



U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**“UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA REGENERAÇÃO
DE TECIDOS DENTÁRIOS: ARTIGO DE REVISÃO ”**

Cíntia dos Santos Vilar

Porto, 2020





FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**“UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS NA REGENERAÇÃO
DE TECIDOS DENTÁRIOS: ARTIGO DE REVISÃO ”**

Revisão Bibliográfica de Mestrado Integrado em Medicina Dentária
apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Orientador

Paulo Rui Galvão Ribeiro de Melo

Professor Associado

pmelo@fmd.up.pt

Coorientador

Álvaro Amadeu Ferreira de Azevedo

Professor Auxiliar

aazevedo@fmd.up.pt

Estudante

Cíntia dos Santos Vilar

up201602923@fmd.up.pt

Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
Rua Dr. Manuel Pereira da Silva, 4200-392 Porto, Portugal

Porto, 2020

Agradecimentos

A realização deste trabalho nunca teria sido possível sem a contribuição, incentivo e empenho de várias pessoas. Assim, gostaria de expressar toda a minha gratidão a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para tal. A todos, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Rui Galvão de Melo, por toda a sua disponibilidade e dedicação neste projeto. Muito obrigada pela orientação, motivação e paciência, e por ter sempre acreditado nas minhas capacidades. Será sempre uma referência na minha vida profissional e não só.

Ao meu coorientador, Professor Álvaro Amadeu Ferreira de Azevedo por ter aceitado entrar nesta aventura apesar de todas as alterações a meio do caminho.

À Professora Maria do Rosário Filipe da Costa, por toda a ajuda e disponibilidade.

Aos meus pais, Cristiana e Manuel, por serem os melhores do mundo. A vocês devo tudo aquilo que sou hoje e agradeço, do fundo do coração, todo o apoio incondicional que sempre me deram. Obrigada pela força, pelo carinho e principalmente, por acreditarem sempre em mim. Mais uma etapa que chegou ao fim e, com certeza, não seria possível sem vocês. Amo-vos.

Às minhas irmãs, Débora, Nicole e Bárbara, por existirem. Vocês são o que de mais bonito tenho na minha vida e sem o vosso apoio nada disto seria possível. Obrigada por tudo!

Ao Alex, pelo apoio incondicional e paciência. Obrigada pela força que sempre me deste e por estares sempre comigo. Tens sempre as palavras certas no momento certo. Por não me deixares desistir. Obrigada por todo o amor e dedicação. Muito, muito obrigada!

À minha amiga, binómia e colega de casa Sara Rodrigues, por todos estes anos de companheirismo e amizade. Por seres como és e me apoiares sempre. Por toda a paciência que tiveste comigo e todos os momentos e aventuras vividas ao longo destes anos. És uma amiga para a vida, obrigada!

Às minhas amigas Marta Ramos, Lara Cruz e Catarina Teixeira, obrigada pela vossa amizade, pelo apoio, por todos os momentos vividos ao longo deste percurso, por estarem sempre disponíveis para ajudar e por tornarem tudo muito mais fácil.

A Todos, Muito Obrigada!

Índice

Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Figuras	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	vii
Resumo	x
Abstract	x
Introdução	11
Materiais e Métodos	14
Desenvolvimento.....	16
I. Dentina.....	16
a. Complexo Dentino-Pulpar	16
II. Regeneração da Dentina	25
1. Engenharia de Tecidos.....	25
a. Células estaminais.....	25
b. Scaffolds.....	29
c. Fatores de crescimento.....	33
d. Marcadores.....	34
Perspetivas Futuras	36
Conclusões	38
Referências	39
Anexos	43
Declaração De Autoria Do Trabalho Apresentado	44
Parecer Do Orientador Para Entrega Definitiva Do Trabalho Apresentado	45
Parecer Da Comissão Científica.....	46

Índice de Tabelas

TABELA I. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA	14
TABELA II. ESQUEMA DA PESQUISA BIBLIOGRÁFICA EFETUADA NA BASE DE DADOS PUBMED®, MEDLINE®, B-ON®, SCIELO®, WEB OF SCIENCE®, RESEARCH GATE®, EBD®	15
TABELA III. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO	18
TABELA IV. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.).....	19
TABELA V. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.)	20
TABELA VI. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.)	21
TABELA VII. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.).....	22
TABELA VIII. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.)	23
TABELA IX. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO (CONT.).....	24
TABELA X. CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DE ORIGEM DENTÁRIA.(3, 17-19, 23-25, 54-56)	26

Índice de Figuras

FIGURA 1. TIPOS DE CÉLULAS ESTAMINAIS ORIGINÁRIAS DOS TECIDOS DENTÁRIOS. ADAPTADO (19).....	12
FIGURA 2. ESTRUTURA E DIFERENCIAÇÃO DENTÁRIA. ADAPTADO: (3).....	13

Lista de abreviaturas e siglas

- ESCs – Células estaminais Embrionárias
- ASCs – Células estaminais Adultas
- iPSCs – Células estaminais pluripotentes induzidas
- DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária
- SHEDs – Células estaminais da Polpa Dentária de Dentes decíduos
- DFPCs – Células estaminais do Folículo Dentário
- SCAPs – Células estaminais da Papila Apical
- PDLCs – Células estaminais do Ligamento Periodontal
- DPCs – Células da Papila Dentária
- BMSCs – Células estaminais Mesenquimais do Osso Alveolar
- TGPCs – Células estaminais do Gérmen Dentário
- GMSCs – Células estaminais mesenquimais derivadas da Gengiva
- PLLA – Ácido Polilático
- MEPE – Matriz extracelular fosfo-glico-proteína
- DDM – Matriz dentinária tratada

HA-TCP – Fosfato de hidroxiapatite tricálcico
BMP-2 – Proteína morfogenética óssea 2
TGF- β 1 – Fator de crescimento β 1
bFGF – Fator de crescimento fibroblástico
DSPP – Sialofosfoproteína de dentinária
DMP-1 – Fosfoproteína ácida 1
BSP – Sialoproteína óssea
OCN – Osteocalcina
TDM – Matriz dentinária tratada
hTD – Matriz dentinária tratada
Sigma – Mitocondria humana
BMACAC - Biomembrana composta por quitosano e colagénio, contendo aluminato de cálcio como fase mineral
PCL – Policaprolactona
EMPs – Extratos de esmalte imaturo de dentes de porco
GdnHCl – Cloreto de Guanidina
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
IP- DPSCs – Células estaminais isoladas de dentes com pulpíte irreversível
TNF- α – Fator alfa
IFN- γ – Interferão Gamma
LLLI – Irradiação com laser de baixa intensidade
PBM – Fotobiomodulação
Sema3A – Semaforina 3A
ALP – Fosfatase alcalina
PMMA – Polimetil-metacrilato microtubular
PLGA – Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
SMG – Microcavidade Simulada Dinâmica 3D
DPSCs-FBS – Cultura das DPSCs com soro bovino fetal
DPSCs-HS – Cultura das DPSCs com soro humano
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
CPCs – Cimento de fosfato de cálcio
HAP/PLGA – Hidroxiapatite/poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
NO – Óxido nítrico exógeno
SMF – Campo magnético estático
B-BG-NPs contendo CA/ox-PULL/GEL – Nanopartículas de vidro bioativo modificadas pelo boro contendo acetato de celulose/pullulan oxidado/Gel

BG-NPs - Nanopartículas de vidro bioativo

OPN – Osteopontina

OMD – Osteomodulina

FDDM – Matriz dentinária liofilizada

GSK-3 – Glicogénio Sintase Quinase 3

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

IGF – Fator de crescimento insulínico

EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético

Resumo

Introdução: A Regeneração de tecidos dentários oferece diferentes e inovadoras abordagens para problemas existentes nas ciências orais e dentárias. Com recurso a tecnologias recentes e abordagens multidisciplinares no campo da engenharia dos tecidos têm-se verificado resultados capazes de revolucionar a prática médico dentária e, especificamente, a dentisteria conservadora.

Objetivo: O objetivo desta revisão bibliográfica é discutir a aplicabilidade das células estaminais de origem dentária na regeneração de tecidos orais, nomeadamente no âmbito da dentisteria conservadora, focalizando na regeneração da dentina.

Materiais e Métodos: Foram efetuadas pesquisas bibliográficas em 6 bases de dados considerando artigos desde o ano de 2015 até 2020 com as palavras-chave: “Dental Stem Cells”, “Dental Pulp Stem Cells”, “Regenerative Dentistry”, “Pulp Tissue Engineering”, “Tooth Engineering” and “Tissue based Therapy”. A partir dos resultados obtidos foram selecionados os 56 artigos que respeitavam os critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos.

Desenvolvimento: As células estaminais são células com capacidade de se renovarem indefinidamente num estado indiferenciado e ainda de se diferenciarem em uma ou mais linhagens celulares. Para que isto seja possível, é necessário a existência de um microambiente adequado para cada tipo de tecido – scaffold, que permita a correta adesão, crescimento e subsequente diferenciação destas células. Adicionalmente, os fatores de crescimento sinalizam e modulam o comportamento celular, direcionando as células na diferenciação na linhagem celular pretendida. Assim, estes três elementos são imperativos para a capacidade de diferenciação em células semelhantes aos odontoblastos e à secreção de uma matriz mineralizada a partir destes. Apesar da constante evolução neste sentido, ainda não é possível aplicar estas técnicas no dia-a-dia da prática clínica médico-dentária.

Conclusão: Apesar dos últimos progressos na área da medicina dentária regenerativa, são poucas as abordagens atualmente passíveis de serem aplicadas rotineiramente na clínica. Assim, é necessário o desenvolvimento de biomateriais, assim como a criação e implementação de protocolos rigorosos que garantam a predictibilidade da sua utilização.

Palavras-Chave

“Células Estaminais e Terapia Tecidual”, “Células Estaminais Dentárias”, “Células Estaminais em Medicina Dentária”, “Dentinogénese”, “Medicina Dentária Regenerativa”

Abstract

Introduction: Dental Regeneration offers different and innovative approaches to existing problems in the oral and dental sciences. With the use of recent technologies and multidisciplinary approaches in the field of tissue engineering, results have been verified capable of revolutionizing dental practice and, specifically, of conservative dentistry.

Objectives: The aim of this literature review is to discuss the applicability of stem cells of dental origin in the regeneration of oral tissues, particularly in the context of conservative dentistry, focusing on the regeneration of dentin.

Material and Methods: Bibliographical research was carried out in 6 databases considering articles from 2015 to 2020 with the keywords: "Dental Stem Cells", "Dental Pulp Stem Cells", "Regenerative Dentistry", "Pulp Tissue Engeneering", "Tooth Engeneering" and "Tissue based Therapy". From the results obtained, 56 articles were selected, which respected the inclusion and exclusion criteria.

Development: Stem cells are cells capable of renewing indefinitely in an undifferentiated state and also differentiating into one or more cell lines. For this to be possible, it is necessary to have an adequate microenvironment for each type of tissue – scaffold, which allows the correct adhesion, growth and subsequent differentiation of these cells. Additionally, growth factors signal and modulate cellular behavior, directing cells to differentiate in the desired cell line. Thus, these three factors are imperative for the differentiation capacity in odontoblast-like cells and the subsequent secretion of a mineralized matrix. Despite the constant evolution in this sense, it is still not possible to apply these techniques in the day-to-day of medical-dental clinical practice.

Conclusion: Despite the latest progress in the area of regenerative dental medicine, there are few approaches currently that can be routinely applied in the clinic. Thus, it is necessary the development of biomaterials, as well as the creation and implementation of strict protocols that ensure the predictability of their use.

