a sua aptidão para formar tecidos mineralizados, o que as torna candidatas ideais para terapias tisulares nos domínios da endodontia, da periodontologia e da cirurgia reconstrutiva (Hussain et al., 2022). No entanto, elas não são todas iguais em termos de propriedades fenotípicas e funcionais (Sharpe, 2016).

As células estaminais dentárias pertencem à família das células estaminais adultas (ASCs), distintas das células estaminais embrionárias (ESCs) (Nuti et al., 2016). Ao contrário das ESCs, cujo uso é restringido por considerações éticas e pela sua impossibilidade de gerar certos tecidos extra-embrionários (Demarco et al., 2011), às ASCs, em particular as MSCs dentárias, são mais acessíveis e mais compatíveis com uma aplicação clínica (Hussain et al., 2022; Kwack & Lee, 2022).

Como ilustrado na **figura 4**, as DSCs foram isoladas a partir de numerosas estruturas dentárias humanas, nomeadamente: a polpa dos dentes permanentes (*Dental Pulp Stem Cells, DPSC*), a polpa dos dentes temporários esfoliados (*Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, SHED*), a papila apical dos dentes em desenvolvimento (*Stem Cells from Apical Papilla, SCAP*), o ligamento periodontal (*Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSC*), e o folículo dentário (*Dental Follicle Progenitor Cells, DFPC*) (Costa et al., 2022; Demarco et al., 2011; Kwack & Lee, 2022; Mitsiadis et al., 2011).

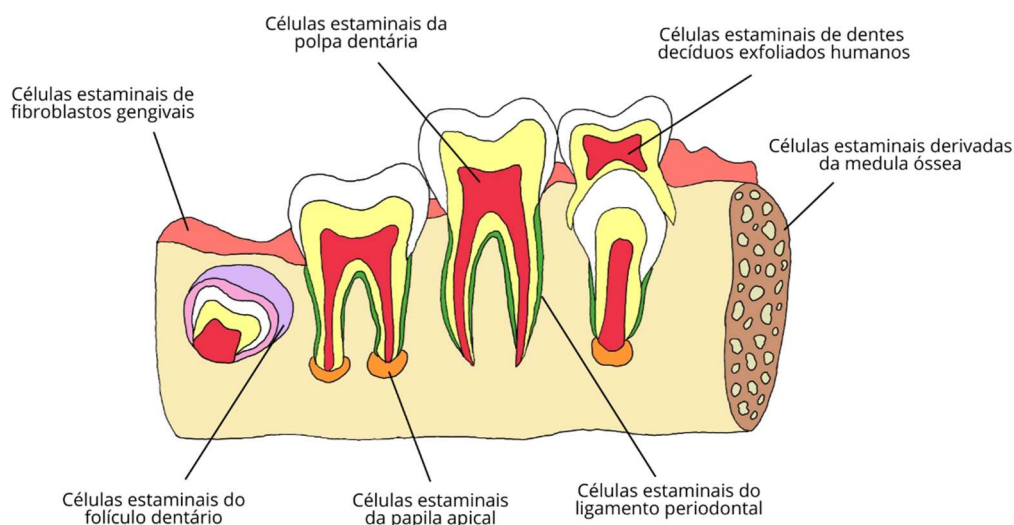


Figura 4 Diagrama esquemático das diferentes fontes de onde podem ser isoladas células estaminais dentárias.

As várias subpopulações de MSCs dentárias classificam-se de acordo com o tecido de origem: a partir do próprio dente, as DPSCs podem ser obtidas da polpa dentária de molares adultos (vermelho), da polpa de dentes decíduos esfoliados (vermelho) e da papila apical (laranja); dos tecidos de suporte, podem ser isoladas do foliculo dentário (roxo), do ligamento periodontal (verde), da gengiva (rosa) e também da medula óssea (castanho) (adaptado de Granz & Gorji, 2020 ; Sharpe, 2016).

Outros tecidos orais, tais como a gengiva (*Gingival Fibroblast Stem Cells, GFSC*) ou o tecido adiposo oral, também foram identificados como fontes potenciais de MSC. O conjunto destas células, agrupadas sob o termo de MSC orais, desempenha um papel chave na manutenção da integridade e da homeostasia dos tecidos orais, bem como na sua reparação após lesão (Costa et al., 2022).

Entre estes tipos, as DPSCs foram as primeiras a ser isoladas, e a sua capacidade de se diferenciar em odontoblastos funcionais e células endoteliais, assim como de regenerar um tecido pulpar vascular em modelos pré-clínicos, abriu caminho para um interesse crescente pelas células estaminais dentárias na engenharia pulpar (Demarco et al., 2011). Cada subtipo apresenta características biológicas específicas conforme a sua origem tecidual, influenciando o seu potencial de diferenciação e as suas aplicações terapêuticas.

2.2.1.1. Células estaminais do ligamento periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo fibroso especializado que liga a superfície radicular dos dentes ao osso alveolar. Desempenha um papel essencial no suporte mecânico dos dentes, mantendo-os no seu alvéolo enquanto absorve as forças mastigatórias (Kwack & Lee, 2022). Este tecido apresenta uma população celular heterogênea, incluindo células capazes de se diferenciar em cementoblastos e osteoblastos, participando assim na renovação contínua das estruturas periodontais (Demarco et al., 2011).

Entre estas células, as células estaminais do ligamento periodontal foram identificadas como uma subpopulação das células estaminais mesenquimais pós-natais. Tal como as células estaminais de origem pulpar, as PDLSCs possuem propriedades de multipotência, com capacidades de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica (Demarco et al., 2011).

2.2.1.2. Células estaminais da papila apical

A papila apical é um tecido situado na extremidade da raiz dos dentes em desenvolvimento. Este tecido transitório, presente apenas durante a fase de crescimento radicular, deriva da papila dentária embrionária, que é também a origem da polpa dentária (Demarco et al., 2011). As SCAPs partilham várias características biológicas com as DPSCs e as SHEDs, nomeadamente uma heterogeneidade celular e uma capacidade de diferenciação multipotente.

In vitro, as SCAPs demonstraram uma aptidão para se diferenciar em odontoblastos e osteoblastos, e em menor grau, em adipócitos. Podem também expressar marcadores neuronais e miogénicos, o que evidencia a sua plasticidade (Demarco et al., 2011). Estudos *in vivo* destacaram a sua capacidade de participar na formação de estruturas semelhantes ao cimento e ao ligamento periodontal, sugerindo o seu papel potencial na regeneração da fixação radicular (Kwack & Lee, 2022).

A nível funcional, as SCAPs distinguem-se pela sua capacidade de induzir a formação de dentina, o que as torna particularmente interessantes para abordagens de regeneração pulpar e radicular, especialmente no caso de dentes imaturos (Demarco et al., 2011). Sugere-se também que, tendo em conta a sua origem num tecido precursor da polpa radicular, as SCAPs poderão evoluir para DPSCs numa fase posterior do desenvolvimento, o que faria delas uma população de células estaminais mais primitiva (Demarco et al., 2011). A sua capacidade para suportar a formação radicular foi ainda confirmada, aproximando-as ainda mais das DPSCs nas suas funções biológicas (Zhang & Yelik, 2021).

2.2.1.3. Células estaminais do folículo dentário

O folículo dentário é um tecido conjuntivo frouxo derivado do ectomesênquima que envolve a papila dentária e o órgão do esmalte durante o desenvolvimento do germe dentário, antes da erupção do dente. Este tecido embrionário desempenha um papel importante na formação das estruturas de suporte do dente (Kwack & Lee, 2022).

As DFSCs foram identificadas como células progenitoras capazes de originar cementoblastos, osteoblastos, bem como células do ligamento periodontal. O seu potencial de diferenciação foi confirmado *in vitro* e *in vivo*, nomeadamente através de modelos experimentais que utilizam implantes, nos quais as DFSCs demonstraram a sua capacidade para produzir cimento e tecidos semelhantes ao ligamento periodontal (Kwack & Lee, 2022).

