



Alessandra Eberienos Ungaro

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2019





Alessandra Eberienos Ungaro

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2019



Alessandra Eberienos Ungaro

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências da Saúde
da Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.

Alessandra Eberienos Ungaro



Resumo

Apesar dos avanços da medicina regenerativa e da bioengenharia, a regeneração do tecido dentário ainda representa um desafio. A reparação do tecido pulpar, por indução de sangramento periapical, em dentes imaturos e maduros, tem resultados limitados. Os crescentes estudos acerca do potencial das células estaminais, multi(CEM) e pluripotentes(CEP), permitem acreditar na possibilidade da regeneração efetiva do complexo dentina-polpa. Face à complexidade e inovação do tema, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a utilização de células estaminais na reparação dos danos teciduais, com foco no potencial terapêutico das células de pluripotência induzidas (iPS) como futuro protocolo alternativo em endodontia. Vários fatores influenciam a viabilidade clínica das CEMs e CEPs: desde os agentes irrigantes e antibióticos usados para a desinfecção do canal, até ao potencial de indução de diferenciação dessas células, sendo necessários mais estudos até que possam ser utilizadas com sucesso clínico.

Palavras-chave: polpa, dentina, regeneração, células estaminais, células de pluripotência induzidas.



Abstract

Despite advances in regenerative medicine and bioengineering, dental tissue regeneration is still a challenge. Pulp tissue repair by induction of periapical bleeding in immature and mature teeth has limited results. The growing studies on the potential of multi (MST) and pluripotent (PSC) stem cells allows to believe in the possibility of effective regeneration of the dentin-pulp complex. Given the complexity and innovation of the theme, this study aimed to conduct a literature review on the use of stem cells to repair tissue damage, focusing on the therapeutic potential of induced pluripotency (iPS) cells as an alternative future protocol in endodontics. Several factors influence the clinical viability of MSTs and PSCs: from the irrigating agents and antibiotics used for canal disinfection, to the induction potential of differentiation of these cells, further studies are needed until they can be successfully used clinically.

Keywords: pulp, dentin, regeneration, stem cells, pluripotent stem cells



Índice Geral

Resumo	v
Abstract.....	vi
Índice Geral.....	vii
Índice de Abreviaturas e Siglas	viii
I. Introdução.....	1
II. Desenvolvimento.....	4
III. Discussão e Conclusões.....	10
IV. Bibliografia.....	16



Índice de Abreviaturas e Siglas

AAE Associação Americana de Endodontia (do inglês *American Association of Endodontists*)

CEE Célula estaminal embrionária

CEM Célula estaminal mesenquimal

CEP Célula estaminal pluripotente

DESC Célula estaminal do epitélio dental (do inglês *dental epithelial stem cell*)

DFSC Célula estaminal do folículo dental (do inglês *dental follicle stem cell*)

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

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

ESE Sociedade Europeia de Endodontia (do inglês *European Society of Endodontology*)

iPS Célula estaminal pluripotente induzida (do inglês *induced pluripotent stem cell*)

MTA Agregado trióxido mineral (do inglês *mineral trioxide aggregate*)

MO Medula óssea

NaOCl Hipoclorito de sódio

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

PRF Fibrina rica em plaquetas (do inglês *platelet-rich fibrin*)

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

REP Procedimento regenerativo endodôntico (do inglês *regenerative endodontic procedure*)

SCAP Célula estaminal da papila apical (do inglês *stem cells from the dental apical papilla*)

SHED Célula estaminal do dente decíduo humano esfoliado (do inglês *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

I. Introdução

O procedimento endodôntico regenerativo (REP) é uma técnica que tenta regenerar o complexo dentina-polpa danificado por infecção, trauma ou anomalia de desenvolvimento, em dentes imaturos ou maduros (Han *et al.*, 2019). Conceitualmente, pode ser definido como revascularização, inervação e restauração da camada de odontoblastos que ladeiam a superfície dentinária (Mao *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2019). A regeneração da polpa restaura a defesa imune do dente e pode também levar à regeneração da dentina perdida (Fouad e Verma, 2014; Saoud *et al.*, 2016), o que não acontece quando se usa material restaurador. Apesar de, histologicamente, não ser considerado um tecido pulpar verdadeiro, a presença de tecido vital no canal pulpar é biologicamente favorável.