Key-words:

"Stem Cells and Tissue Therapy", "Dental Stem Cells", "Stem Cells in Dental Medicine", "Dentinogenesis", "Regenerative Dental Medicine"

Introdução

Existem várias doenças que podem levar à perda de peças dentárias se não forem tratadas atempadamente, de entre os quais podemos destacar a cárie dentária e a doença periodontal. (1) A cárie dentária é considerada uma das doenças bacterianas mais prevalentes no mundo (2), que leva à perda de estrutura dentária e que muitas vezes se encontra associada à dor e ao desconforto. (3) Globalmente, a cárie dentária atinge cerca de 90% das crianças jovens e quase 100% dos adultos. (4) Estima-se que, quase 30% da população entre os 65-74 anos, não tenha mesmo qualquer peça dentária natural na cavidade oral. (3)

Os dentes e os tecidos orofaciais são estruturas responsáveis pela fonação, mastigação, estética, respiração, expressões faciais e emoções, tendo uma função relevante no dia a dia das pessoas e estando severamente expostas a infeções bacterianas. Assim, qualquer defeito induzido por infeções, cáries, traumas ou doenças malignas e/ou auto-imunes nestes tecidos, deverá ser resolvido atempadamente. Apesar de não representar um risco imediato para as funções desempenhadas pela dentição, a perda de várias peças dentárias pode originar inúmeros problemas. (5)

Atualmente, a abordagem terapêutica da cárie dentária, envolve a remoção dos tecidos dentários afetados sendo estes posteriormente substituídos por materiais de preenchimento artificiais, com propriedades físicas e funcionais divergentes (6, 7), existindo também uma grande variedade de soluções protéticas disponíveis como por exemplo as próteses dentárias- fixas ou removíveis – e os implantes. (8) A integridade funcional e a estética resultante deste tipo de terapêuticas poderá ficar aquém daquela conseguida por uma dentição verdadeira/natural.(6, 9, 10) Assim, a solução ideal passará pela possibilidade de substituir estruturas dentárias que estejam defeituosas por restauração/regeneração biológica destes tecidos.

A Engenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que combina princípios físicos e químicos com as ciências biológicas, visando a regeneração de tecidos e órgãos.(11, 12) Fundamenta-se numa tríade de elementos: as células estaminais, que são células indiferenciadas capazes de originar várias linhagens celulares; os scaffolds, estruturas que simulam a matriz extracelular e atuam como um esqueleto que providencia o suporte para o desenvolvimento destas células; e os fatores de crescimento, moléculas bioativas, mediadoras da atividade celular, capazes de regular o seu comportamento. (13, 14)

As células estaminais têm um elevado potencial a nível da regeneração dos tecidos (15) já que são células com a capacidade de se renovarem indefinidamente no seu estado

indiferenciado e de se diferenciarem num ou mais tipos de linhagens celulares. A natureza pluripotente destas células é o conceito base das terapias regenerativas.

Estas células podem ser, genericamente, classificadas quanto à sua origem como Células estaminais Embrionárias (ESCs), Células estaminais Adultas (ASCs) e Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) (16), onde as primeiras duas têm origem natural, enquanto que as iPSCs são criadas a partir da reprogramação de células diferenciadas. As ESCs, apesar da sua natureza totipotente têm um obstáculo ético, já que para poderem ser utilizadas, é necessária a destruição de um embrião. (17, 18) As iPSCs, têm uma vantagem relativamente às ESCs já que não possuem qualquer tipo de problema ético associado e possuem uma pluripotência semelhante a estas. A iPSCs são células adultas convertidas em células pluripotentes através da indução de genes via vetores que geralmente são os retrovírus. No entanto, o envolvimento de fatores externos e vírus, apresenta uma dificuldade acrescida para a utilização destas células, pela possibilidade de inclusão viral no hospedeiro ou até mesmo a indução da formação de tumores. (17) Por outro lado, as ASCs são as células mais utilizadas atualmente podendo ser encontradas em diversos tecidos como a medula óssea, o tecido adiposo, cordão umbilical e a polpa dentária, tendo uma desvantagem perante as duas anteriores que é a sua menor pluripotência. As ASCs existem também nos tecidos dentários reconhecendo-se, atualmente, cinco populações distintas: Células estaminais da Polpa Dentária (DPSCs), Células estaminais da Polpa Dentária de Dentes decíduos (SHEDs), Células estaminais do Folículo Dentário (DFPCs), Células estaminais da Papila Apical (SCAPs), Células estaminais do Ligamento Periodontal (PDLCS), Células estaminais mesenquimais do osso alveolar (BMSCs), Células estaminais do Gérmen Dentário (TGPCs) e Células estaminais mesenquimais derivadas da gengiva (GMSCs) sendo que a vantagem primordial destas é que constituem fontes mais acessíveis para recolha (Figura 1). (7, 19-23)

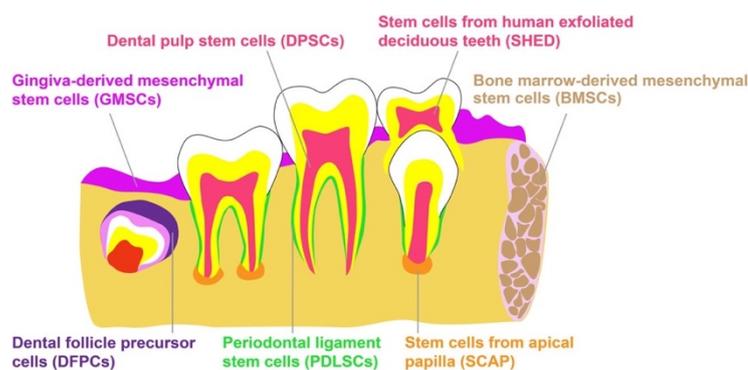


Figura 1. Tipos de células estaminais originárias dos tecidos dentários. Adaptado (19)

Até ao momento, estas células já têm sido aplicadas em vários campos da Medicina para a regeneração de diversos tipos de tecidos e órgãos danificados, entre os quais podemos referenciar como exemplos, o tecido ósseo, ligamento periodontal, fígado, coração e neurónios. (23-25) A Medicina Dentária é, então, uma área de destaque relativamente à evolução destas terapias regenerativas, uma vez que o médico dentista tem um papel fundamental na recolha e utilização das células estaminais de origem dentária, bem como na execução de terapêuticas médicas regenerativas dentárias. Assim, atualmente existe uma intensa atividade na exploração da aplicação das células estaminais na regeneração dos tecidos craniofaciais, polpa, ligamento periodontal, esmalte, dentina e até mesmo, a regeneração total de um dente.

Para ser possível a regeneração dentária, é fundamental que se conheçam todos os mecanismos e passos envolventes na odontogénese, tratando-se de um processo contínuo que se divide em diversas fases: fase de iniciação, fase de broto dentário, fase de capuz, fase de campânula e fase de aposição e maturação (Figura 2) (26), sendo nesta última fase que ocorre a dentinogénese (27) – formação da dentina, levada a cabo por células estaminais mesenquimais dentárias denominadas de odontoblastos. (23)

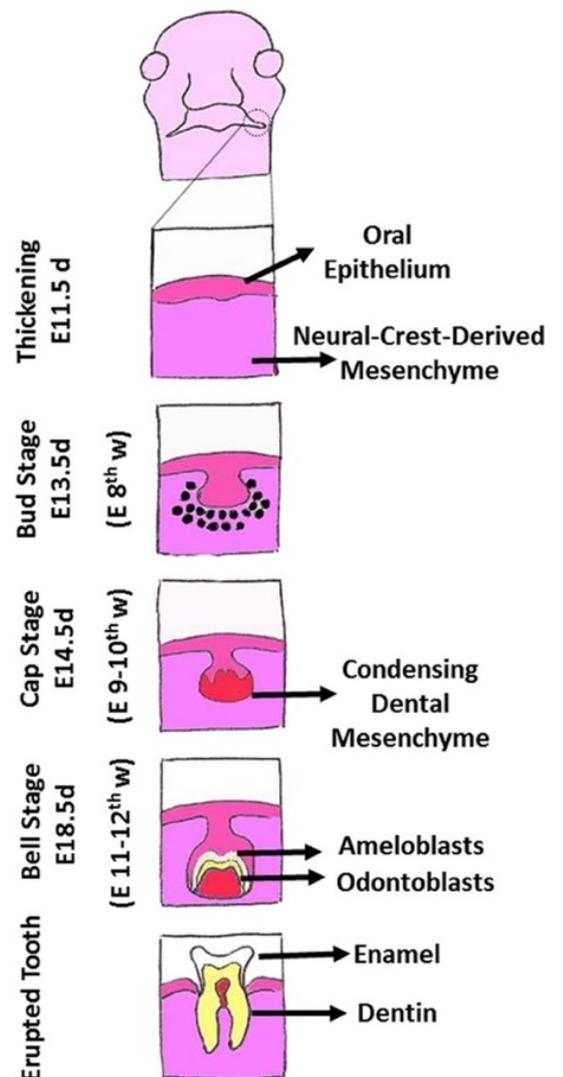


Figura 2. Estrutura e diferenciação dentária. Adaptado: (3)

O objetivo desta revisão bibliográfica é discutir a aplicabilidade das células estaminais de origem dentária na regeneração de tecidos orais, nomeadamente no âmbito da dentisteria conservadora, focalizando na regeneração da dentina. Adicionalmente, serão abordadas as possíveis limitações deste tipo de tratamentos assim como as perspectivas futuras e desafios inerentes a este tipo de terapêutica.

Materiais e Métodos

Para a realização desta monografia foram efetuadas pesquisas bibliográficas em 7 bases de dados: PubMed[®] (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine), Medline[®] (U.S. National Library of Medicine), B-on[®] (*Biblioteca de Conhecimento Online*), Scielo[®] (*Scientific Electronic Library Online*), Web of Science[®], Research Gate[®] (*ResearchGate GmbH*), EBD[®] (*Evidence Based Dentistry*).

Foram considerados todo o tipo de artigos de texto integral. Foi utilizado o limite temporal de 2015 até 2020. Os idiomas selecionados incluíram inglês, português e espanhol.

As palavras-chave utilizadas na pesquisa incluíram: “Dental Stem Cells”, “Regenerative Dentistry”, “Tooth Engineering”, “Tissue Based Therapy”, “Dental Pulp Stem Cells”, “Pulp Tissue Engineering” e “Dentin”, tendo sido utilizados os filtros supramencionados para as diversas palavras-chave nas diferentes bases de dados de modo a possibilitar a pesquisa. Após obter os respectivos resultados, foram selecionados os artigos que respeitassem os critérios de inclusão e exclusão descritos na Tabela 1.

Tabela I. Critérios de Inclusão e Exclusão da pesquisa bibliográfica

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
– Publicados nos últimos 5 anos	– Artigos com conteúdo não relevante
– Idioma Inglês, Português e Espanhol	– Opiniões pessoais sem base científica
– Revisões sistemáticas	– Artigos que representassem encargos financeiros para o autor
– Revisões bibliográficas	– Artigos repetidos
– Investigações	– Artigos que abordam apenas regeneração óssea, periodontal e pulpar
– Artigos com texto integral disponível	– Engenharia de tecidos pura
– Revistas e jornais	
– Livros disponíveis online	

Dos 1967 artigos obtidos, 56 artigos foram selecionados para a realização desta monografia. De seguida, apresentam-se um Esquema e uma Tabela referentes aos filtros utilizados (Esquema 1; Tabela 2):

Esquema 1: Pesquisa Bibliográfica efetuada na base de dados PubMed®, Medline®, B-on®, Scielo®, Web of Science®, Research Gate®, EBD®