2.2.1.4. Células estaminais de dentes decíduos esfoliados humanos

As células estaminais provenientes de dentes decíduos esfoliados, constituem uma população celular mesenquimatosa isolada a partir da polpa de dentes primários esfoliados espontaneamente ou extraídos (Demarco et al., 2011). Estes dentes, perdidos durante a infância, representam uma fonte acessível e pouco invasiva de células estaminais, oferecendo até vinte oportunidades de colheita por indivíduo, ao contrário dos dentes do siso, limitados a quatro (Hussain et al., 2022).

As SHEDs apresentam uma forte diferenciação osteogénica e uma capacidade osteoindutora (Kunimatsu et al., 2018). Para além da sua diferenciação em osteoblastos, adipócitos, odontoblastos e células neuronais, as SHEDs partilham alguns marcadores com células estaminais embrionárias, o que sugere uma plasticidade biológica avançada (Hussain et al., 2022).

Do ponto de vista funcional, as SHEDs demonstraram uma grande capacidade de regeneração tecidular. *In vitro*, diferenciam-se em osteoblastos, e *in vivo*, são capazes de induzir a formação de tecidos do tipo dentinário após transplante, o que mostra o seu potencial na regeneração pulpar e óssea (Su et al., 2016). Outra vantagem das SHEDs é a sua resistência à criopreservação. Mesmo após descongelamento, mantêm a sua viabilidade e potencial de diferenciação, o que as torna um recurso valioso para a medicina regenerativa (Kwack & Lee, 2022).

2.2.1.5. Células estaminais da polpa dentária

As células estaminais da polpa dentária são um dos primeiros tipos de células estaminais dentárias identificadas e caracterizadas. Foram isoladas pela primeira vez em 2000 por Gronthos et al. a partir da polpa de terceiros molares inclusos (Gronthos et al., 2000; Nuti et al., 2016).

Durante o desenvolvimento embrionário precoce, as células da crista mesenquimal migram para os arcos branquiais do sistema nervoso, indicando que as DPSCs descendem de células da crista neural. Portanto, têm uma origem ectomesenquimatosa (Hussain et al., 2022). Estão localizadas no tecido conjuntivo da polpa dos dentes adultos e representam uma fração minoritária da população celular pulpar, sendo que o seu número tende a diminuir com a idade (Costa et al., 2022).

As DPSCs formam uma população heterogénea, caracterizada por uma morfologia do tipo fibroblástica e pela capacidade de aderirem ao plástico em cultura. Podem ser isoladas por digestão enzimática ou por migração celular a partir do tecido pulpar colocado em cultura (Lambrichts et al., 2017). São obtidas a partir de dentes permanentes extraídos em ambiente estéril, mais frequentemente dentes do siso, ou

durante pulpotomias quando o dente é conservado (Costa et al., 2022; Hussain et al., 2022).

As DPSCs são comumente identificadas pela expressão de marcadores de superfície associados às células estaminais mesenquimatosas (e.g. CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO-1) e pela ausência de alguns marcadores hematopoiéticos (e.g. CD14, CD19, CD34 e CD45) (Lambrichts et al., 2017; Mattei et al., 2015). Expressam igualmente componentes da matriz extracelular, como vimentina, fibronectina, laminina e diferentes tipos de colagénio (Mitsiadis et al., 2011).

2.2.2. Características das DPSC

2.2.2.1. Localização e identificação

Como mencionado anteriormente, as DPSCs são uma população celular heterogênea, localizada na zona central da polpa dentária. Este compartimento celular especializado diminui naturalmente com a idade, em consequência do fenómeno de calcificação (Costa et al., 2022). As DPSCs são frequentemente isoladas por digestão enzimática ou por cultura através de migração celular. O método de isolamento por colónias é o mais utilizado, permitindo obter um elevado rendimento celular, um fator importante para a terapêutica regenerativa (Kawashima et al., 2017). Estas células são obtidas a partir de terceiros molares extraídos, dentes decíduos esfoliados ou dentes supranumerários (Lambrichts et al., 2017; Zhang & Yelick, 2021).

Estas células apresentam uma morfologia fibroblástica característica e possuem uma elevada capacidade clonogénica, com a capacidade de aderir a superfícies plásticas e formar colónias em cultura (Demarco et al., 2011). Expressam marcadores de superfície típicos das células estaminais mesenquimatosas tal como CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO-1 (Mattei et al., 2015; Mitsiadis et al., 2011). Embora não sejam específicos das DPSCs, o seu perfil é coerente com um elevado potencial regenerativo. Além disso, a presença de marcadores neurovasculares como glia-2, assim como certos marcadores hematopoiéticos (e.g. CD117), sublinha a sua implicação na regeneração neurovascular (Hussain et al., 2022).

2.2.2.2. Características biológicas

As DPSCs são de origem ectodérmica, derivadas das células da crista neural migratórias durante o desenvolvimento embrionário, o que explica o seu fenótipo simultaneamente mesenquimatoso e neuroectodermal (Hussain et al., 2022). Possuem uma forte capacidade de autorregulação e elevada plasticidade, conservadas mesmo após várias passagens *in vitro* ou após criopreservação (Costa et al., 2022; Hussain et al., 2022).

As DPSCs podem diferenciar-se em linhagens odontoblásticas, osteoblásticas, condrogénicas, adipocitárias, neuronais e gliais, em função das suas condições de indução (Nuti et al., 2016; Zhang & Yelick, 2021). De facto, as condições de cultura influenciam fortemente as suas propriedades, em particular a sua capacidade de diferenciação para as linhagens osteoblástica e odontoblástica (Kawashima et al., 2017). Da mesma maneira, as DPSCs expressam marcadores neuro específicos como a proteína glial fibrilar ácida (*Glial fibrillary acidic protein, GFAP*), Nestina, um marcador de progenitor neural, e NeuN (*Neuronal Nuclei*) um marcador de neurónios maduros, e podem ser estimuladas por optogenética para se diferenciarem em células neuronais (Kwack & Lee, 2022).

2.2.2.3. Vantagens específicas das DPSCs

As DPSCs distinguem-se pela sua origem pós-natal, evitando as controvérsias éticas associadas às células embrionárias, e pela sua acessibilidade clinicamente pouco invasiva (Demarco et al., 2011; Hussain et al., 2022). A possibilidade do seu isolamento a partir de tecidos inflamados apoia o seu interesse para aplicações autólogas num contexto patológico (Zhang & Yelick, 2021).

Do ponto de vista biológico, destacam-se pela sua elevada capacidade de proliferação, tolerância aos biomateriais, estabilidade genómica prolongada, bem como pelas suas fortes propriedades imunomoduladoras, permitindo a regulação da resposta imunitária no seu ambiente (Costa et al., 2022).

A utilização de células alogénicas apresenta a vantagem de permitir a criação de um banco de células prontas a utilizar. No entanto, a principal preocupação associada ao uso de células alogénicas é o risco de rejeição pelo sistema imunitário do hospedeiro. As DPSCs distinguem-se pela sua baixa imunogenicidade e pelo seu forte potencial imunomodulador, que lhes permite controlar eficazmente a rejeição imunológica (Kwack & Lee, 2022).

As DPSC expressam fracamente as moléculas do complexo maior de histocompatibilidade de classe I (MHC-I), não expressam MHC de classe II e apresentam uma baixa expressão de moléculas co-estimuladoras. Consequentemente, não desencadeiam efeitos citotóxicos significativos sobre as células imunitárias do hospedeiro e podem mesmo induzir uma forma de tolerância imunológica (Kwack & Lee, 2022).

A sua capacidade de regular as respostas imunitárias manifesta-se nomeadamente pela supressão da proliferação dos linfócitos T e pela orientação dos macrófagos para um fenótipo anti-inflamatório do tipo M2. Assim, podem atuar *in vivo* para suprimir a inflamação durante a reparação tecidular (Bar et al., 2021; Sharpe, 2016).

Estes efeitos imunossupressores são mediados por diversas moléculas segregadas, incluindo metabólitos como a prostaglandin E2 (PGE2), e a enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), citocinas tais como o fator de crescimento transformador beta (*Transforming Growth Factor beta*, *TGF-β*), e a interleucina 10 (IL-10), e vesículas extracelulares, como os exossomas que são ricos em fatores imunomoduladores (Li et al., 2023).