O REP é mais desafiante em dentes maduros do que em imaturos, uma vez que esses apresentam menor quantidade de células estaminais, forame apical mais estreito e ausência da papila apical (Bucchi *et al.*, 2019). Estes fatores são considerados limitantes pois dificultam o fluxo de sangue e células estaminais para o interior da cavidade pulpar, e podem comprometer o sucesso do procedimento. Para além disso, há maior dificuldade na desinfecção de canais radiculares em dentes maduros devido a sua complexa conformação (Paryani e Kim, 2013).

Ainda não existem terapias regenerativas amplamente aceitas para polpa dentária de dentes adultos, mas atualmente as estratégias para dentes permanentes maduros, infetados ou traumatizados, podem ter duas abordagens distintas: i) transplante celular de células estaminais cultivadas *ex vivo* e ii) *homing* celular por moléculas que recrutam as células endógenas do paciente (He *et al.*, 2017). Nestes protocolos o canal é preenchido com sangue, em que o coágulo formado fará o papel do *scaffold* (moldes) e as células e fatores de crescimento do sangue serão responsáveis pela revascularização da polpa (Saghiri *et al.*, 2016). Apesar da regeneração do tecido periodontal, com imagem radiográfica saudável (com regressão de lesão) e dente assintomático, alguns casos não apresentam resposta do dente aos testes de vitalidade pulpar (frio e elétrico) (Paryani e Kim, 2013).

O maior desafio da bioengenharia é a reconstrução histológica e funcional da polpa e dentina adultas. Considerando o potencial das células estaminais, o seu uso torna-se interessante no dente adulto, por conter células mais diferenciadas, com baixa produção de matriz extracelular, viabilidade e plasticidade (Stolzing *et al.*, 2008). As células estaminais,

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

classificadas quanto ao seu potencial de diferenciação em multipotentes (CEM) e pluripotentes (CEP), fatores de crescimento e *scaffolds*, assim como a combinação de todos esses componentes, representam estratégias consideradas eficientes para restauração da estrutura e função tecidual (Discher, Mooney e Zandstra, 2009; Kwon *et al.*, 2018). Mais ainda, é indispensável que a célula encontre um nicho mecânico e bioquímico que favoreça a proliferação e diferenciação celular (Kitamura *et al.*, 2012).

A indução da reparação tecidual requer recapitulação espacial e temporal do microambiente (matriz extracelular), interações intercelulares e necessidade de sinais bioativos - tais como fatores de crescimento e citocinas (Kitamura *et al.*, 2012). Os fatores de crescimento são liberados por células vizinhas saudáveis e têm papel: i) quimioatrativo (direcionando migração celular), ii) mitogénico (estimulando a divisão celular), iii) morfogénico (induzindo a diferenciação), iv) apoptótico (iniciando morte celular programada) e v) metabólico (modulando metabolismo) (Zhao *et al.*, 2015; Duncan, Kobayashi e Shimizu, 2018).

Para a regeneração do complexo dentina-polpa, as células estaminais mesenquimais (CEM) têm sido as mais utilizadas por produzirem citocinas importantes para o “*homing*”, proliferação e diferenciação de outras populações celulares (Charbord, 2010). Entre as CEM, já isoladas, mais utilizadas para estudos de regeneração tecidual dentária estão: as células estaminais de polpa de dente (DPSCs), de ligamento periodontal (PDLSCs), de papila apical (SCAPs), de dentes decíduos esfoliados (SHEDs), do folículo dentário (DFSCs), e do epitélio dentário (DESCs) (Bakhtiar *et al.*, 2018; Hu, Liu e Wang, 2018).

Contudo, apesar de muito promissoras, as CEMs apresentam problemas quanto à sua utilização, nomeadamente: i) o aparecimento de células tetraplóides após o transplante e geração de anomalias cromossômicas após longos períodos em cultura (Spees *et al.*, 2003; Bobis, Jarocho e Majka, 2006; Jeong *et al.*, 2011), ii) acessibilidade restrita e quantidade insuficiente (Yin *et al.*, 2017). Além disso, parecem favorecer o aparecimento de tumores em transplantes (Jeong *et al.*, 2011) possivelmente associados com a sua capacidade imunossupressora, favorecendo assim o aparecimento de infecções virais que podem ser oncogénicas (Bobis, Jarocho e Majka, 2006). Por isso, a procura de fontes alternativas de CEMs levou ao uso de células estaminais pluripotentes (CEP), capazes de gerar populações de CEM para regeneração pulpar.