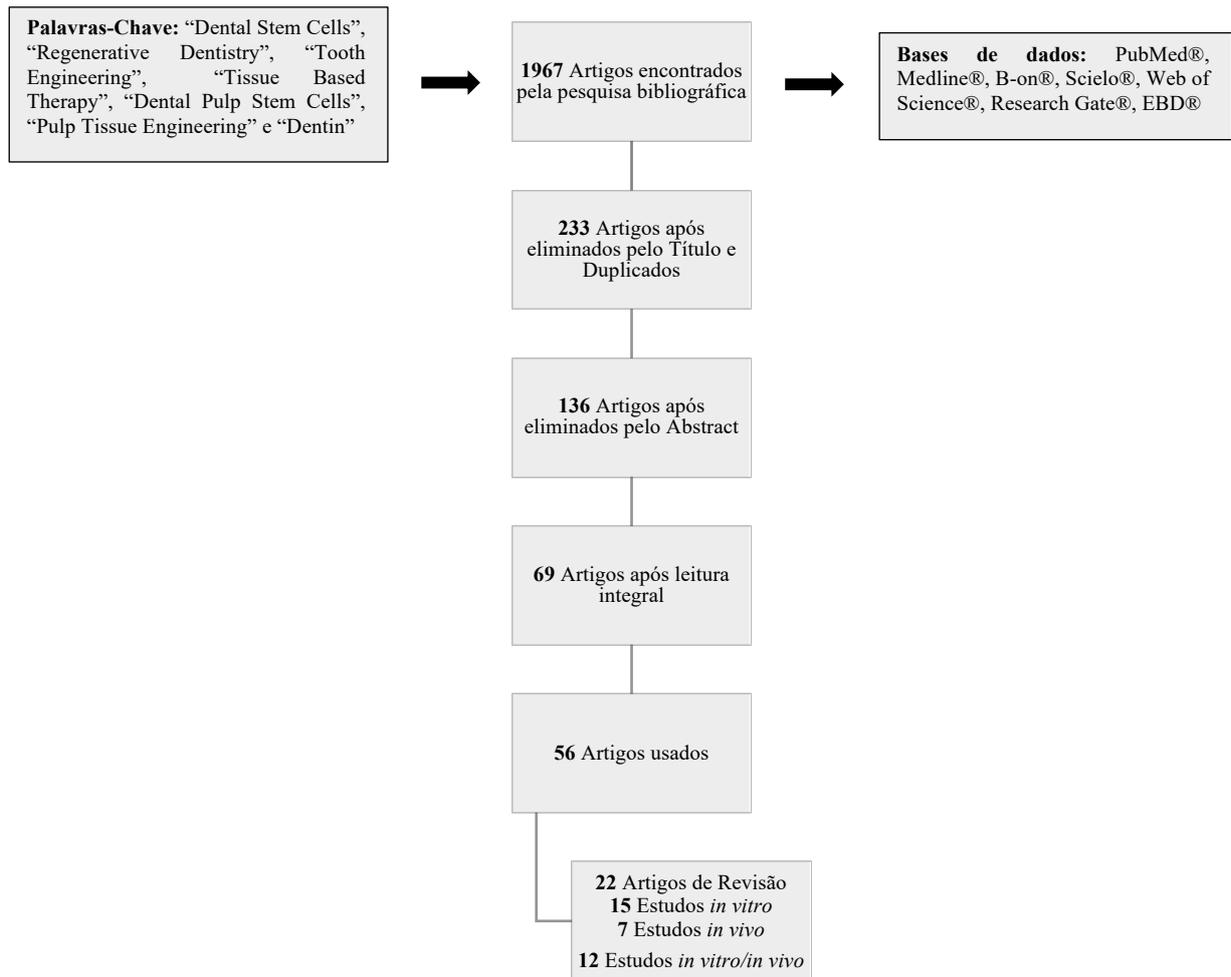


Tabela II. Esquema da pesquisa bibliográfica efetuada na base de dados PubMed®, Medline®, B-on®, Scielo®, Web of Science®, Research Gate®, EBD®

Base de dados	Termos MesH e Palavras-chave	Resultados	Eliminados por título e duplicados	Eliminado por abstract	Eliminado por leitura integral	Usados
Pubmed	Dental Stem Cells AND Regenerative Dentistry AND Tooth Engineering AND Tissue Engineering AND Dental Pulp Stem Cells AND Pulp Tissue Engineering AND Dentin	600	233	136	69	56
Medline		27				
B-on		530				
SciELO		77				
Web of Science		237				
Research gate		392				
EBD		104				

Desenvolvimento

I. Dentina

A dentina é um tecido dentário importante já que compõe grande parte da estrutura do dente sendo recoberta por esmalte na sua porção coronal e por cimento na sua porção radicular. (15) É um tecido duro e viscoelástico com a capacidade de proteger a polpa dentária e sustentar o esmalte do stress existente durante a função mastigatória. (9) É um tecido tubular composto por material inorgânico (70%), orgânico (20%) e água (10%), estando dividido em dentina primária, secundária e terciária. (15, 28) O material inorgânico é constituído pelos cristais de hidroxiapatite que são de menor tamanho do que os esmalte. Relativamente ao material orgânico, este tem uma composição semelhante ao osso, sendo constituído maioritariamente por colagénio (cerca de 90%) onde os restantes 10% correspondem a proteínas não-colagenosas. (28)

A dentina primária e secundária são os tipos de dentina mais predominantes, sendo que a primeira é secretada previamente ao completo desenvolvimento da raiz, enquanto que a segunda é semelhante à primeira em termos de composição mineral e orgânica mas é secretada após o desenvolvimento completo da raiz. Por outro lado, existe também a dentina terciária a qual também se pode denominar dentina reativa, reparativa ou até mesmo dentina secundária irregular. (29) Esta dentina é produzida em resposta a estímulos nocivos externos que podem variar entre atrição, cárie e até mesmo devido a procedimentos dentários restauradores. Pode-se ainda diferenciar esta dentina terciária em dois tipos de dentina distintos: a dentina reacionária que é aquela que é secretada pelos odontoblastos pré-existentes e a dentina reparativa, no caso dos estímulos externos levarem à morte dos odontoblastos, ocorrendo, nestes casos, a diferenciação de uma nova geração de células semelhantes a odontoblastos a partir de células estaminais indiferenciadas da polpa que produzirão uma matriz displásica e atubular, com uma estrutura irregular. (1, 9, 28, 30)

a. Complexo Dentino-Pulpar

A polpa dentária é um tecido que se encontra rodeado e protegido pela dentina. Este tecido consiste maioritariamente em fibroblastos mas também células imunes, fibras nervosas e, inclusivamente, células estaminais. A câmara pulpar é delimitada por uma camada única de

odontoblastos, células produtoras de dentina. Durante o desenvolvimento dentário, estas células alongam-se para produzir um processo citoplasmático, o qual se estende para os túbulos dentinários existindo uma interação direta entre a dentina e a polpa. Assim, a dentina é considerada um tecido vital e, juntamente com a polpa formam o complexo dentino-pulpar. (31)

A capacidade de auto-reparação da dentina depende então da presença de odontoblastos ou de um tecido pulpar saudável. As células obtidas a partir do tecido pulpar podem ser induzidas a diferenciar-se em células semelhantes aos odontoblastos com a capacidade de produzir uma estrutura mineralizada semelhante à dentina. Quando este tecido está danificado a formação de dentina reparativa não é possível sendo que a atual abordagem passa pela remoção deste tecido infetado, biopreparação dos canais seguida de obturação dos mesmos para possibilitar a preservação do dente na cavidade oral. Este tipo de tratamento, o tratamento endodôntico, sacrifica uma grande quantidade de estrutura dentária comprometendo a sua integridade mecânica e predispondo o paciente à possível perda dentária. (9) Por conseguinte, a implementação dos princípios da engenharia de tecidos na regeneração da dentina e do tecido pulpar podem levar à restauração da funcionalidade dos mesmos, assim como à preservação dos tecidos danificados.

Tabela III. Características gerais dos estudos incluídos na revisão

<i>Nome e Ano</i>	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
<i>Conde M. et al (2015) (32)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	PLLA		3-21 dias	DSPP, DSP-1, MEPE	– Scaffold com diferentes tamanhos de poros: ambos os scaffolds permitiram a proliferação e diferenciação das DPSCs em células semelhantes a odontoblastos.
<i>Goulin L. et al (2015) (21)</i>	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPSCs	DDM HA-TCP	BMP-2, TGF- β 1, bFGF	Dias 1, 3, 5 e 7 12ª semana	DSPP, DMP-1	– DDM aumentou a diferenciação das DPSC em odontoblastos. – A combinação das DPSC com DDM in vivo proporcionou a regeneração de um tecido mineralizado semelhante à dentina.
<i>Tzong-Fu K. et al (2015) (10)</i>	<i>In Vivo</i>	Mini porcos	DPSCs	Agarose Hydrogel		1 ano	Colagénio tipo I BSP	– Regeneração total de uma estrutura semelhante ao dente, observando-se a formação de esmalte, dentina e polpa.
<i>Lee C. et al (2015) (33)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	DDM+gel colagénio	“cocktail” de fatores de crescimento		OCN BSP	– DDM tem potencial para estimular expansão celular, reduzir apoptose e induzir a síntese de uma matriz mineralizada, com todos os resultados dependentes das concentração. – DDM possui componentes bioativos capazes de estimular eventos celulares associados com a formação de dentina reparativa. – Dentina reparativa sintetizada tem aparência histológica de uma matriz mineralizada amorfa com inclusões celulares esporádicas.
<i>Tian Y. et al (2015) (34)</i>	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DFPCs PDLCs	TDM		Cultura de 7 dias 8 semanas	DSPP, DMP-1, BGN, DCN, OPN, GAPDH	– DFPCs regeneraram um tecido mineralizado semelhante à dentina, incluindo dentina com calcospherites, predentina e uma camada de células semelhantes a odontoblastos, enquanto a dentina regenerada pelas PDLCs não evidenciava uma divisão entre a dentina e predentina, parecendo apenas uma única camada.
<i>Tran H. et al (2015) (15)</i>	<i>In Vivo</i>	Rato	DPSCs	hTD		4, 6 e 8 semanas	DMP-1, DSPP, Sigma	– Expressão de DSPP e DMP-1 detetada nos tecidos neoformados às 4, 6 e 8 semanas, demonstrando que estes tecidos são semelhantes à dentina.

DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária; PLLA – Ácido polilático; DSPP – Sialofosfoproteína de dentinária; DMP-1 – Fosfoproteína ácida 1; MEPE – Matriz extracelular fosfo-glico-proteína; DDM – Matriz dentinária tratada; HA-TCP – Fosfato de hidroxiapatite tricálcico; BMP-2 – Proteína morfogenética óssea 2; TGF- β 1 – Fator de crescimento β 1; bFGF – Fator de crescimento fibroblástico; BSP – Sialoproteína óssea; OCN – Osteocalcina; PDLCs – Células estaminais do Ligamento Periodontal; TDM – Matriz dentinária tratada; OPN – Osteopontina; hTD – Matriz dentinária tratada; Sigma – Mitocondria humana

Tabela IV. Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

<i>Nome e Ano</i>	<i>Tipo de Estudo</i>	<i>Modelo Animal</i>	<i>Tipo de Células</i>	<i>Scaffold</i>	<i>Fatores de Crescimento</i>	<i>Tempo</i>	<i>Marcadores</i>	<i>Resultados</i>
<i>Tran H. et al (2015) (35)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	hTD		14 dias	DMP-1, DSPP	– Formação de neo tecidos positivos para os marcadores DMP-1 e DSPP com utilização de diferentes protocolos de preparação de scaffolds de dentina.
<i>Soares D. et al (2016) (36)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	BMACAC		1, 7, 14 e 28 dias	DMP-1, DSPP	– Aumento da proliferação das DPSCs, seguida de elevada expressão de marcadores de células semelhantes a odontoblastos, atingindo uma intensa deposição de uma matriz mineralizada. (5x superior ao controlo).
<i>Louvrier A. et al (2016) (37)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	3D PCL		6 semanas		– DPSCs isoladas a partir de dentes íntegros e cariados foram capazes de colonizar e proliferar no scaffold PCL e diferenciar-se em células semelhantes a odontoblastos funcionais, depositando uma matriz mineralizada de tecido semelhante à dentina.
<i>Ling-Ling C. (2016) (38)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	EMPs		1 mês	DSPP, DSP, DMP-1, vimentin	– EMPs capazes de sobre-regular a expressão de DSPP, DSP, DMP-1 e vimentin das DPSCs indicando a sua tendência de diferenciação em células semelhantes a odontoblastos, numa fase inicial da morfogênese da dentina.
<i>Kawamura et al (2016) (39)</i>	<i>In Vivo</i>	Rato	DPSCs	Extrato de GdnHCl e extrato de EDTA		28 dias		<ul style="list-style-type: none"> – Extrato de GdnHCl demonstrou > potencial regenerativo dentinho/pulpar do que o extrato de EDTA. – Juntamente com a estrutura física dos dentes autoclavados, os componentes químicos solúveis do EDTA+ DPSCs serviram como microambiente indutivo, promovendo a proliferação, migração e diferenciação em células semelhantes a odontoblastos.

DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária; **hTD** – Matriz dentinária tratada; **DMP-1** – Fosfoproteína ácida 1; **DSPP** – Sialofosfoproteína de dentinária; **PCL** – Policaprolactona; **EMPs** – Extratos de esmalte imaturo de dentes de porco; **GdnHCl** – Cloreto de Guanidina; **BMACAC** - Biomembrana composta por quitosano e colagénio, contendo aluminato de cálcio como fase mineral

Tabela V. Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

<i>Nome e Ano</i>	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
<i>Sonoda S. et al (2016) (40)</i>	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	IP-DPSCs	HA-TCP		8 Semanas		<ul style="list-style-type: none"> – IP- DPSCs foram capazes de formar neo tecido mineralizado mas com uma capacidade inferior às DPSCs. – IP-DPSCs tratadas com IFN-γ aumentaram a capacidade de regenerar um tecido semelhante ao complexo dentinho/pulpar, enquanto TNF-α diminuiu esta capacidade. – Dentina neoformada não apresentava estruturas tubulares.
<i>Theocharidou A. et al (2016) (41)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	Biocerâmicos 3D à base de Mg e à base de Zn	BMP-2 LLLI	28 dias	DSPP	<ul style="list-style-type: none"> – Scaffolds permitiram adesão e crescimento das DPSCs – PBM com LLLI aumentou significativamente a expressão dos marcadores odontogênicos. – PBM dos scaffolds/DPSC com LLLI mostrou ser eficiente na biomineralização e diferenciação odontogênica.
<i>Yoshida S. et al(2016) (42)</i>	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPSCs	Esponja de colagénio		4 semanas	DSPP, DMP-1, ALP, OCN	<ul style="list-style-type: none"> – Sema3A induziu a formação de dentina reparativa com uma camada de odontoblastos, túbulos dentinários e predentina. – Expressão positiva de marcadores de dentina como DSP e DMP-1 na dentina reparativa
<i>Neunzehn J. et al (2017) (43)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	Não utilizaram Scaffold › Cultura de esferóides			DSP, DMP-1	<ul style="list-style-type: none"> – Interação fisiológica entre a superfície dentinária do canal e as DPSCs. – Formação de tecido mineralizado induzido pelas esferas de células 3D introduzidas nos canais sem adição de fatores de crescimento.
<i>Mangione F. et al (2017) (44)</i>	<i>In Vivo</i>	Mini Porcos	DPSCs	Hidrogel nanopéptido injetável		21 dias	DSP, BSP	<ul style="list-style-type: none"> – Implantação dos scaffolds com e sem DPSCs induziram a formação de uma barreira de dentina mineralizada cuja microarquitctura difere da dentina nativa. A presença das células afeta significativamente a microarquitctura da dentina neoformada. – Não ocorreu regeneração pulpar mas sim regeneração sistemática da dentina possivelmente por odontoblastos residentes e não neoformados pelas DPSCs.

IP- DPSCs – Células estaminais isoladas de dentes com pulpíte irreversível; **HA-TCP** – Fosfato de hidroxiapatite tricálcico; **IFN- γ** – Interferão Gamma; **TNF- α** – Fator alfa; **DPSCs** – Células estaminais da Polpa Dentária; **BMP-2** – Proteína morfogenética óssea 2; **DSPP** – Sialofosfoproteína de dentinária; **DMP-1** – Fosfoproteína ácida 1; **LLLI** – Irradiação com laser de baixa intensidade; **PBM** – Fotobiomodulação; **ALP** – Fosfatase alcalina; **OCN** – Osteocalcina; **Sema3A** – Semaforina 3A

Tabela VI.Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

Nome e Ano	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
Xie H. et al (2017) (16)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	iPSCs derivadas das DPSCs	PLLA	BMP-4	28 dias	DSPP, DMP-1, MEPE	<ul style="list-style-type: none"> – iPSCs formaram um tecido semelhante à polpa dentro da câmara pulpar, com odontoblastos funcionais capazes de produzir tecidos semelhantes à dentina tubular. – iPSCs podem ser obtidas através das DPSCs e diferenciar-se em odontoblastos funcionais <i>in vivo</i>.
Haeri M. et al (2017) (45)	<i>In Vitro</i>		DPSCs	3D microtubular semelhante a dentina PMMA		21 dias	DSPP, DMP-1, OCN	<ul style="list-style-type: none"> – A arquitetura microtubular aumentou a diferenciação das DPSCs em odontoblastos. – Apesar do aumento da diferenciação em odontoblastos, ocorreu pouca mineralização em todos os scaffolds possivelmente devido a uma baixa densidade celular ou alteração das células da ECM neste tipo de scaffolds.
Li Y. et al (2017) (11)	<i>In Vivo</i>	Rato	DPSCs	PLGA		6 semanas	DSPP, DMP-1, Colagénio tipo I	<ul style="list-style-type: none"> – Capacidade de proliferação e diferenciação das DPSCs em odontoblastos foi superior no dinâmico 3D SMG, comparativamente à cultura estática 3D, pela melhoria do metabolismo das células e do microambiente.
Piva E. et al (2017) (4)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPSCs-FBS DPSCs-HS	PLLA				<ul style="list-style-type: none"> – DPSCs podem ser isoladas e cultivadas sem utilização de soro animal ou fatores de crescimento exógenos, mantendo as suas propriedades regenerativas. – Tecido regenerado contém tubulos dentinários e uma camada de predentina adjacente bem definida.
Zhang M. et al (2017) (46)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPSCs	Cimento de fosfato de cálcio	PDGF	12 semanas	DSPP, DMP-1	<ul style="list-style-type: none"> – DPSCs modificadas com PDGF-BB têm maior capacidade de proliferação, diferenciação em odontoblastos e angiogénica. – PDGF-BB secretado pelas DPSCs modificadas facilitam o “cell homing” e aumentam a regeneração do complexo dentinho/pulpar <i>in vivo</i>.

iPSCs – Células estaminais pluripotentes induzidas; DPSCs-FBS – Cultura das DPSCs com soro bovino fetal; DPSCs-HS – Cultura das DPSCs com soro humano; PLLA – Ácido polilático; BMP-4 – Proteína morfogenética óssea 4; DSPP – Sialofosfoproteína de dentinária; DMP-1 – Fosfoproteína ácida 1; MEPE – Matriz extracelular fosfo-glico-proteína; DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária; PMMA – Polimetil-metacrilato microtubular; OCN – Osteocalcina; PLGA – Poli(ácido lático-co-ácido glicólico); PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas; SMG – Microcavidade Simulada Dinâmica 3D

Tabela VII. Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

Nome e Ano	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
Toriumi T. et al (2018) (47)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	iPSCs derivadas das SHEDs	HAP/PLGA		16 semanas	DSPP, BSP	<ul style="list-style-type: none"> – Células germinativas pós natais na fase de câmpanula avançada podem fazer com que as iPSCs se diferenciem em células odontogênicas como ameloblastos, odontoblastos e cementoblastos que posteriormente darão origem aos tecidos: esmalte, dentina e cimento. – Dentina com formação tubular e uma camada de pré-dentina voltada para a camada de odontoblastos.
Xiaofei Z. et al (2018) (48)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato Mini Porcos	DPSCs SCAPs	HA/TCP PLG Hydrogel		3 meses (rato) 1,5-4meses (mini porcos)	DSP, DMP-1, BSP	<ul style="list-style-type: none"> – Formação de tecido semelhante a dentina, com ausência de túbulos dentinários ou com túbulos desorganizados. – As DPSCs e as SCAPs são potencialmente os melhores tipos de células para regenerar odontoblastos que, finalmente, regenerarão a dentina.
Sonoda S. et al (2018) (49)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPSCs				DSPP, DMP-1, BSP, colagênio tipo I	<ul style="list-style-type: none"> – NO induz diretamente a capacidade odontoblástica das DPSCs – <i>In Vivo</i> acelerou a formação de dentina terciária.
Moussa M. et al (2018) (27)	<i>In Vitro</i>		DPSCs			7, 14 dias	DSPP, DMP-1, ALP	<ul style="list-style-type: none"> – DPSCs foram capazes de se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos e, adicionalmente, foram capazes de formar um neo tecido mineralizado.
Feng S. et al (2018) (50)	<i>In Vitro</i>		DPSCs			25, 35 dias	DMP-1, DSPP	<ul style="list-style-type: none"> – 0.4 T SMF potenciou a migração das DPSCs para o local da lesão. – 0.4 T SMF melhora significativamente a diferenciação dentinogênica das DPSCs pela ativação da via p38 MAPK.

iPSCs – Células estaminais plútipotentes induzidas; **HAP/PLGA** – Hidroxiapatite/poli(ácido láctico-co-ácido glicólico); **DSPP** – Sialofosfoproteína de dentinária; **BSP** – Sialoproteína óssea; **DPSCs** – Células estaminais da Polpa Dentária; **SCAPs** – Células estaminais da Papila Apical; **DMP-1** – Fosfoproteína ácida 1; **ALP** – Fosfatase alcalina; **NO** – Óxido nítrico exógeno; **SMF** – Campo magnético estático

Tabela VIII. Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

<i>Nome e Ano</i>	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
<i>Abdelaz P. et al (2019) (12)</i>	<i>In Vivo</i>	Cães sem raça definida	DPSCs			3 meses	DSPP	<ul style="list-style-type: none"> – Ca(OH)₂ formou uma barreira de tecido duro neoformado com diferentes estruturas de dentina: dentina amorfa (atubular) e dentina reparativa tubular. – DPSCs regeneraram uma estrutura semelhante à dentina, com menor nº de túbulos e com arranjo irregular.
<i>Lee S. et al (2019) (6)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs			7 dias		<ul style="list-style-type: none"> – A utilização de resinas Bulk-Fill em cavidades superiores a 4mm, tiveram uma ação citotóxica e antidiferencial nas células DPSCs.
<i>Rad R. et al (2019) (2)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs	B-BG-NPs contendo CA/ox-PULL/GEL 3D com morfologia tubular		7, 14, 21 dias	DSPP, OPN, Colagénio I, ALP	<ul style="list-style-type: none"> – Incorporação de B-BG-NPs na cultura das DPSCs aumentou a capacidade de migração, proliferação e diferenciação das células. – Elevada deposição de uma matriz mineralizada nos scaffolds. – Elevada expressão dos marcadores proteicos.
<i>Lin W. et al (2019) (51)</i>	<i>In Vitro</i>		DPSCs			7, 21 dias	ALP, DMP-1, DSPP	<ul style="list-style-type: none"> – O “silenciamento” do OMD consegue inibir a diferenciação das DPSCs em osteo/odontoblastos.
<i>Wang F. et al (2019) (52)</i>	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Ratos	DPSCs	FDDM		3 semanas	ALP, DSP, DSPP, DMP-1, BSP	<ul style="list-style-type: none"> – A técnica de liofilização preservou as propriedades biológicas e mecânicas da dentina. – A liofilização pode ser uma oportunidade para estabelecer bancos de dentes e possibilitar a comercialização destes produtos para o uso diário.
<i>Zaugg L. et al (2020) (53)</i>	<i>In Vivo</i>	Ratos Ratazanas	DPSCs	Esponja de Colagénio		6 semanas 4 semanas		<ul style="list-style-type: none"> – A dentina neoformada era muito semelhante à dentina natural sendo que a diferença mais evidente é a maior cristalinidade da dentina neoformada possivelmente devido à maior formação de dentina intertubular vs peritubular.

DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária; B-BG-NPs contendo CA/ox-PULL/GEL – Nanopartículas de vidro bioativo modificadas pelo boro contendo acetato de celulose/pullulan oxidado/Gel; DSPP – Sialofosfoproteína de dentinária; OPN – Osteopontina; ALP – Fosfatase alcalina; FDDM – Matriz dentinária liofilizada; OMD – Osteomodulina; DMP-1 – Fosfoproteína ácida 1; BSP – Sialoproteína óssea;

Tabela IX. Características gerais dos estudos incluídos na revisão (Cont.)