Estas propriedades imunomoduladoras não são expressas de forma constitutiva, mas são induzidas pelo microambiente inflamatório. As citocinas inflamatórias como o interferão-gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são os principais indutores das funções imunossupressoras das DPSCs, estimulando a expressão de numerosos mediadores anti-inflamatórios (Ménard & Tarte, 2011).

As propriedades imunomoduladoras das DPSCs tornam-nas agentes terapêuticas promissoras para doenças inflamatórias e imunológicas. As DPSCs são capazes de modular tanto a imunidade inata como a adaptativa, contribuindo para limitar a inflamação excessiva, favorecer a reparação tecidual e manter a homeostasia local, mesmo em contextos patológicos (Kwack & Lee, 2022; Li et al., 2023).

2.2.2.4. Fatores de crescimento e capacidade de diferenciação

Funcionalmente, as DPSCs desempenham um papel importante na reparação da dentina e na manutenção pós-natal da homeostasia dentária, através da sua diferenciação em odontoblastos (Ratajczak et al., 2016).

As DPSCs possuem um potencial angiogénico e neurogénico cruciais para a regeneração pulpar (Lambrichts et al., 2017). Produzem um grande número de fatores pró-angiogénicos (e.g. VEGF, PDGF, MCP-1, FGF-2, EDN1), capazes de induzir a migração endotelial, a formação de estruturas capilares e até de se diferenciarem em células do tipo pericíticas e endoteliais (Janebodin et al., 2013). Além da sua capacidade de diferenciação, podem apoiar a angiogénese orientando as células endoteliais de forma parácrina e estabilizar os novos vasos adotando um comportamento semelhante ao dos pericitos (Ratajczak et al., 2016; Rombouts et al., 2016).

Experiências *in vitro* demonstraram que a cocultura de DPSCs com células endoteliais como as células endoteliais de veia umbilical humana (*Human umbilical vein endothelial cells*, *HUVEC*), com ou sem “scaffold”, melhora significativamente a angiogénese. Estas redes vasculares precoces, denominadas “pré-vascularização”, são capazes de se anastomosar rapidamente com os vasos do hospedeiro após implantação *in vivo*, acelerando a vascularização do enxerto (Dissanayaka & Zhang, 2017).

Além disso, a hipoxia, comum nos tecidos lesionados, atua como um regulador essencial da angiogénese, estimulando a secreção de fatores pró-angiogénicos pelas DPSCs (Kim, 2021; Rombouts et al., 2016).

Em determinadas condições, também se podem diferenciar em células de Schwann e em oligodendrócitos, contribuindo para a neuroproteção e a neurorregeneração (Hussain et al., 2022; Lambrichts et al., 2017). Devido a sua origem, as DPSCs podem diferenciar-se em neurónios, células gliais, expressando marcadores específicos como GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) e a Nestina, e secretar fatores neurotróficos como BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) e o NGF (*Nerve Growth Factor*), promovendo o crescimento axonal e a neuroproteção (Kwack & Lee, 2022; Lambrichts et al., 2017).

Além disso, a expressão de vias de sinalização envolvidas na pluripotência (e.g. TGF- β , Wnt) e de redes epigenéticas complexas regula a sua capacidade de migração, autorrenovação e diferenciação (Zhou et al., 2020). Nestes factos, as DPSCs surgem como a fonte celular ideal para a regeneração funcional do tecido pulpo-dentinário.

2.3. “Scaffold”

A matriz extracelular (ECM) é um elemento-chave do microambiente celular. Trata-se não só de uma rede complexa de macromoléculas que fornece suporte estrutural aos tecidos, mas também de um regulador das funções celulares. Pode sequestrar ou integrar moléculas bioativas e sinais moleculares e, assim, influenciar a adesão, migração, proliferação e diferenciação das células (Bakhtiar et al., 2019; Zhang et al., 2017).

A substituição deste microambiente celular único é necessária enquanto se aguarda a criação de um tecido de substituição *in vivo* ou *in vitro*. Um material deste tipo é chamado de matriz ou “scaffold”, sendo um elemento estrutural que serve como suporte físico tridimensional para manter as células ou tecidos unidos. Reproduz fielmente o microambiente fisiológico do tecido-alvo ao mimetizar as propriedades da ECM nativa, fornecendo um ambiente temporário que favorece a adesão, sobrevivência e proliferação celular, até ser substituído pela nova matriz sintetizada pelas células do hospedeiro (Galler & Widbiller, 2017; Hu et al., 2023).

2.4. Fatores de crescimento

A capacidade de diferenciação das células estaminais depende da sua linhagem, mas também dos diferentes estímulos ambientais a que estão expostas, como os fatores de crescimento, a matriz extracelular ou ainda a hipóxia. O ambiente, incluindo os fatores de crescimento, é um fator crítico na regulação da diferenciação tecidual (Hargreaves et al., 2013).

Os fatores de crescimento são moléculas de sinalização bioativa que regulam o comportamento celular, nomeadamente das células estaminais, melhorando o seu efeito regenerador e a função reguladora (Xie et al., 2021). Têm a capacidade de acelerar a mobilização e o enxerto de células estaminais transplantadas, ao mesmo tempo que favorecem o recrutamento de células estaminais endógenas para os locais lesionados e melhoram a sua função regeneradora (Gong et al., 2016; Stefańska et al., 2024).

Além disso, são cruciais para a proliferação, migração e diferenciação celular, etapas essenciais no processo de regeneração tecidual (Hu et al., 2022). Assim, a utilização de fatores de crescimento apropriados deve ser estudada e compreendida para otimizar a regeneração do tecido pulpo-dentinário com as DPSCs (Siddiqui et al., 2022).

Após expor os fundamentos teóricos da regeneração endodôntica, tais como o potencial das DSCs, os biomateriais e os fatores de crescimento, torna-se essencial considerar a sua integração em protocolos terapêuticos. A análise da aplicação concreta destes fundamentos no âmbito da engenharia celular aplicada à endodontia permitirá avaliar os avanços técnicos atuais, bem como os obstáculos a superar para uma aplicação clínica.

3. Engenharia tecidual aplicada à endodontia

A engenharia de tecidos baseia-se na associação de três elementos: células estaminais, biomateriais (scaffolds) e fatores de crescimento (Xie et al., 2021). Esta área interdisciplinar combina biologia, ciência dos materiais e engenharia para propor terapias inovadoras e menos invasivas com o objetivo de preservar e restaurar a vitalidade pulpar (Costa et al., 2022). No contexto da endodontia regenerativa, o objetivo final é recriar um microambiente biomimético capaz de sustentar a proliferação, diferenciação e integração funcional das células transplantadas (Hu et al., 2023; Xie et al., 2021).

3.1. Papel das células estaminais da polpa

As células estaminais da polpa dentária estão hoje no centro das estratégias de regeneração tecidual. Estudos recentes confirmam a sua capacidade para regenerar a polpa dentária humana mesmo em contextos patológicos, como a pulpíte (Ghannam et al., 2023). Além disso, as DPSC mantêm o seu potencial regenerativo mesmo quando provenientes de tecidos envelhecidos ou inflamados (Hussain et al., 2022). A utilização isolada de células estaminais na terapêutica é frequentemente limitada por uma fraca integração funcional no tecido do hospedeiro, o que levou ao desenvolvimento de culturas celulares sobre matrizes (Bar et al., 2021).

3.2. Biomateriais e suportes estruturais

Na engenharia de tecidos, os suportes estruturais servem como suporte tridimensional para o crescimento, migração e diferenciação celular, imitando ao mesmo tempo a ECM nativa (Costa et al., 2022; Xie et al., 2021).

Os materiais utilizados como “scaffolds” em endodontia podem ser classificados em várias categorias. Distinguem-se os materiais naturais, como o colágeno, a gelatina, o alginato e a matriz extracelular descelularizada (dECM), que mantêm sinais bioativos reguladores; assim como a matriz dentinária tratada (TDM), derivada da dentina desmineralizada, rica em proteínas promotoras da dentinogénese, ou ainda o próprio

coágulo sanguíneo. E os materiais sintéticos, como hidrogéis, polímeros tais como o PLGA (*Poly Lactic-co-Glycolic Acid*) ou o PCL (*Polycaprolactone*), que permitem uma padronização, controlo da rigidez, da degradação e da libertação controlada de moléculas ativas (Hu et al., 2023; Xie et al., 2021).