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

Os principais representantes das CEP são as células estaminais embrionárias (CEE) e de pluripotência induzidas (iPS). Para se definir as CEP, pelo menos 2 propriedades são consideradas: a) capacidade ilimitada de auto-renovação e b) capacidade de diferenciação em mais de um tipo celular *in vitro* ou *in vivo*, dando origem a células dos 3 folhetos embrionários. Estas propriedades distinguem-nas das CEM, com capacidade limitada de auto-renovação (Li *et al.*, 2014; Garreta *et al.*, 2018). O uso das iPS é crescente em medicina dentária pela sua alta capacidade proliferativa, por manter as características genéticas dos pacientes doadores das células somáticas e por não apresentarem as limitações éticas e religiosas relacionadas ao uso das CEE, podendo, inclusive, ser geradas a partir de tecidos orais descartáveis. Isto reflete a possibilidade de uma medicina dentária personalizada capaz de projetar ferramentas de diagnóstico por medida (Malhotra, 2016). Para este propósito, iPS já foram derivadas de SCAP, DPSCs, SHED (Tamaoki *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010), células estaminais dos 3º molares (Oda *et al.*, 2010), fibroblastos da mucosa bucal (Miyoshi *et al.*, 2010) e fibroblastos do ligamento gengival e periodontal (Wada *et al.*, 2011).

Face à complexidade e inovação do tema, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre a utilização de células estaminais na reparação dos danos teciduais com foco no potencial terapêutico das células de pluripotência induzidas como protocolo alternativo para o futuro da endodontia.

1.1. Metodologia

Para este trabalho de revisão, a pesquisa bibliográfica de artigos publicados em revistas científicas indexadas foi realizada usando os motores de busca PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>). Para tal, as seguintes combinações de palavras-passe foram utilizadas: “endodontic treatment teeth”, “britter”, “root fracture”, “pulp regeneration”, “adult teeth”, “dentistry”, “stem cell” and “induced pluripotent stem cell”. O critério de inclusão foi artigos publicados a partir de 2014, de modo a focar os procedimentos mais atuais da técnica de regeneração dentária. Artigos fora deste espaço temporal foram também considerados sempre que relevantes para o estudo.

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

II. Desenvolvimento

2.1. Complexo dentina-polpa

A polpa dentária é um tecido conjuntivo laxo, localizado no interior do dente, altamente vascularizado, e com capacidade de regeneração após lesão, que tem um importante papel na formação, nutrição e defesa do dente (Huang, 2009). A polpa é formada por fibras, colagénio, mucoproteínas, glicoproteínas, mucopolissacarídeos, vasos, nervos, água e sais minerais, além de diferentes tipos celulares (Pashley, Walton e Slavkin, 2002). Histologicamente, apresenta duas regiões bem definidas - central e periférica, e pode ser dividida em 4 partes: i) camada onde os odontoblastos se localizam na periferia da polpa, ii) camada acelular de Weil, iii) camada rica em diferentes tipos celulares e iv) centro da polpa: região rica em vasos sanguíneos e nervos.

Entre as células da polpa, os fibroblastos são as mais numerosas e fazem parte da camada mais rica em células, sendo responsáveis pela síntese e secreção de colagénio e proteínas da matriz extracelular (Estrela *et al.*, 2011). Já células de defesa (linfócitos, plasmócitos e macrófagos) são geralmente recrutadas da corrente sanguínea no momento em que aparecem lesões e/ou agentes estranhos ao conjuntivo pulpar. Nesta situações, os linfócitos T são as células mais frequentemente encontradas e situam-se próximo dos vasos sanguíneos, participando da imunidade celular (Pashley, Walton e Slavkin, 2002).

Após a lesão do complexo dentina-polpa, as populações de células estaminais mesenquimais presentes na polpa são capazes de se diferenciar em odontoblastos (Bobis, Jarocho e Majka, 2006; Bonfield *et al.*, 2010). Os odontoblastos são células altamente polarizadas capazes de gerar e secretar glicoproteínas, e que surgem a partir do mesênquima periférico da papila dentária durante o desenvolvimento do dente. As glicoproteínas formarão uma matriz de pré-dentina que será mineralizada pelos próprios odontoblastos, conferindo a estas células uma característica ímpar (Gartner *et al.*, 1979; Pashley, Walton e Slavkin, 2002).