<i>Nome e Ano</i>	Tipo de Estudo	Modelo Animal	Tipo de Células	Scaffold	Fatores de Crescimento	Tempo	Marcadores	Resultados
Jeong S. et al (2020) (5)	<i>In Vitro</i>		DPSCs			21 dias	DSPP, DMP-1	<ul style="list-style-type: none"> – O organoide gerado demonstrou marcadores característicos das células estaminais, assim como da diferenciação em células semelhantes a odontoblastos. – Biodentine ® associado com as DPSCs aumentou significativamente a proliferação, migração e adesão das células estaminais, quando este é colocado diretamente na polpa.
Chen H. et al (2020) (22)	<i>In Vitro/In Vivo</i>	Rato	DPCs (MDPCs)	HA/TCP TDM			DMP-1, DSPP	<ul style="list-style-type: none"> – Foi identificado um grupo único de células CD24a+ na papila dentária que exibiu uma elevada capacidade de diferenciação osteo/odontogénica e capacidade de regenerar tecidos semelhantes ao complexo dentinho-pulpar <i>in vivo</i>.

DPSCs – Células estaminais da Polpa Dentária; **DSPP** – Sialofosfoproteína de dentinária; **DMP-1** – Fosfoproteína ácida 1; **DPCs** – Células da Papila Dentária; **HA-TCP** – Fosfato de hidroxiapatite tricálcico; **TDM** – Matriz dentinária tratada

II. Regeneração da Dentina

1. Engenharia de Tecidos

A Engenharia de tecidos é uma área que visa a regeneração de tecidos e órgãos (11, 12) fundamentando-se em três elementos indispensáveis: as células estaminais, os scaffolds e os fatores de crescimento. (13, 14)

A regeneração de tecidos pode ser conseguida de duas formas distintas: num primeiro cenário, as células estaminais previamente escolhidas e recolhidas podem ser semeadas no scaffold adequado e cultivadas *in vitro* de modo a regenerar o tecido desejado, sendo este posteriormente transplantado – **engenharia de tecidos baseada nas células (SC-BT)**. Diferentemente podem ser utilizados materiais para a transplantação de um sistema livre de células que, através da combinação de biomoléculas sinalizadoras incorporadas no scaffold, induzirá as células estaminais residentes nos respetivos tecidos, a deslocar-se para o local e a diferenciar-se no tipo de células desejadas promovendo a regeneração do tecido – **engenharia de tecidos livre de células (CH)**. Esta segunda abordagem é mais apelativa no campo da engenharia de tecidos já que não é dependente de células estaminais eliminando possíveis desvantagens que estão inerentes a estas. Por outro lado, implica o desenvolvimento de scaffolds mais sofisticados que permitam a diferenciação das células estaminais residentes. (31)

a. Células estaminais

As células estaminais apresentam diferentes graus de potencialidade porém todas possuem capacidade de autorrenovação. (13) As células presentes num estágio embrionário precoce (blastocisto) darão origem a um organismo na sua totalidade pelo que estas células têm a capacidade de se especializar para todas as camadas embrionárias. Assim, as ESCs são células totipotentes e capazes de produzir células especializadas para todos os tecidos e órgãos. (3) Por outro lado, as células estaminais adultas são células indiferenciadas que existem juntamente com células diferenciadas num determinado tecido ou órgão. Daqui se depreende que estas células têm a capacidade de se diferenciar em alguns tipos de células diferenciadas de diferentes órgãos ou tecidos, mas não todos, pelo que são consideradas células multipotentes. (3) Finalmente, as iPSCs

são células adultas que são induzidas por vetores para um estado indiferenciado, tornando-se totipotentes. Atualmente pensa-se que este tipo de células mantém uma memória epigenética do seu tecido de origem fazendo com que haja uma preferência de diferenciação de volta ao tipo de células original. Assim, a utilização de células de origem dentária pode potencializar a sua capacidade de diferenciação nos tecidos dentários. (54)

De todas as células de origem dentária, as DPSCs são as mais fáceis de recolher e portanto, mais facilmente utilizadas. Por outro lado, em termos de facilidade de reprogramação em iPSCs, estas requerem menos fatores do que outros tecidos tendo melhor capacidade a este nível. (17)

A utilização de células estaminais de origem autóloga também é considerado um fator facilitador na SC-BT, já que estas células podem ser recolhidas em diferentes locais da cavidade oral do paciente, sem o risco de ocorrer uma resposta imunológica. (13)

Tabela X. Características gerais das células estaminais de origem dentária.(3, 17-19, 23-25, 54-56)

Tipo de Célula	Local de Origem	Potencialidade de Diferenciação	Capacidade de Regenerar que tecidos
<i>iPSCs</i>	Reprogamação de outros tipos celulares	Adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Qualquer tecido
<i>DPSCs</i>	Polpa dentária de 3ºMolares impactados	Adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Polpa dentária, Dentina reparativa/ectópica, complexo dentinohulpulpar
<i>SHEDs</i>	Polpa de dentes decíduos	Adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Dentina e Polpa dentária
<i>PDLCs</i>	Ligamento periodontal de 3ºMolares impactados	Adipogénica, condrogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Ligamento periodontal
<i>SCAPs</i>	Papila apical de dentes imaturos	Adipogénica, condrogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Dentina e Polpa dentária com células semelhantes a odontoblastos
<i>DFPCs</i>	Folículo dentário de 3ºMolares impactados	Adipogénica, condrogénica, miogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Ligamento Periodontal, dentina
<i>ABMSCs</i>	Osso alveolar	Adipogénica, condrogénica, osteogénica	Tecido ósseo
<i>TGPCs</i>	Gérmen dos 3ºMolares na fase de campânula	Adipogénica, condrogénica, neurogénica, odontogénica, osteogénica	Tecido ósseo
<i>GMSCs</i>	Tecido gengival	Adipogénica, condrogénica, osteogénica, odontogénica	Tecido conjuntivo

Os estudos incluídos nesta revisão bibliográfica avaliaram a capacidade de cinco tipos de células na regeneração da dentina. 88,24% avaliaram as DPSCs, 5,88% avaliaram as iPSCs (reprogramação das DPSCs e das SHEDs), 2,94% avaliaram as PDLCs e as DFPCs e 2,94% avaliaram as SCAPs.

As DPSCs têm vantagens inequívocas em detrimento das outras: são células facilmente cultiváveis podendo ser obtidas através de processos não invasivos, além de possuírem uma grande capacidade de proliferação e multidiferenciação. (21) Além do mais, possibilitam a engenharia de tecidos pela técnica CH na regeneração da dentina já que são estas células presentes na polpa dentária que, durante o processo de reparação da estrutura danificada, se diferenciam em células semelhantes a odontoblastos, que finalmente serão capazes de sintetizar um tecido mineralizado. (33) Por outro lado, as DFPCs e as PDLCs. As DFPCs são células que estão presentes em diversos estágios do desenvolvimento dentário possuindo as demais capacidades de auto-renovação das restantes células estaminais além de serem facilmente recolhidas de terceiros molares extraídos. As PDLCs são células capazes de regenerar tecidos cimento/periodontais. De acordo com a teoria de desenvolvimento dentário, as DFPCs são células precursoras das PDLCs, ou seja, as DFPCs, na fase de câmpula ficam em contacto com a dentina e iniciam o desenvolvimento periodontal. (34) Assim, a dentina é um microambiente favorável para a diferenciação das DFPCs, pelo que Tien Y. e col comprovaram que estas células têm capacidade de formar dentina quando cultivadas num ambiente de matriz de dentina tratada (TDM). Uma vez que as DFPCs são precursoras das PDLCs, Tien Y. e col avaliaram a sua capacidade *in vivo* de participar na dentinogénese, observando que as DFPCs foram capazes de regenerar um tecido semelhante à dentina com calcosferites, predentina e ainda uma camada de células semelhantes a odontoblastos. Já as PDLCs, apesar de conseguirem regenerar um tecido semelhante à dentina, não apresentavam distinção entre a dentina e predentina parecendo apenas uma camada única. (34) Pela avaliação *in vitro* destas células observou-se que a DFPCs são células mais pequenas e com uma capacidade de crescimento superior às PDLCs, pelo que esta última característica das DFPCs pode ser uma vantagem na sua aplicação na regeneração de tecidos devido à sua eficiente expansão e possibilidade de criopreservação em elevadas quantidades. Adicionalmente, pensa-se que a maior capacidade regenerativa das DFPCs pode advir da sua origem de tecidos em estágios mais precoces de desenvolvimento.

As iPSCs foram também utilizadas em vários estudos, sendo derivadas das DPSCs (44) ou das SHEDs. (46) Como já foi referenciado previamente, estas células têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células. As DPSCs são o tipo de células estaminais mais facilmente reprogramáveis em iPSCs. Xie H. e col avaliaram a capacidade destas iPSCs se diferenciarem em células semelhantes a odontoblastos funcionais *in vitro* e *in vivo*, concluindo

que estas células foram capazes de regenerar um tecido semelhante à polpa dentária com a presença de dentina tubular *in vivo*, e mantiveram a sua capacidade de mineralização e diferenciação odontoblástica *in vitro*. (44) Em concordância com este estudo, Tariumi T. e col também avaliaram a capacidade das iPSCs, derivadas das SHEDs, em regenerar tecidos dentários como o esmalte, a dentina e o cimento, quando misturadas com células heterogêneas colhidas do gérmen dentário de terceiros molares suínos na fase de campânula avançada. Concluíram então que esta combinação permite que as iPSCs se diferenciem em células odontoblásticas nomeadamente em ameloblastos, odontoblastos e cementoblastos sendo capazes de regenerar tecidos como o esmalte, dentina e cimento. (46)

Xiaofei Z. e col realizaram um estudo onde as DPSCs são comparadas com as SCAPs. Em termos de regeneração do complexo dentino-pulpar *in vivo*, estes dois tipos celulares foram capazes de regenerar a dentina apresentando-se com uma deposição de tecido mineralizado, podendo também observar-se um tecido conjuntivo adjacente semelhante à polpa dentária. Este tecido mineralizado assemelha-se à dentina e observa-se ainda uma linha alinhada de células semelhantes a odontoblastos. Pode ainda ser observado nitidamente uma estrutura tubular, ainda que mais evidente nas amostras das DPSCs. (48) Segundo estes autores, uma das maiores dificuldades na regeneração do tecido dentinário é a formação de estruturas tubulares organizadas pelo que consideram que o melhor tipo de células capaz de as conseguir são as DPSCs e as SCAPs. (48)

Na grande maioria dos estudos, as células estaminais recolhidas são sempre originárias de dentes animais ou humanos saudáveis. Diferentemente, Louvrier A. e col (37) avaliaram a capacidade das DPSCs, recolhidas a partir de dentes cariados, de colonizar, proliferar e diferenciar-se em células semelhantes aos odontoblastos. Os resultados deste estudo comprovaram que é possível utilizar células estaminais recolhidas de dentes cariados já que, comparativamente com as células estaminais recolhidas de dentes saudáveis não se verificaram diferenças no fenótipo nem no potencial multidiferencial das mesmas *in vitro*. Adicionalmente, quando cultivadas no scaffold, estas células foram capazes de produzir uma matriz mineralizada de dentina. Este estudo aumenta as opções regenerativas quando não é possível realizar o tratamento conservador ou ainda por motivos ortodônticos, já que possibilita a recolha de células estaminais tanto em dentes saudáveis como cariados. Por outro lado, Sonoda S. e col (40) isolaram DPSCs de dentes com pulpíte irreversível (IP-DPSCs) e avaliaram se estas células seriam adequadas para a regeneração da dentina/polpa. Comparativamente com as DPSCs recolhidas de dentes saudáveis, as IP-DPSCs mostraram uma menor capacidade de formação de colónias, de duplicação, de proliferação, de multipotencialidade, de regenerar dentina *in vivo* e menor atividade imunossupressiva. Desta forma, concluíram que estas células não são adequadas para a

regeneração dos tecidos. Numa tentativa de melhorar as qualidades das IP-DPSCs, os autores utilizaram o interferão gamma (IFN- γ) e o fator alfa (TNF- α) como abordagem moduladora. Concluíram que o IFN- γ aumentou a capacidade das IP-DPSCs regenerarem um tecido semelhante ao complexo dentino/pulpar, enquanto que o TNF- α o diminuiu. Apesar do IFN- γ melhorar as capacidades destas células, o tipo de dentina neoformada não apresentava estruturas tubulares pelo que mais estudos são necessários para validar estas células como passíveis de serem utilizadas na regeneração da dentina.