Os suportes estruturais atuais podem ser carregados com fatores bioativos, impressos em 3D ou funcionalizados com propriedades antibacterianas (Hu et al., 2023). Em endodontia regenerativa, um “scaffold” ideal deve ser biocompatível, biodegradável de forma sincronizada com a reconstrução tecidual, pois o “scaffold” é temporário. A sua estrutura deve permitir a adesão, a penetração, a proliferação e a diferenciação das células estaminais (Bakhtiar et al., 2019). Para tal, a seleção da matriz deve ter em conta os seus parâmetros biológicos e físicos, garantindo o transporte de oxigénio e nutrientes (Bar et al., 2021). Por exemplo, para influenciar a diferenciação neurogénica das DPSC, as suas propriedades, assim como a condutividade elétrica e a interação com fibras nervosas, são fundamentais (Wei et al., 2022). Acima de tudo, o seu sistema de colocação deve ser adaptado às considerações anatómicas, pois a estrutura anatómica do canal radicular exige a utilização de um sistema injetável.

Um dos muitos desafios da aplicação da engenharia de tecidos ao domínio da endodontia é, por isso, a conceção de um “scaffold” que cumpra essas condições (Gong et al., 2016). Diferentes abordagens têm sido consideradas para o desenvolvimento de um “scaffold” adequado, como o plasma rico em plaquetas (PRP) e a fibrina rica em plaquetas (PRF).

3.2.1. PRP e PRF

O PRP é um concentrado plaquetário de primeira geração, preparado por centrifugação com anticoagulante, obtido a partir do próprio sangue do paciente. Apresenta, assim, um carácter autólogo, o que minimiza o risco de resposta imunológica indesejável (Gong et al., 2016; Zhu et al., 2012).

O PRP é capaz de formar uma matriz de fibrina tridimensional que serve de quadro estrutural temporário e de fonte rica em fatores de crescimento. As plaquetas presentes no PRP estão inicialmente inativas e de forma redonda, exigindo ativação. O PRP liberta rapidamente os seus fatores de crescimento nas primeiras 7 a 14 horas. Estudos *in vitro* demonstraram que o PRP pode melhorar a proliferação e a diferenciação das DPSC (Zhu et al., 2012).

A PRF é classificada como um concentrado plaquetário de segunda geração, também obtida a partir do sangue autólogo do paciente. Tem a vantagem de ser fácil de preparar, não requerendo anticoagulante nem ativação adicional, sendo considerada uma substância totalmente autogénica e natural. Uma característica chave da PRF é a libertação lenta e prolongada dos seus fatores de crescimento ao longo de 7 a 14 dias (Bakhtiar et al., 2019). Ambos têm a capacidade de liberar vários fatores de crescimento associados à regeneração vascular, como VEGF, PDGF, FGF-2, IGF-1 e TGF- β (Gong et al., 2016).

Apesar de resultados promissores, estudos referem que os resultados mostraram apenas melhorias modestas na cicatrização periapical, no espessamento da parede dentinária, no alongamento da raiz e no encerramento apical, sublinhando a necessidade de investigação adicional para compreender plenamente o seu mecanismo de ação e a natureza exata dos tecidos regenerados (Bakhtiar et al., 2019; Llaquet et al., 2017).

3.3. Factores de crescimento e ambiente regenerativo

O compromisso de linhagem e a diferenciação das células estaminais dentárias durante a reparação e regeneração do tecido dentina/polpa variam consideravelmente consoante múltiplos fatores. Para além dos seus perfis intrínsecos de expressão génica e epigenética, o destino celular das células estaminais derivadas da polpa dentária parece ser mais fortemente determinado pelas moléculas de sinalização bioativas presentes no microambiente local (Gong et al., 2016).

As fontes dos fatores de crescimento são diversas, incluindo as próprias células estaminais, a dentina, os materiais dos “scaffolds” e os concentrados plaquetários como o PRP e o PRF. Os fatores de crescimento regulam o comportamento celular induzindo a proliferação celular, a angiogénese e a neo-vascularização, a migração celular, bem como a diferenciação celular, nomeadamente a diferenciação odontogénica e osteogénica (Siddiqui et al., 2022; Luo et al., 2018).

Vários factores de crescimento são actualmente estudados ou utilizados em endodontia regenerativa pelos seus efeitos na polpa dentária.

3.3.1. BMP (*Bone Morphogenetic protein*)

As BMPs estão particularmente presentes na matriz extracelular óssea, mas também em muitos outros tipos de tecidos, incluindo a matriz dentinária, e podem ser sintetizadas por osteoblastos, condroblastos, células progenitoras, ameloblastos e odontoblastos. Três BMPs parecem estar particularmente envolvidas na iniciação do desenvolvimento dentário até à conclusão da morfogénese da coroa: BMP-2, 4 e 7. Estas induzem a diferenciação odontogénica e osteogénica, a angiogénese e a dentinogénese (Hu et al., 2023; Siddiqui et al., 2021).

3.3.2. FGF (*Fibroblast Growth Factor*)

Eles estimulam a proliferação celular em vários tecidos em desenvolvimento. Vários FGFs são expressos durante a odontogénese, nomeadamente o FGF-2. Este apresenta um forte potencial angiogénico, com capacidade de recrutar e permitir a proliferação das DPSCs sem necessariamente induzir a sua diferenciação. O FGF-2 melhora o desempenho das DPSC criopreservadas, a proliferação e a migração, ao mesmo tempo que aumenta a sobrevivência celular (Gong et al., 2016; Siddiqui et al., 2021). Regula a odontogénese e é libertado pelos fibroblastos pulpaes na sequência de uma lesão (Jeanneau et al., 2017). O FGF-2 induz a dentinogénese, favorece a cicatrização, acelera a regeneração dos tecidos e promove a neurogénese (Wei et al., 2022).

3.3.3. VEGF (*Vascular Endothelial Growth factor*)

É um dos principais fatores de crescimento pró-angiogénicos, com muitos impactos reguladores sobre a função celular neural e vascular, tais como a sobrevivência, a proliferação e a migração das células endoteliais, a diferenciação de células estaminais da polpa em células endoteliais e a brotação de vasos capilares nos locais de secreção (Silva et al., 2017). A secreção de VEGF pode ser aumentada para facilitar a cicatrização tecidual pelos fibroblastos pulpares e pelas DPSC em caso de lesão da polpa, expondo-as assim a condições de hipóxia (Gong et al., 2016).

Quando utilizado com o NGF e o BMP-7, pode induzir a recelularização e a formação de tecido dentário e de vasos (He et al., 2017).

3.3.4. PDGF (*Platelet-derived growth factor*)

É um fator de crescimento pró-angiogénico com capacidade para induzir a proliferação e migração celular. Durante a odontogénese, atua ao nível das interações entre o epitélio e o mesênquima dentário. Está presente em grande quantidade na matriz dentinária e pode ser secretado por diferentes tipos celulares, como as células endoteliais, promovendo a proliferação e migração de células perivasculares, bem como a formação de novos vasos. Também é secretado pelas DPSC, especialmente após uma lesão, para promover a diferenciação dos odontoblastos (Jeanneau et al., 2017; Jiang et al., 2025). Particularmente o PDGF-BB apresenta uma clara superioridade biológica na promoção da angiogénese, sobretudo na regeneração dos tecidos duros e moles da cavidade oral (Galarraga-Vinueza et al., 2023).

3.3.5. NGF (*Nerve Growth factor*) e BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*)

São fatores neurotróficos (NFs) envolvidos no desenvolvimento e na regeneração dos nervos, promovendo a sobrevivência, a proliferação e a diferenciação das células neuronais (Wei et al., 2022). O NGF e o BDNF modulam a inervação dentária durante a dentinogénese e podem ser secretados pelas DPSC, nomeadamente durante a inflamação

pulpar, contribuindo para a percepção da dor e promovendo o crescimento de fibras nervosas em direção à zona lesionada. Contribuem também para a angiogénese, a neuroproteção e a reinervação dos tecidos (Luo et al., 2018).