A dentina, por sua vez, é um tecido altamente mineralizado, que forma a coroa e a raiz do dente. É composta por uma matriz mineral tubular, constituída especialmente por cristais de hidroxiapatite e fibrilas de colagénio, hidratada por fluído intra e peritubular. Essa estrutura tubular mineralizada, associada a capacidade de dissipação hidráulica de forças do fluído dentinário, do ponto de vista mecânico, dá estabilidade à dentina e confere ao dente força e resistência a impactos oclusais (Kahler, Swain e Moule, 2003). As moléculas da matriz da

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

dentina incluem fatores de crescimento, proteínas não colagênicas e glicosaminoglicanos (Han *et al.*, 2019). As proteínas e seu comportamento viscoelástico são considerados responsáveis pela resistência do dente. Sendo assim, quando danificadas ou desnaturadas, comprometem a resistência do dente (Arola *et al.*, 2017).

Histologicamente, a dentina encontra-se por fora da polpa dentária, estando intimamente ligadas. Funcionalmente, as células da polpa dentária podem regenerar a dentina, fornecendo-lhe oxigênio, nutrição e inervação, enquanto a dentina, que é dura, protege o tecido pulpar, que é mole. Juntos, polpa e dentina mantêm a integridade da forma e função do dente. Qualquer reação fisiológica ou patológica que ocorra numa delas, como trauma, cáries e preparação da cavidade, afetará a outra. A íntima relação entre os tecidos pulpar e dentinário permite denominá-los de complexo dentina-polpa (Estrela *et al.*, 2011).

2.2. Tratamento endodôntico

Por ano, só nos EUA, são realizados 22,3 milhões de procedimentos endodônticos (AAE - American Association of Endodontists, 2017, October 23), sendo a maioria dos pacientes endodônticos adultos com dentes maduros bem desenvolvidos. De modo geral, o tratamento endodôntico convencional consiste na desinfecção dos canais, preparação dos canais com ligeiro desgaste das paredes dentinárias, remoção de bactérias e preenchimento do canal radicular com materiais inertes. No entanto, até hoje, os tratamentos endodônticos regenerativos foram aplicados principalmente a dentes permanentes imaturos.

O início da endodontia regenerativa ocorreu em 1952 quando foi utilizado, pela primeira vez, hidróxido de cálcio para recuperar a polpa dentária (Gong *et al.*, 2016). A técnica conhecida como apicificação, indicada principalmente no tratamento de dentes imaturos necróticos, pode promover o encerramento apical, mas não continuar a formação radicular, além de requerer múltiplas visitas ao médico dentista. Devido a estes fatores, a procura de novas técnicas abriu portas para o uso de protocolos mais modernos que resultassem na regeneração tecidual parcial ou integral da polpa dentária (Gong *et al.*, 2016).

Neste sentido, surge a bioengenharia com o objetivo de reparar ou substituir tecidos lesados ou degenerados funcionalmente e/ou estruturalmente. As principais abordagens para tratamento do complexo dentina-polpa usam células recém isoladas injetadas diretamente no local da lesão, podendo ou não estar associadas a moldes, ou implantes tipo tecido formados a

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

partir da combinação de células previamente cultivadas associadas a *scaffolds* (Malhotra e Mala, 2012).

2.3. Regeneração do complexo dentina-polpa

O termo endodontia regenerativa deve incluir a revitalização de dentes permanentes imaturos necróticos e também dentes permanentes maduros (He *et al.*, 2017). Nos dentes imaturos, isso permitiria o desenvolvimento fisiológico normal continuado do dente. Nesse caso, a polpa tem a capacidade de promover a formação de dentina coronária e radicular, que aumenta a espessura e o comprimento das raízes (para prevenir a fratura). Quando vital, a polpa tem a resposta imune que possibilita reagir a uma irritação bacteriana causada por cárie ou microinfiltração de restaurações (Fouad e Verma, 2014). Além disso, é capaz de reparar defeitos de cárie e fraturas (através da dentina terciária), fornecer respostas vasculares e sensoriais normais, e promover a função normal. Portanto, a reparação pulpar é o tratamento ideal para dentes imaturos, com ou sem infecção (Fouad e Verma, 2014).