A forma como as células estaminais são colhidas e cultivadas pode influenciar as suas capacidades na possível regeneração de tecidos. Piva E. e col concluíram que as DPSCs podem ser isoladas e expandidas num meio desprovido de soro animal e até mesmo fatores de crescimento exógenos, mantendo as suas propriedades angiogénicas. Estas células foram capazes de se diferenciar em células semelhantes a odontoblastos e secretar uma matriz de dentina mineralizada a uma velocidade semelhante às DPSCs isoladas e cultivadas num soro animal, assim como ao que é observado numa polpa dentária normal. (4)

b. Scaffolds

Na engenharia de tecidos, os scaffolds são estruturas extremamente importantes que servem para providenciar o microambiente adequado para albergar as células e orientar a sua adesão, crescimento e subsequente diferenciação. Este microambiente deverá possuir propriedades físicas e químicas específicas de cada tecido. (13, 29, 31) Estas estruturas podem ser classificadas quanto a sua origem em naturais, sintéticas e cerâmico bioativas. Dentro dos scaffolds naturais existem o colagénio, o quitosano, o alginato e o ácido hialurónico; nos sintéticos pode-se encontrar o ácido poliglicólico e o ácido polilático; e por fim, nos cerâmicos bioativos utiliza-se a hidroxiapatite e o biovidro. (3)

O scaffold ideal deverá cumprir alguns critérios: ter estabilidade química, força mecânica, biocompatibilidade, degradação controlada sem a libertação de componentes tóxicos, permitir a adesão e proliferação celular, ter baixa imunogenicidade e, inclusivamente, permitir a vascularização. Adicionalmente, deverá ser facilmente manuseável e possuir a porosidade adequada que permita a penetração e difusão celular. (9, 31) Qualquer alteração que ocorra neste microambiente é capaz de promover uma alteração no comportamento celular. (13)

O tamanho dos poros dos scaffolds parece influenciar a adesão, proliferação, migração, morfologia e expressão celular, assim Conde M. e col investigaram a influência de um scaffold

de ácido polilático (PLLA) com poros de menor tamanho comparativamente com os de maior tamanho verificando que não existe uma diferença significativa já que ambos os scaffolds providenciaram um microambiente favorável para a diferenciação das DPSCs, atingindo resultados muito semelhantes. (32)

Outros autores como Goulin L. e col, Lee C. e col, Tian Y. e col, Tran H. e col, Tran H. e col e Chen H. e col (15, 21, 22, 33-35) avaliaram a utilização de uma matriz dentinária tratada (DDM) como scaffold. Esta dentina pode ser tratada tanto química como mecanicamente. A técnica química consiste na utilização de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido cítrico havendo a completa remoção da smear layer e exposição dos túbulos dentinários. (15, 35) Alguns autores avaliaram a citotoxicidade desta técnica, comprovando que não é tóxica para as células. (35) Este tratamento é muito importante já que a smear layer é constituída por detritos orgânicos, inorgânicos e ainda lascas de dentina. Os detritos orgânicos, como os detritos da polpa dentária, odontoblastos, microorganismos e inclusivamente os produtos que estes secretam, são um potencial risco para a resposta imunológica sendo impreterível a sua remoção. (35)

Alguns estudos prévios demonstraram que a cultura das DPSCs em matrizes dentinárias tratadas tanto química como mecanicamente pareciam estabelecer uma morfologia semelhante a odontoblastos com processos citoplasmáticos que se estendiam até ao interior dos túbulos dentinários. (15) Goulin L e col (21) estudaram o efeito desta matriz quando associada às DPSCs, tanto *in vitro* como *in vivo*, na formação de tecidos mineralizados concluindo que esta matriz foi capaz de induzir a diferenciação odontoblástica das DPSCs e produzir um tecido mineralizado semelhante à dentina *in vivo* – predentina. Os resultados destes autores mostram que a utilização de complexos DDM/DPSCs têm potencial para servir como substituto na regeneração dentinária, comparativamente com o scaffold de fosfato de hidroxiapatite tricálcico (HA-TCP). Assim, acredita-se que a utilização de biomateriais naturais são superiores aos scaffolds sintéticos no que diz respeito aos seus efeitos no comportamento e função celular. Adicionalmente, Lee C. e col (33) também concluíram que a inclusão de DDM na cultura aumentou significativamente o número de células viáveis. Neste estudo especificamente, chegaram à conclusão que o DDM tem o potencial de estimular a expansão celular, reduzir a apoptose e ainda induzir a sintetização de uma matriz mineralizada, sendo que todas estas observações se mostraram dependentes da concentração.

Tran H. e col, (35) após realizarem o tratamento da matriz pela técnica química, realizaram a esterilização da mesma com a utilização da radiação gamma e verificaram que não ocorreu qualquer tipo de desnaturação/efeito negativo nas proteínas bioativas da matriz enfatizando a possibilidade de utilizar esta radiação como método de esterilização. Adicionalmente, neste estudo, a utilização do EDTA e ácido cítrico combinados com a radiação

gamma foram eficazes na produção deste scaffold, havendo a manutenção de um alto nível de proteínas bioativas na matriz e mantendo a biocompatibilidade para a sua aplicação na engenharia de tecidos dentários.

A utilização de aluminato de cálcio como fase mineral tem demonstrado ser promissor na regeneração da dentina e do osso já que é possível a libertação de Ca^{++} mantendo um pH neutro, o que tem um efeito direto na diferenciação celular. Desta forma, Soares D. e col avaliaram o potencial dentinogénico de uma biomembrana composta por quitosano e colagénio, contendo o aluminato de cálcio como fase mineral (BMACAC), utilizando as DPSCs. (36) Observaram que esta membrana, comparativamente com o grupo controlo (biomembrana sem DPSCs), possibilitou uma proliferação mais rápida das células, a diferenciação das DPSCs em células semelhantes a odontoblastos e a deposição de uma quantidade de matriz mineralizada cinco vezes superior ao controlo.

Louvrier A. e col (37), utilizaram um scaffold 3D de Policaprolactona (PCL) – polímero sintético biodegradável, para avaliar a capacidade de adesão, proliferação e diferenciação das DPSCs recolhidas de dentes cariados. Este scaffold possuía uma estrutura 3D em forma de cone e foi produzido pela técnica de pulverização a jato tendo poros de maiores dimensões, sendo mais porosos e com fibras de menor tamanho comparativamente com outras técnicas. Este scaffold permitiu o crescimento das DPSCs e inclusivamente, a sua diferenciação em células semelhantes a odontoblastos com posterior deposição de uma matriz mineralizada semelhante à dentina. No entanto a colonização do scaffold não foi homogénea pelo que esta situação poderá ser devida às células estaminais em si, ou a algum problema decorrente da produção do scaffold sendo necessários mais estudos para a possível aplicabilidade deste scaffold nas técnicas regenerativas.

Theocharidou A. e col (41) avaliaram o potencial da irradiação com laser de baixa intensidade (LLLI) na promoção da diferenciação odontogénica e biomineralização das DPSCs cultivadas em scaffolds biocerâmicos 3D à base de magnésio (Mg) e à base de zinco (Zn). Estes scaffolds induziram a adesão e o crescimento das células estaminais na sua estrutura porosa. O efeito benéfico destes scaffolds é devido à libertação constante de baixas concentrações destes dois iões. O Mg tem vantagens ao nível das propriedades mecânicas, do índice de biodegradação, e também na proliferação e crescimento das células. Por outro lado, o Zn é um elemento que faz parte do corpo humano e participa em várias funções, tendo ainda um papel importante na formação do tecido ósseo mostrando uma capacidade anti-inflamatória, antibacteriana e propriedades angiogénicas. A fotobiomodulação (PBM) aumentou significativamente a diferenciação celular das DPSCs.

Contrariamente ao que está preconizado, alguns autores avaliaram a capacidade das DPSCs se diferenciarem em células semelhantes a odontoblastos na ausência de scaffolds. Neunzhen J. e col, fizeram uma cultura de esferóides posteriormente aplicada no canal dentinário. (43) As DPSCs mostraram elevado potencial para a engenharia de tecidos dentários quando organizadas em esferas. Neste estudo, os autores verificaram que as DPSCs se diferenciaram em células semelhantes a odontoblastos e ainda foram capazes de produzir uma formação biomineral na dentina da raiz sem qualquer adição de fatores de crescimento. Acredita-se que esta estrutura formada advenha da interação das células com a dentina presente na raiz, já que, como abordado anteriormente, têm a capacidade de libertar fatores de crescimento como o fator de crescimento β (TGF- β).

Outros autores utilizaram scaffolds de ácido polilático (PLLA). Xie H. e col para avaliar a capacidade de diferenciação em células semelhantes a odontoblastos das iPSCs derivadas das DPSCs *in vivo* (16), e Piva E. e col para avaliar as DPSCs cultivadas em soro humano na regeneração da polpa dentária *in vivo*. (4)

A cultura das DPSCs para a engenharia de tecidos *in vitro* é desafiante, já que muitas vezes estas células quando aplicadas *in vivo*, têm uma proliferação e diferenciação muito lenta. Desta forma, Li Y. e col propuseram-se a avaliar o efeito de uma cultura dinâmica numa microcavidade simulada (3D SMG) na capacidade de proliferação e diferenciação odontogénica das DPSCs num scaffold poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). O PLGA é um copolímero com propriedades físicas e dinâmicas desejáveis e já é um biomaterial comumente utilizado na engenharia de tecidos. (11) Apesar de alguns estudos considerarem que alguns biomateriais 3D são adequados para a proliferação e diferenciação, existem alguns problemas na cultura estática. Nomeadamente, devido ao efeito da gravidade, as células acabam por ficar ao nível da base do scaffold em vez de se distribuírem de uma forma uniforme no mesmo, e inclusivamente o ar, os nutrientes e os resíduos metabólicos ficam também distribuídos de uma forma desigual. Os resíduos metabólicos celulares são dificilmente transportados para fora do scaffolds e a concentração dos fatores de crescimento/diferenciação ficam confinados à superfície do scaffold resultando numa diminuição da taxa de proliferação/diferenciação das células. Assim, a utilização de uma cultura 3D dinâmica pode ser a solução para estes problemas apresentados. Segundo estes autores, o sistema dinâmico utilizado aumentou significativamente a proliferação e diferenciação odontogénica das DPSCs pela melhoria do microambiente e do metabolismo celular destas células. (11) Rad R. e col desenvolveram e caracterizaram scaffolds 3D nanopartículas de vidro bioativo modificadas pelo boro contendo acetato de celulose/pullulan oxidado/Gel (B-BG-NPs contendo CA/ox-PULL/GEL 3D) com morfologia tubular para a regeneração da dentina. (2) Estes scaffolds possuíam uma estrutura tubular alinhada com uma distribuição homogénea de

nanopartículas de vidro bioativo (BG-NPs), apresentando uma biodegradabilidade favorável durante um mês. A alta porosidade deste scaffold mostrou ser adequada para a regeneração da dentina, tendo sido capaz de aumentar a adesão, proliferação e diferenciação odontoblástica das DPSCs, contribuindo para a deposição de elevadas quantidades de minerais.