3.3.6. TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*)

O TGF- β está envolvido em processos fisiológicos essenciais como o desenvolvimento embrionário, a homeostase e a reparação tecidual. Pode ser sintetizado por diversos tipos celulares, incluindo as plaquetas, os macrófagos e os fibroblastos. Trata-se de um fator chave na regulação do comportamento das DPSC, induzindo a diferenciação odontogénica e permitindo, assim, a secreção de dentina reparadora (Jeanneau et al., 2017). Esta citocina também é produzida pelas próprias DPSC e desempenha um papel na imunossupressão e na regulação da angiogénese (Hossein-Khannazer et al., 2018; Hu et al., 2022).

Os factores de crescimento regulam a actividade celular e são essenciais para guiar a migração, proliferação e diferenciação das DPSC. As suas utilizações visam funções específicas, como a dentinogénese (e.g. BMP, FGF-2), a angiogénese (e.g. VEGF, PDGF) ou a neurogénese (e.g. NGF, BDNF). A combinação óptima destes factores, a sua dosagem e modo de entrega constituem ainda desafios clínicos (Xie et al., 2021).

3.4. Uma regeneração vasculo-nervosa integrada.

Os sistemas vascular e nervoso interagem estreitamente na polpa, nomeadamente através de circuitos de sinalização partilhados e de interdependências no desenvolvimento e regeneração (Bae & Yoshida, 2020). O sucesso da regeneração depende da conexão funcional dos novos tecidos, uma vez que uma rede vascular e nervosa funcional é indispensável para manter a viabilidade celular e restaurar as funções proprioceptivas e imunitárias do tecido pulpo-dentário (Hu et al., 2023; Zhang & Yelick, 2021).

Assim, a engenharia tecidual na regeneração pulpar visa a estimular simultaneamente a angiogénese e a neurogénese através da combinação de co-culturas celulares, “scaffolds” bioativos ou condutores, fatores de crescimento direcionados e microambientes que mimetizam condições nativas, como a hipóxia controlada ou a pré-vascularização *in vitro* (Rombouts et al., 2016). A engenharia tecidual da polpa dentária requer um “scaffold” apropriado, moléculas morfogenéticas e, crucialmente, o estabelecimento rápido de uma rede vascular funcional para fornecer oxigénio e nutrientes (Silva et al., 2017).

As DPSCs, como fonte celular capaz de contribuir para ambos os processos, apresentam-se como candidatas ideais para a regeneração funcional do tecido pulpo-dentinário, oferecendo a perspetiva de restaurar tanto a integridade estrutural como as funções sensoriais e metabólicas do dente (Dissanayaka & Zhang, 2017; Silva et al., 2017).

3.5. Estratégias emergentes e inovações técnicas

Novas abordagens visam a manipular o ambiente celular para melhorar as suas propriedades regenerativas. Com ajuda de sinais físicos, por exemplo manipular a rigidez da matriz, usar campos magnéticos, ou a fotobiomodulação por laser ou optogenética. Ou com os sistemas de microgravidade simulada, que favorecem a diferenciação odontogénica das DPSC. É também possível de modificar a oxigenação local, essencial para a sobrevivência celular, através de co-culturas, esferoides pré-vascularizados ou hidrogeis que libertam oxigénio. Finalmente, com a utilização de “scaffolds” antibacterianos, integrando agentes como o grafeno-cobre ou as microesferas Ca-Zn-Si (Hu et al., 2023).

O secretoma é definido como o conjunto de biomoléculas libertadas pelas células estaminais no meio extracelular. Inclui diversos fatores solúveis (citocinas, fatores de crescimento, enzimas, etc.) e vesículas extracelulares, como os exossomas, que são considerados mediadores importantes da comunicação intercelular. A composição do secretoma varia consoante as condições de cultura e o ambiente celular. Os efeitos terapêuticos do secretoma das células estaminais são mediados pelos seus mecanismos

parácrinos. As suas moléculas bioativas possuem múltiplas propriedades, incluindo efeitos neuroprotetores, anti-inflamatórios, anti-apoptóticos, angiogénicos, imunomoduladores e neurotróficos, tornando-o uma ferramenta promissora para a regeneração tecidular (Bar et al., 2021).

Neste contexto, a integração do secretoma ou das células estaminais em “scaffolds” representa um avanço importante na medicina regenerativa e na engenharia tecidular. Existem duas abordagens principais para esta combinação:

- A abordagem celular (Cell-based), na qual as células estaminais são semeadas e cultivadas numa matriz apropriada *in vitro*, permitindo a produção de um tecido antes da implantação.
- A abordagem acelular (Cell-free), onde a matriz é combinada com componentes bioativos do secretoma (fatores de crescimento e de diferenciação, exossomas, etc.) e implantada nos tecidos, induzindo o recrutamento de células estaminais residentes e favorecendo a sua proliferação e diferenciação (Bar et al., 2021).

Esta diferenciação de abordagens ganha ainda mais importância quando aplicada ao contexto clínico da endodontia regenerativa na qual existe alguma confusão em torno da terminologia utilizada. Termos como revitalização e revascularização são frequentemente utilizados, mas não existe um consenso claro quanto ao seu verdadeiro significado. Lin et al. propõem clarificar essa distinção utilizando a seguinte terminologia: terapia endodôntica regenerativa sem células (*Cells-Free Regenerative Endodontic Therapy*, CF-RET) e terapia endodôntica regenerativa baseada em células (*Cells-Based Regenerative Endodontic Therapy*, CB-RET). A diferença entre ambas reside na presença ou ausência de administração exógena de células (Lin et al., 2021).

3.5.1. Abordagem “Cell-free”

A CF-RET é atualmente a abordagem praticada clinicamente em endodontia regenerativa (Meschi et al., 2020). Este conceito baseia-se no recrutamento de células estaminais endógenas a partir dos tecidos periapicais circundantes, através de um processo designado por “*cell homing*”, que pode ser traduzido como “migração celular guiada” (He et al., 2017).

O protocolo implica geralmente, os seguintes passos:

1. A eliminação dos tecidos necrosados/infectados, seguida de uma desinfecção adequada do espaço do canal com soluções irrigadoras como o hipoclorito de sódio e o EDTA, seguido de medicação intracanal, como o hidróxido de cálcio (Murray, 2022; Llaquet et al., 2017). A utilização de EDTA permite a desmineralização da dentina e induz a libertação de fatores de crescimento endógenos retidos na matriz dentinária (Galler et al., 2015).
2. Posteriormente, procede-se à indução intencional de hemorragia no espaço do canal, ultrapassando o ápice com uma lima manual (Botero et al., 2017). O objetivo da indução de hemorragia periapical no interior do canal radicular é a formação de um coágulo sanguíneo que atuará como um *scaffold*, além de introduzir células estaminais endógenas e fatores de crescimento bioativos (Lin et al., 2021).
3. De seguida, realiza-se a colocação de uma barreira sobre o coágulo, utilizando materiais como MTA, Biodentine ou outros cimentos à base de silicato de cálcio, para selar o espaço canal e prevenir a recontaminação (Llaquet et al., 2017).
4. Finalmente, a realização de uma restauração coronária definitiva, para garantir o selamento a longo prazo (Bakhtiar et al., 2019).

Em alguns casos, radiograficamente, pode observar-se um aumento da espessura das paredes do canal, um alongamento radicular e o encerramento apical, sugerindo a

continuação do desenvolvimento radicular. No entanto, os exames histológicos de dentes tratados por CF-RET mostram frequentemente a formação de tecido fibroso, de cimento ou de osso, em vez de tecido pulpar nativo, o que se interpreta como um processo de reparação, e não de verdadeira regeneração. Assim, a CF-RET é descrita como um processo de reparação pulpar guiada, e não como uma regeneração pulpar propriamente dita (Lin et al., 2021).

O estudo de Peng et al., nos casos de dentes necróticos, sugere que as principais células estaminais de origem dentária presentes no coágulo sanguíneo são as SCAPs, que migraram da papila apical para os canais radiculares aquando da indução da hemorragia, sendo que as DPSCs poderão ter sido destruídas pela infeção e/ou pelos agentes de desinfecção. Isto levou ao desenvolvimento da teoria segundo a qual a sobrevivência da bainha epitelial de Hertwig e da papila apical poderá ser crucial para a regeneração de tecido tipo pulpar. Os autores sugerem também que a formação de tecido tipo cementário poderá dever-se a um microambiente não pulpar, que favorece a regeneração periodontal, ou à migração de MSCs dos tecidos periapicais através da hemorragia induzida, o que leva a pensar que a papila apical vital tem um potencial limitado de regeneração pulpar, e que a regeneração periodontal pode sobrepor-se à regeneração pulpar (Peng et al., 2017).