Se na reparação o que se forma é um tecido diferente do original, na regeneração o que se procura é uma real restauração do tecido original, tanto em termos biológicos como funcionais. (Kim *et al.*, 2018). De acordo com Arslan *et al.* (2019), o principal objetivo do REP é eliminar os sintomas e promover a saúde óssea, aumentar a espessura da parede da raiz e/ou comprimento da raiz e obter uma resposta positiva ao teste de vitalidade. A cicatrização óssea é definida pela ausência de sinais e sintomas clínicos, e um exame radiográfico normal - sem imagem radiolúcida periapical (Saoud *et al.*, 2016).

Para a AAE (2018), o grau de sucesso dos Procedimentos Endodônticos Regenerativos é medido pelos objetivos primários, secundários e terciários atingidos. O objetivo primário consiste na ausência de sinais e sintomas e na evidência de recuperação óssea. Já o secundário foca-se no aumento da espessura da parede radicular e/ou aumento do comprimento da raiz (desejável, mas talvez não necessário) enquanto o terciário procura resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar (o que poderia indicar um tecido pulpar mais organizado).

2.4. Bioengenharia Tecidual e Células Estaminais

A bioengenharia tecidual, área emergente da biotecnologia médica, surge com o intuito de desenvolver novas abordagens terapêuticas, e cada vez mais tem sido facilitada pelo uso de diversas técnicas de cultura celular e tecidual (Almouemen, Kelly e O'Leary, 2019). Pode ser

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

classificada como medicina regenerativa uma vez que tem como objetivo reparar ou substituir tecidos lesados ou degenerados, funcional e estruturalmente. Na endodontia regenerativa não é diferente, e cada vez mais se aplica o conceito da tríade de engenharia de tecidos: células estaminais, estrutura biomimética (*scaffold*) e fatores de crescimento bioativos aplicados no espaço do canal com objetivo de regenerar o tecido pulpar danificado por infecção, trauma ou anomalias de desenvolvimento (Duarte Campos *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2019).

Para ser usado na reparação tecidual, o material dos *scaffolds* precisa ter biocompatibilidade, porosidade interconectada, condutividade para fixação, capacidade de promover a proliferação e diferenciação de células comprometidas, capacidade de incorporar fatores de indução, propriedades mecânicas apropriadas e biodegradabilidade (Almouemen, Kelly e O’Leary, 2019). O sucesso da bioengenharia está associado à similaridade de estrutura e composição entre o dente real e a estrutura dentária desenvolvida. Recentemente, a bioimpressão 3D apresentou-se como uma ferramenta com a capacidade de produzir construções celulares usando múltiplos tipos celulares, biomoléculas e biomateriais (Han *et al.*, 2019). Técnicas mais avançadas têm injetado, dentro de raízes dentárias tratadas, células semelhantes a odontoblastos ressuspendidas em *bioink* de hidrogéis para impressão 3D. Duarte Campos *et al.* (2019) mostraram pela primeira vez e com sucesso, evidências de formação do tubo vascular a partir de uma bioimpressão portátil de dentes, com potencial para o tratamento *in situ* de canais radiculares – manutenção da função biológica. Entretanto, o desafio ainda é provar a viabilidade deste processo *in vivo*.

A ideia do uso de células para reposição tecidual veio de uma das abordagens terapêuticas mais antigas e amplamente usadas - a transfusão de células sanguíneas. Células vivas autólogas (vindas do próprio paciente) e alogênicas (vindas de um doador compatível com o receptor) já mostraram seu potencial como agentes terapêuticos para o fornecimento das próprias células e produtos por elas secretados (Haque, Kasim e Rahman, 2015; Kusuma *et al.*, 2017). Os diferentes tipos celulares utilizados são classificados quanto à sua capacidade de se dividirem e produzirem células diferenciadas, em: i) Totipotentes: originam todas as células do indivíduo adulto inclusive tecidos dos anexos embrionários; ii) Pluripotentes: originam todas as células do indivíduo adulto, exceto os anexos embrionários e iii) Multipotentes: originam fenótipos dos tecidos de que as células foram isoladas (Kalra e Tomar, 2014).

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

Células Estaminais Mesenquimais (CEM)

As CEM foram identificadas inicialmente em 1976 por Alexander Friedenstein a partir de células mononucleares da medula óssea (MO) (Bobis, Jarocha e Majka, 2006). Inicialmente foram chamadas de células formadoras de colônias de fibroblasto (CFU-F) e mais recentemente de Células Estaminais Mesenquimais. São definidas pela sua capacidade de auto-renovação e habilidade de se diferenciarem em células mesenquimais distintas, como osso, cartilagem, gordura, tendão e músculo (Bobis, Jarocha e Majka, 2006; Bonfield *et al.*, 2010).