Como já foi abordado previamente, a dentina é um scaffold adequado para a engenharia de tecidos dentinários uma vez que é capaz de providenciar as combinações e concentrações mais apropriadas das proteínas bioativas para albergar as células odontogênicas. Estas matrizes são maioritariamente tratadas quimicamente com EDTA e ácido cítrico mas Wang F. e col usaram uma técnica modificada criando um scaffold de matriz dentinária liofilizada (FDDM). (52) Em termos de características biológicas e mecânicas, este scaffold mostrou-se muito semelhante à dentina. As DPSCs quando cultivadas neste scaffold apresentaram maior crescimento, viabilidade e capacidade de secreção de colagénio, no entanto a capacidade de mineralização diminuiu.

c. Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são proteínas que possuem a capacidade de desencadear reações intracelulares pela ligação a locais específicos da membrana celular, sinalizando e modulando o comportamento dessas células. (13) É de extrema relevância ter conhecimento de quais são os fatores de crescimento adequados para cada tipo específico de células e quais têm a capacidade de direcionar a proliferação e diferenciação do tipo celular na linhagem pretendida. (26)

Dos fatores de crescimento que têm vindo a ser utilizados na regeneração de tecidos dentários podemos salientar a família dos fatores de crescimento beta (TGF- β) – especialmente o TGF- β 1 – já que são fatores reguladores de diversos eventos no desenvolvimento, na doença e na resposta imunológica; as proteínas morfogênicas do osso (BMPs) pela sua capacidade de estimular a diferenciação celular e mineralização; o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (13), o fator de crescimento fibroblástico (FGF) e o fator de crescimento insulínico (IGF) (33) que são responsáveis por regular a patofisiologia da angiogénese através da indução da proliferação e diferenciação de células endoteliais. (31) Os fatores de crescimento são, então, fulcrais na regulação do comportamento celular, sendo que na ausência destes a regeneração de tecidos funcionais pode não ser conseguida. (31)

A utilização de uma matriz dentinária tratada tem vantagens sobre muitos outros scaffolds. Apesar da descalcificação levada a cabo nestas matrizes, a DDM mantém as funções

semelhantes às dos túbulos dentinários. Os feixes da dentina inter e peritubular tornam-se desprendidos e as proteínas e fatores de crescimento que estão aderidos à matriz de colagénio são constantemente libertados. Goulin L. e col (21) detetaram uma ação sinérgica destes fatores de crescimento – BMP-2, TGF- β 1 e bFGF – libertando sinais de adesão favoráveis para a adesão e crescimento das células estaminais utilizadas no estudo. Comparando com o scaffold HA-TCP, como não se verificou a existência de moléculas bioativas, esta superfície não promoveu o crescimento celular. A presença destes fatores de crescimento, que são detetados na DDM, sugerem então que esta matriz providencia nutrientes e fatores de crescimento que são importantes para a adesão e migração das DPSCs. Lee C. e col afirmam que estes “cocktails” de fatores de crescimento – TGF- β 1, PDGF, FGF e IGF – quando presentes coletivamente possuem uma capacidade de sinalização muito superior e com concentrações inferiores do que em estudos em que usam apenas um fator de crescimento exógeno. (33)

Segundo Xie H. e col, o fator de crescimento BMP-4 tem o potencial de induzir a diferenciação odontoblástica das iPSCs *in vitro*. (16) Este fator de crescimento regula o início do desenvolvimento do dente, a morfogénese e ainda o desenvolvimento da forma e, por este motivo, tem de ser tido em consideração aquando da regeneração de tecidos.

O fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) é um agente mitogénico e angiogénico muito conhecido e amplamente utilizado na regeneração de tecidos. Zhang M. e col demonstraram que a sobre-expressão deste fator de crescimento nas DPSCs aumenta a sua proliferação e também a sua capacidade de diferenciação odontoblástica. Adicionalmente, o PDGF-BB que faz parte da família do PDGF é um importante mediador na cicatrização de feridas e na regeneração de tecidos, tendo sido capaz de facilitar a CH aumentado a regeneração do complexo dentino-pulpar *in vivo* mediado pelas DPSCs. (46)

d. Marcadores

A matriz orgânica da dentina contém colagénio, proteínas não-colagénias, folfolípidos e fatores de crescimento. (28) Este tecido contém ainda um número significativo de proteínas fosforiladas como é exemplo a sialoproteína de dentina (DSP), fosfoproteína de dentina (DPP), sialoproteína óssea (BSP), fosfoproteína ácida 1 (DMP-1), osteopontina e a matriz extracelular de fosfoglicoproteína (MEPE) que fazem parte de uma família de moléculas bioativas. Estas são moléculas reguladoras muito importantes que equilibram a promoção e inibição dos processos de mineralização. A DMP-1 é secretada pelos odontoblastos secretores e é essencial para a mineralização, estando presente quando a predentina matura em dentina. A sialoproteína óssea

(BSP) controla a biomineralização, tendo um papel importante na formação de cristais de hidroxiapatite durante os estágios iniciais da secreção do tecido. A MEPE é também detetada nos odontoblastos. A OCN é uma proteína que pode ser identificada na matriz extracelular do osso, sendo que também já foi detetada no corpo e no processo das células odontoblásticas. (28)

Estes são marcadores muito importantes na dentinogênese. DSPP é um marcador específico da dentina que promove ativamente e controla a mineralização das fibras de colagénio e o crescimento de cristais na predentina, sendo de extrema importância na mineralização da dentina. Por outro lado, a DSP é o resultado da clivagem da DSPP e acredita-se que seja um marcador funcional para a secreção ativa de odontoblastos. (34) Adicionalmente, a fosfatase alcalina (ALP) é também um marcador muito utilizado por vários estudos já que esta é encontrada na matriz orgânica, podendo estar associada a vesículas ou ocorrendo livremente na matriz. A ALP é considerada uma ferramenta importante para a diferenciação odontoblástica e na biomineralização da dentina já que esta biomolécula estimula a mineralização pelo fornecimento de fosfato que permite a continuação do crescimento dos cristais. (27)

No estudo realizado por Tien Y. e col, as DFPCs demonstraram uma maior expressão de DSPP comparativamente com as PDLCs indicando que as primeiras têm uma capacidade superior para a dentinogênese. (34)

Os estudos incluídos nesta revisão avaliaram a expressão destes marcadores como forma de identificar a presença ou não de odontoblastos e, inclusivamente a formação de uma matriz mineralizada de dentina. 67,65% dos estudos avaliaram a DSPP, 58,82% avaliaram a DMP-1, 20,59% avaliaram a BSP, 17,65% avaliaram a DSP, 14,71% avaliaram a ALP, 11,76% avaliaram a presença de colagénio tipo I, 8,82% avaliaram a OCN e 5,88% avaliaram a MEPE. Daqui se depreende que a maioria dos estudos utilizou os marcadores DSPP e DMP-1.

Perspetivas Futuras

Para que as células estaminais de origem dentária possam ser utilizadas na regeneração de tecidos, necessitam obrigatoriamente de percorrer todo um processo tecnicamente exigente, extremamente detalhado e, de certa forma, complexo. Adicionalmente, são células que necessitam de regras específicas de monitorização e armazenamento de modo a garantir tanto a qualidade como a segurança na sua aplicação clínica. (9) A técnica de liofilização parece ser uma oportunidade para estabelecer bancos de dentes e possibilitar a comercialização destes produtos para o uso diário. (52) Além do mais, é importante referir que todos os procedimentos necessários para este tipo de terapias podem acabar por ter um custo muito elevado para o paciente e, pensando no processo clínico, demorarão sempre mais tempo a ser concluídas do que um procedimento terapêutico convencional – um implante ou uma prótese, podendo ser facilmente descartado pelo paciente. (55)

Outro dos problemas que está inerente a estas terapias é a idade avançada. Todos os estudos incluídos nesta revisão bibliográfica recolheram células de animais e adultos jovens. Se pensarmos na polpa dentária, sabemos que tem várias funções inclusivamente na atividade celular durante a formação da dentina. Este tecido altamente vascularizado sofre diversas alterações com o avanço da idade como a diminuição da câmara pulpar, a deposição progressiva de massas calcificadas, a redução do número de nervos e vasos sanguíneos assim como o aumento da componente fibrosa. Facilmente se compreende que a capacidade de regeneração pulpar e dentinária nestas condições fica comprometida. (24)

Durante o período de expansão celular, é possível que haja a contaminação microbiana das células que levará a deterioração biológica e até mesmo à apoptose celular. Mais ainda, este tipo de células multi e totipotentes são células propensas à transformação maligna aumentando a preocupação relativamente à segurança no que concerne a carcinogénese. Assim, a evolução no campo da engenharia de tecidos aplicada à medicina dentária é dependente do desenvolvimento de técnicas adequadas de expansão e controlo celular, assim como a criação de microambientes apropriados e ajustados ao tipo de célula estaminal.

Outro fator a ter em conta é o tipo de cultura das células. Pela análise dos estudos incluídos, verificamos que a cultura 3D dinâmica (11) e em forma de esferas (43) parece ser a mais adequada para proporcionar uma correta regeneração da dentina. Por outro lado, uma das maiores dificuldades da regeneração da dentina é conseguir uma estrutura tubular organizada. Segundo os estudos, esta dificuldade associa-se com o défice de sinais de diferenciação e maturação das células semelhantes aos odontoblastos ou até mesmo devido ao número reduzido

de células administradas. (45) Assim, uma melhoria no microambiente com a introdução de moléculas bioativas poderá ser a solução.

Perante uma terapia baseada na engenharia de tecidos, é imprescindível a utilização de materiais restauradores que não se apresentem citotoxicidade para as células. Lee S. e col (6) verificaram que a utilização das resinas Bulk-Fill em cavidades superiores a 4mm apresentaram uma ação citotóxica e antidiferencial nas DPSCs pelo que a sua utilização em cavidades de grandes dimensões não deverá ser implementada sob o risco de falha na terapêutica. Contrariamente, materiais como o Biodentine podem ser uma opção viável para aplicação muito próxima da polpa. (5)

Apesar das evidentes desvantagens da utilização de animais de grande porte (ex: cães e mini porcos), pelas dificuldades técnicas e na sua manipulação, estes, em termos proporcionais, assemelham-se mais ao ser humano. Assim, este tipo de modelos ajuda na experimentação de várias condições e dificuldades inerentes à regeneração de tecidos para que se possa avançar com protocolos que possam ser aplicados na clínica médico-dentária. (10, 12, 44, 48)

Assim, os estudos futuros devem ter como objetivo adequar a tecnologia sintética aplicada *in vitro/in vivo* para a aplicação clínica no que concerne a segurança, biocompatibilidade, simplicidade do procedimento, reabilitação de lesões mais extensas e finalmente a efetividade e funcionalidade dos tecidos regenerados. Antes destas tecnologias poderem passar para o consultório médico-dentário, a sua eficácia deverá ser apoiada por um número adequado de ensaios tipo controlo clínico randomizado que forneçam evidências científicas e julgamento clínico relevantes.

Conclusões

As últimas evoluções na pesquisa das capacidades das células estaminais, no desenvolvimento de scaffolds adequados e a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos fornecem possibilidades importantes para a sua futura aplicabilidade nas terapias regenerativas médico-dentárias. Ainda assim, são poucas as abordagens que já são passíveis de ser utilizadas rotineiramente na clínica, perspetivando-se que esta realidade se altere nos próximos anos.

Para uma exploração ideal do potencial das diferentes estratégias da engenharia de tecidos e a sua posterior implementação na atividade clínica é necessário que se desenvolvam biomateriais avançados e que se compreenda qual a sua influência, a nível biológico, no microambiente criado juntamente das células estaminais. Por outro lado, e de um ponto de vista mais técnico, é de extrema importância a implementação de protocolos rigorosos, fiáveis, reprodutíveis e de qualidade para permitir o avanço destas tecnologias regenerativas para a prática clínica.