3.5.2. Abordagem “Cell-Based”

A CB-RET corresponde ao conceito moderno de engenharia tecidual aplicada à endodontia. Esta abordagem envolve a administração exógena de células, frequentemente células estaminais autólogas ou alogénicas, bem como “scaffolds” desenhados e fatores de crescimento no espaço do canal radicular. Atualmente, esta técnica encontra-se em fase de ensaios clínicos. Estudos em modelos animais sugerem que a CB-RET é capaz de regenerar completamente o tecido pulpar e de promover a deposição de tecido semelhante à dentina (Lin et al., 2021).

De facto, estudos recentes sugerem que a matriz extracelular da polpa bovina, após descélularização, pode constituir um “scaffold” promissor para a regeneração da polpa dentária (Costa et al., 2022). O estudo de Bakhtiar et al. desenvolveu e caracterizou com

sucesso um “scaffold” macroporoso reticulado, derivado da matriz extracelular da polpa bovina descelularizada. Estes resultados evidenciam o potencial das matrizes extracelulares xenogénicas como ferramentas promissoras na regeneração da polpa dentária (Bakhtiar et al., 2019). No entanto, as fontes xenogénicas apresentam um risco imunogénico que deve ser minimizado por um processo de descelularização eficaz (Murray, 2022).

A CB-RET permanece em fase de ensaios clínicos e ainda não é recomendada para uso clínico de rotina pelas sociedades AAE e ESE, devido às complexidades associadas ao isolamento celular, à expansão *ex vivo*, às regulamentações aplicáveis e aos custos envolvidos (Lin et al., 2021).

3.6. Obstáculos actuais e perspectivas clínicas

A endodontia regenerativa mostra avanços significativos em endodontia, no entanto, muitos desafios persistem e impedem a sua aplicação clínica em larga escala e a sua eficácia a longo prazo.

3.6.1. Limitações clínicas e biológicas

Os critérios de seleção dos casos são extremamente importantes para o sucesso da regeneração endodôntica. Um desses critérios cruciais é a idade do paciente, que influencia diretamente o benefício esperado e o prognóstico do tratamento. A terapia endodôntica regenerativa é geralmente recomendada para pacientes com idades entre 6 e 17 anos, sendo esta indicada para dentes permanentes imaturos com um forame apical amplamente aberto (idealmente $> 1,1$ mm) e cuja polpa se encontra necrótica ou afetada por pulpíte irreversível. No entanto, mesmo em casos favoráveis, o insucesso pode ocorrer devido a uma desinfecção inadequada ou à ausência de um ambiente apropriado, incluindo a presença de células progenitoras intactas, uma vascularização eficaz ou um “scaffold” funcional (Murray, 2022).

Além disso, os clínicos enfrentam desafios como o comportamento do paciente e as características anatômicas dos dentes imaturos, tais como paredes radiculares finas e a ausência de constrição apical (Botero et al., 2017).

3.6.2. Desinfecção e toxicidade

Em endodontia, as infecções não se limitam aos tecidos moles, mas estendem-se profundamente aos túbulos dentinários. No entanto, os agentes utilizados para a desinfecção podem alterar a viabilidade e o potencial de diferenciação das células estaminais, afetar a biodisponibilidade dos fatores de crescimento endógenos e modificar as propriedades dos "scaffolds". Assim, na endodontia regenerativa, a tríade clássica da engenharia tecidual transforma-se num quarteto com a adição das necessidades de desinfecção e desintoxicação (Diogenes & Hargreaves, 2017).

As estratégias antimicrobianas tradicionais colocam desafios na endodontia regenerativa. O hipoclorito de sódio, um agente antimicrobiano potente e amplamente utilizado, pode interferir com a adesão das células estaminais à dentina e com a eficácia dos fatores de crescimento derivados da dentina. A utilização de antibióticos em altas concentrações é necessária contra os biofilmes, mas pode ser tóxica para as células estaminais, inibindo o seu crescimento e levando à sua morte. Por outro lado, o EDTA é indicado, pois favorece a adesão e diferenciação das células estaminais (Botero et al., 2017).

No que diz respeito ao grau de desinfecção necessário, é reconhecido que os procedimentos não conduzem a uma esterilização completa, sugerindo um limiar de contaminação tolerável. Atualmente, é fundamental encontrar um equilíbrio entre a eficácia antimicrobiana e a citotoxicidade (Fouad, 2017).

3.6.3. Protocolos atuais

As abordagens terapêuticas atuais variam consideravelmente entre os profissionais, tanto nos métodos de irrigação como na escolha do medicamento intracanal, do material de proteção pulpar ou do tipo de "scaffold" utilizado (Botero et

al., 2017). Além disso, as recomendações clínicas atuais baseiam-se em estudos *in vitro* ou em relatos de casos isolados, o que limita a sua fiabilidade (Siddiqui et al., 2021).

A seleção do tratamento mais apropriado depende de um diagnóstico diferencial preciso, baseado no estado de vitalidade pulpar e na fase de desenvolvimento radicular (Murray, 2022). No entanto, persistem obstáculos à transposição clínica, como os constrangimentos regulamentares, a dificuldade de isolamento celular e a necessidade de bancos de células e instalações certificadas (Kim, 2021).

Apesar dos avanços, subsistem desafios significativos no campo da endodontia regenerativa, nomeadamente a escassez de dados sobre a eficácia a longo prazo, a prevenção eficaz da contaminação bacteriana e a formação de novas estruturas dentinárias organizadas (Siddiqui et al., 2021).

3.6.4. Perspectivas futuras

Apesar destas dificuldades, as perspectivas permanecem promissoras. A investigação está focada no desenvolvimento de protocolos mais padronizados, na conceção de biomateriais inovadores que favoreçam a regeneração funcional e na otimização das estratégias antimicrobianas. A necessidade de dados clínicos sólidos é crucial: são necessários ensaios clínicos randomizados e de alta qualidade para validar a segurança e a eficácia destas abordagens (Kim, 2021).

Os progressos recentes demonstram que uma regeneração funcional da polpa dentária é possível, combinando DPSCs, biomateriais e estimulação epigenética (Duncan, 2019; Hussain et al., 2022). O estudo piloto de Nakashima et al. mostrou, em particular, a viabilidade da regeneração da polpa humana através da mobilização autóloga de DPSCs (Nakashima et al., 2017).

A engenharia de tecidos aplicada à endodontia impõe-se como uma mudança de paradigma terapêutico, centrada na preservação da vitalidade pulpar, da função sensorial, da defesa imunitária e da regeneração fisiológica do dente (Duncan, 2019; Zhang & Yelick, 2021).

III- CONCLUSÃO

A regeneração endodôntica apresenta-se hoje como uma abordagem terapêutica inovadora e promissora, particularmente para os dentes permanentes imaturos. Em oposição aos tratamentos convencionais centrados na desinfecção e obturação dos canais radiculares, esta estratégia visa a restauração de um tecido pulpar vivo, funcional e vascularizado, capaz de completar o desenvolvimento radicular, assegurar a defesa imunitária e manter a homeostasia dentária.

Nesta estratégia, destacam-se as células estaminais de origem dentária, nomeadamente as DPSCs. Estas apresentam um perfil celular que lhes permite substituir os odontoblastos destruídos, bem como sustentar a angiogénese, a neuroproteção e modular a inflamação local, condições essenciais para uma cicatrização tecidular eficaz. Através do seu secretoma, as DPSCs exercem efeitos parácrinos poderosos, capazes de ativar as células residentes, favorecer a migração, proliferação e diferenciação celulares, encorajando assim uma regeneração tecidular endógena.