As CEM são facilmente isoladas de aspirados da MO obtidos da crista ilíaca superior da tíbia, fêmur e coluna vertebral (lombar e torácica). Em cultura, as CEM aderem ao plástico onde ocorre a formação de colônias fusiformes (similar a uma cultura 2D de fibroblasto), as células cuboides (achatadas) (Samsonraj *et al.*, 2017). Mais recentemente, houve a descoberta de células com $\sim 7\mu\text{m}$ de diâmetro, com alta razão citoplasma/núcleo, autorrenovação mais rápida e maior capacidade de diferenciação (Bobis, Jarocha e Majka, 2006). A cultura de CEM dá origem a uma população bastante heterogênea (com osteoblastos e/ou progenitores de osso, fibroblastos, células endoteliais, reticulares, etc.), que expressa um amplo espectro de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de matriz extracelular envolvidas diretamente na manutenção do ambiente estromal (Samsonraj *et al.*, 2017; Mushahary *et al.*, 2018). As moléculas produzidas e secretadas pelas CEM têm papéis importantes para o “*homing*”, proliferação e diferenciação de outras células estaminais. Além disso, há capacidade migratória das CEM para sítios que sofreram lesão de modo a auxiliar no processo de regeneração. Esta capacidade diminui após longos períodos em cultura (Fibbe e Noort, 2003; Oh, 2010).

As propriedades anti-inflamatória e imunossupressora destas células têm sido amplamente estudadas (Charbord, 2010; Hernández-Monjaraz *et al.*, 2018). Estas células apresentam vários marcadores imunofenotípicos, presentes também noutros tipos celulares (CD105, CD73 e CD90), mas não expressam por exemplo CD45, CD34, CD14, CD11b ou CD19 (Dominici *et al.*, 2006). Mais ainda, parecem ter reduzida expressão de MHC II e de recetores co-estimuladores na superfície. Sendo assim, não apresentam atividade de células apresentadoras de antígeno (Wang, Yuan e Xie, 2018).

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

Células Estaminais Pluripotentes (CEP)

Células pluripotentes caracterizam-se pela capacidade ilimitada de auto-renovação e de diferenciação em células dos 3 folhetos embrionários (Draper e Fox, 2003). São células que despertam interesse de grande parte da comunidade científica pela possibilidade de utilização em terapias celulares, tecnologias relacionadas a *screening* de fármacos, diagnósticos *in vitro* assim como estudos da biologia do desenvolvimento (McDevitt e Palecek, 2008; Bayart e Cohen-Haguener, 2013).

As primeiras CEP foram isoladas em 1981, a partir de carcinoma embrionário de murinos (mES) (Martin e Evans, 1975; Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estes carcinomas são tumores das gónadas que, além de células indiferenciadas, apresentam uma mistura de tipos celulares dos 3 folhetos embrionários (Friel, 2005). Com o intuito de se gerar células pluripotentes não tumorais, foram então isoladas da massa celular interna (ICM) de blastocistos, 3 dias após a formação do zigoto (Moon *et al.*, 2006). De forma semelhante, estudos com células embrionárias humanas tiveram início com células de carcinoma (Fogh e Trempe, 1975), e em 1998, foram obtidas células estaminais embrionárias provenientes de um blastocisto humano de 5-7 dias pós-fertilização (Thomson, 1998). Estas células são caracterizadas por altos níveis de atividade da enzima telomerase e pela expressão de antigénios de superfície característicos, incluindo SSEA-3, SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen-3,4*), TRA-1-60, TRA-1-81 (proteoglicanos de keratan sulfato) e fosfatase alcalina (Mountford, 2008) além de fatores de transcrição relacionados com a pluripotencialidade tais como Oct-4, SOX2, NANOG, entre outros (Bodnar *et al.*, 2004).

Recentemente, CEPs foram obtidas através da reprogramação celular, sem a necessidade de utilização de embriões (Meissner, Wernig e Jaenisch, 2007; Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Lowry *et al.*, 2008). A técnica mais utilizada e eficiente de reprogramação consiste na transfeção de células adultas com vírus geneticamente modificados carregando os genes específicos de pluripotencialidade – *Oct4*, *SOX2*, *Klf4* e *c-Myc* (Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Assim como na clonagem terapêutica – onde há reprogramação através de transferência nuclear – células reprogramadas são geneticamente idênticas ao dador, reduzindo os riscos de incompatibilidade e rejeição no caso de serem eventualmente transplantadas (Lowry *et al.*, 2008).