Referências

1. Smith ATJ, Cooper PR. Cellular signaling in dentin repair and regeneration. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*: Elsevier; 2015. p. 405-17.
2. Rad RM, Atila D, Akgün EE, Evis Z, Keskin D, Tezcaner A. Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;100:928-48.
3. Mozaffari MS, Emami G, Khodadadi H, Baban B. Stem cells and tooth regeneration: prospects for personalized dentistry. *EPMA Journal*. 2019;10(1):31-42.
4. Piva E, Tarlé SA, Nör JE, Zou D, Hatfield E, Guinn T, et al. Dental pulp tissue regeneration using dental pulp stem cells isolated and expanded in human serum. *Journal of endodontics*. 2017;43(4):568-74.
5. Jeong SY, Lee S, Choi WH, Jee JH, Kim H-R, Yoo J. Fabrication of Dentin-Pulp-Like Organoids Using Dental-Pulp Stem Cells. *Cells*. 2020;9(3):642.
6. Lee S-M, Kim S-Y, Kim J-H, Jun S-K, Kim H-W, Lee J-H, et al. Depth-Dependent Cellular Response from Dental Bulk-Fill Resins in Human Dental Pulp Stem Cells. *Stem cells international*. 2019;2019.
7. Ozeki N, Hase N, Mogi M, Nakata K. New findings for dentin sialophosphoprotein studies: Applications of purified odontoblast-like cells derived from stem cells. *Journal of Oral Biosciences*. 2016;58(4):128-33.
8. Yelick P, Sharpe P. Tooth Bioengineering and Regenerative Dentistry. *Journal of dental research*. 2019;98(11):1173-82.
9. El Gezawi M, Wölfle UC, Haridy R, Fliefel R, Kaisarly D. Remineralization, Regeneration, and Repair of Natural Tooth Structure: Influences on the Future of Restorative Dentistry Practice. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2019;5(10):4899-919.
10. Kuo T-F, Sheu S-Y, Jiang C-C, Chang H-H, Chen S-T, Chen R-S, et al. TOOTH REGENERATION WITH DENTAL STEM CELL RESEARCH IN MINIATURE PIG MODEL. *Taiwan Veterinary Journal*. 2015;41(03):197-203.
11. Li Y, He L, Pan S, Zhang L, Zhang W, Yi H, et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice. *Molecular medicine reports*. 2017;15(2):873-8.
12. Abdelaz P, ElZoghbi A, Shokry M, Ahmed A-Z, Rasha H. Reparative dentin formation using stem cell therapy versus calcium hydroxide in direct pulp capping: an animal study. *Brazilian Dental Journal*. 2019;30(6):542-9.
13. DEMARCO GT, KIRSCHNICK LB, WATSON LB, CONDE MCM, DEMARCO FF, CHISINI LA. Qual a aplicabilidade clínica das terapias regenerativas na odontologia? *RGO-Revista Gaúcha de Odontologia*. 2017;65(4):359-67.
14. Kim S, Shin S-J, Song Y, Kim E. In vivo experiments with dental pulp stem cells for pulp-dentin complex regeneration. *Mediators of Inflammation*. 2015;2015.
15. Tran HLB, Doan VN. Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell and tissue banking*. 2015;16(4):559-68.

16. Xie H, Dubey N, Shim W, Ramachandra C, Min K, Cao T, et al. Functional odontoblastic-like cells derived from human iPSCs. *Journal of dental research*. 2018;97(1):77-83.
17. Sunil PM. Induced pluripotent stem cells in dentistry. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2016;8(Suppl 1):S23.
18. Mao X, Liu Y, Chen C, Shi S. Mesenchymal stem cells and their role in dental medicine. *Dental Clinics*. 2017;61(1):161-72.
19. Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Translational Medicine*. 2020;9(4):445-64.
20. Bakhtiar H, Mazidi A, Asl SM, Ellini M, Moshiri A, Nekoofar M, et al. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Progress in Biomaterials*. 2018;7(4):249-68.
21. Liu G, Xu G, Gao Z, Liu Z, Xu J, Wang J, et al. Demineralized dentin matrix induces odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs*. 2016;201(1):65-76.
22. Chen H, Fu H, Wu X, Duan Y, Zhang S, Hu H, et al. Regeneration of pulpo-dentinal-like complex by a group of unique multipotent CD24a+ stem cells. *Science Advances*. 2020;6(15):eaay1514.
23. Chalissery E, Nam S, Park S, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *J Tissue Eng* 8: 2041731417702531. 2017.
24. Abdel Meguid E, Ke Y, Ji J, El-Hashash AH. Stem cells applications in bone and tooth repair and regeneration: New insights, tools, and hopes. *Journal of cellular physiology*. 2018;233(3):1825-35.
25. Tejinder K. Stem Cell in Dentistry - Potencial Contributions, Challenges and Future. *International Journal of Emerging Research in Management and Technology (IJERMT)*. 2017;6.
26. Amrollahi P, Shah B, Seifi A, Tayebi L. Recent advancements in regenerative dentistry: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;69:1383-90.
27. Moussa MS, Hafez S, Sabry D. In Vitro differentiation potential of Isolated dental pulp stem cells. *Egyptian Dental Journal*. 2018;64(1-January (Oral Medicine, X-Ray, Oral Biology & Oral Pathology)):223-31.
28. Sloan AJ. Biology of the dentin-pulp complex. *Stem cell biology and tissue engineering in dental sciences*: Elsevier; 2015. p. 371-8.
29. Tsutsui TW. Dental pulp stem cells: Advances to applications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*. 2020;13:33.
30. Rajan S, Ljunggren A, Manton D, Björkner AE, McCullough M. Post-mitotic odontoblasts in health, disease, and regeneration. *Archives of Oral Biology*. 2020;109:104591.
31. Proksch S, Galler KM. Scaffold Materials and Dental Stem Cells in Dental Tissue Regeneration. *Current Oral Health Reports*. 2018;5(4):304-16.
32. Conde CM, Demarco FF, Casagrande L, Alcazar JC, Nör JE, Tarquinio SBC. Influence of poly-L-lactic acid scaffold's pore size on the proliferation and differentiation of dental pulp stem cells. *Brazilian dental journal*. 2015;26(2):93-8.

33. Lee CP, Colombo JS, Ayre WN, Sloan AJ, Waddington RJ. Elucidating the cellular actions of demineralised dentine matrix extract on a clonal dental pulp stem cell population in orchestrating dental tissue repair. *Journal of Tissue Engineering*. 2015;6:2041731415586318.
34. Tian Y, Bai D, Guo W, Li J, Zeng J, Yang L, et al. Comparison of human dental follicle cells and human periodontal ligament cells for dentin tissue regeneration. *Regenerative Medicine*. 2015;10(4):461-79.
35. Tran HLB, Nguyen MTN, Doan VN. Fabrication and evaluation of human dentin as scaffold for dental pulp stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015;12(4):222-30.
36. Soares DG, Rosseto HL, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J, COSTA CAdS. Chitosan-collagen biomembrane embedded with calcium-aluminate enhances dentinogenic potential of pulp cells. *Brazilian oral research*. 2016;30(1).
37. Louvrier A, Euvrard E, Nicod L, Rolin G, Gindraux F, Pazart L, et al. Odontoblastic differentiation of dental pulp stem cells from healthy and carious teeth on an original PCL-based 3D scaffold. *International endodontic journal*. 2018;51:e252-e63.
38. Ling-Ling C, editor *Dental Tissue Engineering of EMPs on human dental pulp stem cells*. 2016 Eighth International Conference on Measuring Technology and Mechatronics Automation (ICMTMA); 2016: IEEE.
39. Kawamura R, Hayashi Y, Murakami H, Nakashima M. EDTA soluble chemical components and the conditioned medium from mobilized dental pulp stem cells contain an inductive microenvironment, promoting cell proliferation, migration, and odontoblastic differentiation. *Stem cell research & therapy*. 2016;7(1):77.
40. Sonoda S, Yamaza H, Ma L, Tanaka Y, Tomoda E, Aijima R, et al. Interferon-gamma improves impaired dentinogenic and immunosuppressive functions of irreversible pulpitis-derived human dental pulp stem cells. *Scientific reports*. 2016;6:19286.
41. Theocharidou A, Bakopoulou A, Kontonasaki E, Papachristou E, Hadjichristou C, Bousnaki M, et al. Odontogenic differentiation and biomineralization potential of dental pulp stem cells inside Mg-based bioceramic scaffolds under low-level laser treatment. *Lasers in medical science*. 2017;32(1):201-10.
42. Yoshida S, Wada N, Hasegawa D, Miyaji H, Mitarai H, Tomokiyo A, et al. Semaphorin 3A induces odontoblastic phenotype in dental pulp stem cells. *Journal of dental research*. 2016;95(11):1282-90.
43. Neunzehn J, Pötschke S, Hannig C, Wiesmann H-P, Weber M-T. Odontoblast-like differentiation and mineral formation of pulpsphere derived cells on human root canal dentin in vitro. *Head & Face Medicine*. 2017;13(1):23.
44. Mangione F, Ezeldeen M, Bardet C, Lesieur J, Bonneau M, Decup F, et al. Implanted dental pulp cells fail to induce regeneration in partial pulpotomies. *Journal of Dental Research*. 2017;96(12):1406-13.
45. Haeri M, Sagomonyants K, Mina M, Kuhn LT, Goldberg AJ. Enhanced differentiation of dental pulp cells cultured on microtubular polymer scaffolds in vitro. *Regenerative engineering and translational medicine*. 2017;3(2):94-105.
46. Zhang B, Wu X, Zhang X, Sun Y, Yan Y, Shi H, et al. *Stem Cells Transl. Med*. 2012;1:480-91.

47. Toriumi T, Kawano E, Yamanaka K, Kaneko T, Oka A, Yuguchi M, et al. Odontogenic Tissue Generation Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Tissue Engineering Application. *Journal of Hard Tissue Biology*. 2018;27(3):257-68.
48. Zhu X, Liu J, Yu Z, Chen C-A, Aksel H, Azim AA, et al. A miniature swine model for stem cell-based de novo regeneration of dental pulp and dentin-like tissue. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2018;24(2):108-20.
49. Sonoda S, Mei Y-f, Atsuta I, Danjo A, Yamaza H, Hama S, et al. Exogenous nitric oxide stimulates the odontogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Scientific reports*. 2018;8(1):1-11.
50. Lew WZ, Feng SW, Lin CT, Huang HM. Use of 0.4-Tesla static magnetic field to promote reparative dentine formation of dental pulp stem cells through activation of p38 MAPK signalling pathway. *International endodontic journal*. 2019;52(1):28-43.
51. Lin W, Gao L, Jiang W, Niu C, Yuan K, Hu X, et al. The role of osteomodulin on osteo/odontogenic differentiation in human dental pulp stem cells. *BMC oral health*. 2019;19(1):22.
52. Wang F, Xie C, Ren N, Bai S, Zhao Y. Human Freeze-dried Dentin Matrix as a Biologically Active Scaffold for Tooth Tissue Engineering. *Journal of Endodontics*. 2019;45(11):1321-31.
53. Zaugg L, Banu A, Walther A, Chandrasekaran D, Babb R, Salzlechner C, et al. Translation Approach for Dentine Regeneration Using GSK-3 Antagonists. *Journal of Dental Research*. 2020;99(5):544-51.
54. Hynes K, Menichanin D, Bright R, Ivanovski S, Hutmacher D, Gronthos S, et al. Induced pluripotent stem cells: a new frontier for stem cells in dentistry. *Journal of Dental Research*. 2015;94(11):1508-15.
55. Gong T, Heng BC, Lo ECM, Zhang C. Current advance and future prospects of tissue engineering approach to dentin/pulp regenerative therapy. *Stem Cells International*. 2016;2016.
56. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Frontiers of medicine*. 2019;13(2):152-9.

Anexos

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DO TRABALHO APRESENTADO

Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, no Mestrado Integrado em Medicina Dentária, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 7 de Julho de 2020

Cíntia dos Santos Vilar

(Cíntia dos Santos Vilar)

**PARECER DO ORIENTADOR PARA ENTREGA DEFINITIVA DO TRABALHO
APRESENTADO**

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela estudante Cíntia dos Santos Vilar com o título: “Utilização de Células Estaminais na Regeneração de Tecidos Dentários: Artigo de Revisão”, está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 7 de Julho de 2020

O Orientador,



(Professor Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro de Melo)

PARECER DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Nome do Estudante	Título da Monografia de Investigação / Relatório de Atividade Clínica	Área / Uc	Orientador(a) / Coorientador(a)	Modalidade do Projeto	Alterou a Modalidade do Projeto, de acordo com a possibilidade cedida Pelo Sr. Diretor do Ciclo de Estudos do MIMD, de 19.3.2020	Pareceres juntos ao processo	Parecer da Comissão Científica	Recomendação da Comissão Científica
Cíntia dos Santos Vilar	<p>"Utilização de Células Estaminais na Regeneração de Tecidos Dentários: Artigo de Revisão"</p> <p>"Use of Stem Cells in Dental Tissue Regeneration: review Article"</p>	Dentisteria Operatória	<p>Orientador: Prof. Doutor Paulo Rui Galvão Ribeiro de Melo</p> <p>Coorientador: Prof. Doutor Álvaro Amadeu Ferreira de Azevedo</p>	Artigo de Revisão Bibliográfica	Sim	<p>Parecer da Com. Ética da FMDUP/Outra: Não carece</p> <p>Parecer da Proteção de dados da UP: Não carece</p> <p>Deliberação do RAI da FMDUP/Outro: Não carece</p>	Aprovado	---