Apesar destes avanços, subsistem vários obstáculos, como a variabilidade dos protocolos clínicos e a falta de dados de longo prazo sobre a eficácia clínica. O sucesso desta abordagem depende de uma melhor standardização dos protocolos, de uma seleção rigorosa dos casos e do desenvolvimento de biomateriais específicos que mimetizam o ambiente nativo da polpa.

BIBLIOGRAFIA

Álvarez-Vásquez, J. L., & Castañeda-Alvarado, C. P. (2022). Dental pulp fibroblast : a star cell. *Journal Of Endodontics*, 48(8), 1005-1019.

Bae, Y., & Yoshida, A. (2020). Morphological foundations of pain processing in dental pulp. *Journal Of Oral Science*, 62(2), 126-130.

Bakhtiar, H., Pezeshki-Modaress, M., Kiaipour, Z., Shafiee, M., Ellini, M. R., Mazidi, A., Rajabi, S., Benisi, S. Z., Ostad, S. N., Galler, K., Pakshir, P., Azarpazhooh, A., & Kishen, A. (2019). Pulp ECM-derived macroporous scaffolds for stimulation of dental-pulp regeneration process. *Dental Materials*, 36(1), 76-87.

Bar, J. K., Lis-Nawara, A., & Grelewski, P. G. (2021). Dental Pulp Stem Cell-Derived Secretome and Its Regenerative Potential. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(21), 12018.

Bjørndal, L., Simon, S., Tomson, P. L., & Duncan, H. F. (2019). Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*, 52(7), 949-973.

Botero, T. M., Tang, X., Gardner, R., Hu, J. C., Boynton, J. R., & Holland, G. R. (2017). Clinical Evidence for Regenerative Endodontic Procedures : Immediate versus Delayed Induction ? *Journal Of Endodontics*, 43(9), S75-S81.

Chung, G., Jung, S., & Oh, S. (2013). Cellular and Molecular Mechanisms of Dental Nociception. *Journal Of Dental Research*, 92(11), 948-955.

Cooper, P. R., Chicca, I. J., Holder, M. J., & Milward, M. R. (2017). Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex : Net Gain or Net Loss ? *Journal Of Endodontics*, 43(9), S87-S94.

Cooper, P. R., Holder, M. J., & Smith, A. J. (2014). Inflammation and Regeneration in the Dentin-Pulp Complex : A Double-edged Sword. *Journal Of Endodontics*, 40(4), S46-S51.

Costa, L. A., Eiro, N., Vaca, A., & Vizoso, F. J. (2022). Towards a New Concept of Regenerative Endodontics Based on Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretomes Products. *Bioengineering*, 10(1), 4.

Demarco, F. F., Conde, M. C. M., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal*, 22(1), 3-13.

Ding, D., Shyu, W., & Lin, S. (2011). Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5-14.

Diogenes, A., & Hargreaves, K. M. (2017). Microbial Modulation of Stem Cells and Future Directions in Regenerative Endodontics. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S95-S101.

Dissanayaka, W. L., & Zhang, C. (2017). The Role of Vasculature Engineering in Dental Pulp Regeneration. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S102-S106.

Duncan, H. F., Galler, K. M., Tomson, P. L., Simon, S., El-Karim, I., Kundzina, R., Krastl, G., Dammaschke, T., Fransson, H., Markvart, M., Zehnder, M., & Bjørndal, L. (2019). European Society of Endodontology position statement : Management of deep caries and the exposed pulp. *International Endodontic Journal*, 52(7), 923-934.

Farges, J., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A. J., & Cooper, P. R. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Of Inflammation*, 2015(1).

Fouad, A. F. (2017). Microbial Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S46-S50.

Galarraga-Vinueza, M. E., Barootchi, S., Nevins, M. L., Nevins, M., Miron, R. J., & Tavelli, L. (2023). Twenty-five years of recombinant human growth factors rhPDGF-BB and rhBMP-2 in oral hard and soft tissue regeneration. *Periodontology 2000*, 94(1), 483-509.

Galler, K. M., Buchalla, W., Hiller, K., Federlin, M., Eidt, A., Schiefersteiner, M., & Schmalz, G. (2015). Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. *Journal Of Endodontics*, 41(3), 363-368.

Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(3), 1480.

Galler, K. M., & Widbiller, M. (2017). Perspectives for Cell-homing Approaches to Engineer Dental Pulp. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S40-S45.

Ghannam, M. G., Alameddine, H., & Bordoni, B. (2023, agosto 8). *Anatomy, Head and Neck, Pulp (Tooth)*. StatPearls - NCBI Bookshelf.

Goldberg, M. (2010). Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers In Bioscience-Elite*, E3(2), 711-735.

Gong, T., Heng, B. C., Lo, E. C. M., & Zhang, C. (2016). Current Advance and Future Prospects of Tissue Engineering Approach to Dentin/Pulp Regenerative Therapy. *Stem Cells International*, 2016(1).

Granz, C. L., & Gorji, A. (2020). Dental stem cells : The role of biomaterials and scaffolds in developing novel therapeutic strategies. *World Journal Of Stem Cells*, 12(9), 897-921.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(25), 13625-13630.

Hargreaves, K. M., Diogenes, A., & Teixeira, F. B. (2013). Treatment Options : Biological Basis of Regenerative Endodontic Procedures. *Journal Of Endodontics*, 39(3), S30-S43.

He, L., Kim, S. G., Gong, Q., Zhong, J., Wang, S., Zhou, X., Ye, L., Ling, J., & Mao, J. (2017). Regenerative Endodontics for Adult Patients. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S57-S64.

Hossein-Khannazer, N., Hashemi, S. M., Namaki, S., Ghanbarian, H., Sattari, M., & Khojasteh, A. (2018). Study of the immunomodulatory effects of osteogenic differentiated human dental pulp stem cells. *Life Sciences*, 216, 111-118.

Hu, N., Li, W., Jiang, W., Wen, J., & Gu, S. (2023). Creating a Microenvironment to Give Wings to Dental Pulp Regeneration—Bioactive Scaffolds. *Pharmaceutics*, 15(1), 158.

Hussain, A., Tebyaniyan, H., & Khayatan, D. (2022). The Role of Epigenetic in Dental and Oral Regenerative Medicine by Different Types of Dental Stem Cells : A Comprehensive Overview. *Stem Cells International*, 2022, 1-15.

Janebodin, K., Zeng, Y., Buranaphathana, W., Ieronimakis, N., & Reyes, M. (2013). VEGFR2-dependent Angiogenic Capacity of Pericyte-like Dental Pulp Stem Cells. *Journal Of Dental Research*, 92(6), 524-531.

Jeanneau, C., Lundy, F. T., Karim, I. A. E., & About, I. (2017). Potential Therapeutic Strategy of Targeting Pulp Fibroblasts in Dentin-Pulp Regeneration. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S17-S24.

Jiang, W., Duan, S., Li, W., Yan, H., Si, C., Xu, N., Li, Y., Zhang, W., & Gu, S. (2025). PDGF-BB overexpressing dental pulp stem cells improve angiogenesis in dental pulp regeneration. *Frontiers In Bioengineering And Biotechnology*, 13.

Kahler, B., Taha, N., Lu, J., & Saoud, T. (2023). Vital pulp therapy for permanent teeth with diagnosis of irreversible pulpitis : biological basis and outcome. *Australian Dental Journal*, 68(S1).

Karamifar, K., Tondari, A., & Saghiri, M. A. (2020). Endodontic Periapical Lesion : An Overview on Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *European Endodontic Journal*.

Kaur, B. P., & Secord, E. (2021). Innate immunity. *Immunology And Allergy Clinics Of North America*, 41(4), 535-541.

Kawashima, N., Noda, S., Yamamoto, M., & Okiji, T. (2017). Properties of Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S31-S34.

Kim, S. G. (2021). A Cell-Based Approach to Dental Pulp Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells : A Scoping Review. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(9), 4357.

Kunimatsu, R., Nakajima, K., Awada, T., Tsuka, Y., Abe, T., Ando, K., Hiraki, T., Kimura, A., & Tanimoto, K. (2018). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth, dental pulp, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 501(1), 193-198.

Kwack, K. H., & Lee, H. (2022). Clinical Potential of Dental Pulp Stem Cells in Pulp Regeneration : Current Endodontic Progress and Future Perspectives. *Frontiers In Cell And Developmental Biology*, 10.