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

As células iPS (do inglês, *induced pluripotent stem cells*) possuem grande potencial terapêutico por serem capazes de gerar populações de células com fenótipos específicos, dificilmente obtidos por outras fontes, além de auxiliar na melhor compreensão de patologias específicas e de difícil etiologia (Zeng *et al.*, 2004; D'Amour *et al.*, 2006; Trounson, 2006; Mountford, 2008). No campo da endodontia, o uso das iPS ainda é recente, mas bastante promissor. Enquanto a disponibilidade de células estaminais mesenquimais de tecido dentário é restrita, iPS são fonte ilimitada de células estaminais e podem inclusive ser geradas a partir de material descartado após procedimento odontológico (Malhotra, 2016). Assim como as células estaminais embrionárias, as iPS podem facilmente ser escalonadas para posterior uso na medicina regenerativa (Fernandes *et al.*, 2009).

Alguns autores têm-se focado na derivação das iPS provenientes de tecidos dentários para que a diferenciação específica seja mais fácil e eficiente (Li, Yin e Luan, 2018). Mais ainda, vários grupos de investigação têm usado as próprias células estaminais mesenquimais do tecido dentário para originar as iPS, tais como: células estaminais de polpa de dente (DPSCs), de papila apical (SCAPs) e de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) (Malhotra, 2016).

III. Discussão e Conclusões

A odontologia regenerativa representa uma abordagem terapêutica multidisciplinar atraente que contrasta as técnicas tradicionais de restauração e cirurgia e os benefícios dos recentes avanços nas áreas da bioengenharia de materiais, biologia de células estaminais, molecular e proteômica (Moussa e Aparicio, 2018). São por definição procedimentos baseados na biologia que visam substituir uma estrutura dentária danificada (incluindo estruturas dentinárias e radiculares) e o complexo dentina-polpa (Estrela *et al.*, 2011). Tradicionalmente, dentes permanentes maduros com polpas necróticas infetadas, ou não, são tratados com terapia de canal radicular não cirúrgica: desbridamento químico-mecânico, mediação intracanal e preenchimento radicular com material biocompatível. Tanto a terapia de canal radicular não-cirúrgica quanto o REP visam a ausência de sinais e sintomas, com resolução da lesão apical (Saoud *et al.*, 2016), no entanto, a diferença é que na REP se faz o preenchimento do canal com tecido vital.

A AAE (2018) define o sucesso do tratamento endodôntico baseado em objetivos primários (essencial), secundários (desejável) e terciários. Tong *et al.* (2017) e Torabinejad *et al.* (2017)

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

demonstraram que o objetivo primário do REP pode ser alcançado com segurança com 91-94% de cicatrização periapical, caracterizando tratamentos bem-sucedidos e eficazes na eliminação da dor e no controle de infecções. Em relação aos objetivos secundários, os autores relacionaram um desenvolvimento radicular aumentado (80%) e encerramento apical (76%) (Tong *et al.*, 2017; Torabinejad *et al.*, 2017), enquanto outros estudos (Linsuwanont, Sinpitaksakul e Lertsakchai, 2017; Silujjai e Linsuwanont, 2017) relataram que a maturação da raiz não foi alcançada de forma fiável.

Além disso, a considerar outros fatores relacionados a etapas comuns para desinfecção dos dentes a serem tratados com endodontia convencional ou REP, um estudo evidenciou que o fato dos dentes serem desvitalizados, os deixavam mais suscetíveis a reinfeções e fraturas devido às forças mastigatórias (He *et al.*, 2017), indicando taxa de insucesso endodôntico entre 11,4 a 16,9% após acompanhamento de 0,3 a 20 anos. A perda cumulativa de estrutura dentária, por cáries, trauma e procedimentos restauradores e endodônticos, aliados a perda de vitalidade ou limiar de dor elevado, permitem maiores cargas nos dentes tratados endodonticamente, e levam a maior suscetibilidade a fraturas (Sedgley e Messer, 1992; Kahler, Swain e Moule, 2003).