Lambrichts, I., Driesen, R. B., Dillen, Y., Gervois, P., Ratajczak, J., Vangansewinkel, T., Wolfs, E., Bronckaers, A., & Hilkens, P. (2017). Dental Pulp Stem Cells : Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S12-S16.

Li, P., Ou, Q., Shi, S., & Shao, C. (2023). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells/dental stem cells and their therapeutic applications. *Cellular And Molecular Immunology*, 20(6), 558-569.

Lin, L. M., Huang, G. T., Sigurdsson, A., & Kahler, B. (2021). Clinical cell-based versus cell-free regenerative endodontics : clarification of concept and term. *International Endodontic Journal*, 54(6), 887-901.

Llaquet, M., Mercadé, M., & Plotino, G. (2017). Regenerative endodontic procedures : a review of the literature and a case report of an immature central incisor. *Giornale Italiano Di Endodonzia*, 31(2), 65-72.

Luo, L., He, Y., Wang, X., Key, B., Lee, B. H., Li, H., & Ye, Q. (2018). Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. *Stem Cells International*, 2018, 1-15.

Mattei, V., Santacroce, C., Tasciotti, V., Martellucci, S., Santilli, F., Manganeli, V., Piccoli, L., Misasi, R., Sorice, M., & Garofalo, T. (2015). Role of lipid rafts in neuronal differentiation of dental pulp-derived stem cells. *Experimental Cell Research*, 339(2), 231-240.

Ménard, C., & Tarte, K. (2011). Immunosuppression et cellules souches mésenchymateuses. *Médecine/Sciences*, 27(3), 269-274.

Meschi, N., Patel, B., & Ruparel, N. B. (2020). Material Pulp Cells and Tissue Interactions. *Journal Of Endodontics*, 46(9), S150-S160.

Meza, G., Urrejola, D., Jean, N. S., Inostroza, C., López, V., Khoury, M., & Brizuela, C. (2019). Personalized Cell Therapy for Pulpitis Using Autologous Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte Platelet-rich Fibrin : A Case Report. *Journal Of Endodontics*, 45(2), 144-149.

Mitsiadis, T., Feki, A., Papaccio, G., & Catón, J. (2011). Dental Pulp Stem Cells, Niches, and Notch Signaling in Tooth Injury. *Advances In Dental Research*, 23(3), 275-279.

Murray, P. E. (2022). Review of guidance for the selection of regenerative endodontics, apexogenesis, apexification, pulpotomy, and other endodontic treatments for immature permanent teeth. *International Endodontic Journal*, 56(S2), 188-199.

Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Aiji, 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).

Nuti, N., Corallo, C., Chan, B. M. F., Ferrari, M., & Gerami-Naini, B. (2016). Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells : a Literature Review. *Stem Cell Reviews And Reports*, 12(5), 511-523.

Peng, C., Zhao, Y., Wang, W., Yang, Y., Qin, M., & Ge, L. (2017). Histologic Findings of a Human Immature Revascularized/Regenerated Tooth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *Journal Of Endodontics*, 43(6), 905-909.

Pohl, S., Akamp, T., Smeda, M., Uderhardt, S., Besold, D., Krastl, G., Galler, K. M., Buchalla, W., & Widbiller, M. (2024). Understanding dental pulp inflammation : from signaling to structure. *Frontiers In Immunology*, 15.

Ratajczak, J., Bronckaers, A., Dillen, Y., Gervois, P., Vangansewinkel, T., Driesen, R. B., Wolfs, E., Lambrichts, I., & Hilken, P. (2016). The Neurovascular Properties of Dental Stem Cells and Their Importance in Dental Tissue Engineering. *Stem Cells International*, 2016(1).

Rathee, M., & Jain, P. (2023, 25 juillet). *Embryology, teeth*. StatPearls - NCBI Bookshelf.

Rechenberg, D., Galicia, J. C., & Peters, O. A. (2016). Biological Markers for Pulpal Inflammation : A Systematic Review. *PLoS ONE*, 11(11), e0167289.

Ricucci, D., Loghin, S., Niu, L., & Tay, F. R. (2018). Changes in the radicular pulp-dentine complex in healthy intact teeth and in response to deep caries or restorations : A histological and histobacteriological study. *Journal Of Dentistry*, 73, 76-90.

Rombouts, C., Giraud, T., Jeanneau, C., & About, I. (2016). Pulp Vascularization during Tooth Development, Regeneration, and Therapy. *Journal Of Dental Research*, 96(2), 137-144.

Shah, D., Lynd, T., Ho, D., Chen, J., Vines, J., Jung, H., Kim, J., Zhang, P., Wu, H., Jun, H., & Cheon, K. (2020). Pulp–Dentin Tissue Healing Response : A Discussion of Current Biomedical Approaches. *Journal Of Clinical Medicine*, 9(2), 434.

Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273-2280.

Shi, J., Teo, K. Y. W., Zhang, S., Lai, R. C., Rosa, V., Tong, H. J., Duggal, M. S., Lim, S. K., & Toh, W. S. (2023). Mesenchymal stromal cell exosomes enhance dental pulp cell functions and promote pulp-dentin regeneration. *Biomaterials And Biosystems*, 11, 100078.

Siddiqui, Z., Acevedo-Jake, A. M., Griffith, A., Kadincesme, N., Dabek, K., Hindi, D., Kim, K. K., Kobayashi, Y., Shimizu, E., & Kumar, V. (2021). Cells and material-based strategies for regenerative endodontics. *Bioactive Materials*, 14, 234-249.

Silva, G. O., Zhang, Z., Cucco, C., Oh, M., Camargo, C. H., & Nör, J. E. (2017). Lipoprotein Receptor-related Protein 6 Signaling is Necessary for Vasculogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal Of Endodontics*, 43(9), S25-S30.

Stefańska, K., Volponi, A. A., Kulus, M., Waśko, J., Farzaneh, M., Grzelak, J., Azizidoost, S., Mozdziak, P., Bukowska, D., Antosik, P., Zabel, M., Podhorska-Okolów, M., Dzięgiel, P., Szcześniak, M., Woszczyk, M., & Kempisty, B. (2024). Dental pulp stem cells – A basic research and future application in regenerative medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 178, 116990.

Su, W., Chiou, W., Yu, H., & Huang, T. (2015). Differentiation potential of SHEDs using biomimetic periosteum containing dexamethasone. *Materials Science And Engineering C*, 58, 1036-1045.

Thesleff, I. (2013). Current understanding of the process of tooth formation : transfer from the laboratory to the clinic. *Australian Dental Journal*, 59(s1), 48-54.

Wei, Y., Lyu, P., Bi, R., Chen, X., Yu, Y., Li, Z., & Fan, Y. (2022). Neural Regeneration in Regenerative Endodontic Treatment : An Overview and Current Trends. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(24), 15492.

Xie, Z., Shen, Z., Zhan, P., Yang, J., Huang, Q., Huang, S., Chen, L., & Lin, Z. (2021). Functional Dental Pulp Regeneration : Basic Research and Clinical Translation. *International Journal Of Molecular Sciences*, 22(16), 8991.

Zhang, W., & Yelick, P. C. (2021). Tooth Repair and Regeneration : Potential of Dental Stem Cells. *Trends In Molecular Medicine*, 27(5), 501-511.

Zhang, X., Li, H., Sun, J., Luo, X., Yang, H., Xie, L., Yang, B., Guo, W., & Tian, W. (2017). Cell-derived micro-environment helps dental pulp stem cells promote dental pulp regeneration. *Cell Proliferation*, 50(5).

Zhou, D., Gan, L., Peng, Y., Zhou, Y., Zhou, X., Wan, M., Fan, Y., Xu, X., Zhou, X., Zheng, L., & Du, W. (2020). Epigenetic Regulation of Dental Pulp Stem Cell Fate. *Stem Cells International*, 2020, 1-16.

Zhu, X., Zhang, C., Huang, G. T., Cheung, G. S., Dissanayaka, W. L., & Zhu, W. (2012). Transplantation of Dental Pulp Stem Cells and Platelet-rich Plasma for Pulp Regeneration. *Journal Of Endodontics*, 38(12), 1604-1609.