O trabalho de Sedgley e Messer (1992) comparou propriedades biomecânicas (resistência ao cisalhamento, resistência a fratura, dureza e carga de fratura) de 23 dentes tratados endodonticamente e seus pares vitais contralaterais (Sedgley e Messer, 1992). Após 1 ano do fim do tratamento, apenas a diferença de dureza foi estatisticamente significativa, em que os dentes controlo se mostraram 3,5% mais duros do que os dentes com o tratamento endodôntico contralateral. Um fator que parece ser importante para a resistência a fratura após tratamento endodôntico é o teor de água. Kahler, Swain e Moule (2003) mostraram que o dente desidratado fratura com aplicação de uma força até 4-5 vezes menor do que o dente hidratado, e que a re-hidratação do dente praticamente restaura sua resistência a fratura.

Se a instrumentação dos canais causa ou não microfraturas na dentina, e como isso afeta a resistência do dente é um assunto que ainda precisa ser mais estudado (Arola *et al.*, 2017). Outra característica discutida da terapia endodôntica convencional que difere da REP é a frequência com que ocorre alteração da coloração da coroa do dente, devido principalmente à cor dos materiais de preenchimento endodôntico usados (Goto, Ceyhan e Chu, 2009).

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

O controle da infecção é a chave para o sucesso da terapia endodôntica regenerativa. E o uso de antibioterapia como auxiliar do tratamento torna-se uma escolha óbvia devido à sua seletividade e toxicidade relativamente reduzidas e ao seu efeito residual durante o crescimento tecidual (Fouad e Verma, 2014). Contudo, há variação de sensibilidade do organismo aos diferentes antibióticos e a capacidade dos microorganismos se tornarem resistentes, além das possibilidades de efeitos antagonistas entre os medicamentos utilizados, que podem ser causadores dessa resistência (Neelamurthy *et al.*, 2018). Se por um lado os antibióticos são efetivos contra as bactérias, quando usados em concentração superior a 1mg/mL, como presente nas pastas antibióticas, podem ser prejudiciais para a sobrevivência das células estaminais (Paryani e Kim, 2013).

A atuação dos irrigantes e curativos, com objetivo de desinfecção do canal devem ser considerados nos protocolos de desinfecção. Para a Sociedade Europeia de Endodontia (ESE), a concentração do hipoclorito de sódio (NaOCl) pode variar de 1,5 a 3%, e deve promover desinfecção suficiente com preservação dos tecidos. Para além do uso de NaOCl e EDTA, comumente usados nos tratamentos para desinfecção dos canais, preconiza-se a irrigação com soro fisiológico estéril a fim de minimizar os efeitos citotóxicos do NaOCl sobre tecidos vivos (Galler *et al.*, 2016). Quando usados em concentrações de 1,5% para o NaOCl e 17% para o EDTA, mostraram-se seguros (Paryani e Kim, 2013; Fouad e Verma, 2014), uma vez que o EDTA parece: 1) reverter parcialmente os efeitos deletérios do NaOCl, 2) promover sobrevivência das células estaminais, 3) promover libertação dos fatores de crescimento da matriz dentinária (por desmineralização e exposição da matriz dentinária), 4) estimular a diferenciação odontogénica das células estaminais e 5) a angiogénese. Apesar disso, quando usado *in vivo*, o NaOCl 1,5% parece não ser eficaz na eliminação das bactérias em biofilmes do sistema de canais radiculares infetados (Paryani e Kim, 2013; Fouad, 2017; Kim *et al.*, 2018).

NaOCl e clorexidina estão entre os antimicrobianos mais eficazes para desinfecção do canal radicular, contudo podem ser tóxicos para as células estaminais da papila apical, além de anularem a bioatividade dos fatores de crescimento importantes para a REP (Paryani e Kim, 2013; Fouad e Verma, 2014). Mesmo em baixas concentrações, o NaOCl pode provocar danos nas proteínas, incluindo o fator de crescimento da dentina (Han *et al.*, 2019). A forma como é realizada a irrigação também pode influenciar a resposta biológica, e a irrigação por pressão negativa, ultrassónica passiva ou a ativação multissónica podem ser consideradas

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

alternativas para melhorar a desinfecção efetiva dos canais radiculares (Fouad, 2017; Kim *et al.*, 2018).

Diferente do tratamento não-cirúrgico, a REP resulta histologicamente na formação de um tecido que possui estrutura semelhante a osso, cemento e ligamento periodontal e não num tecido pulpar verdadeiro. É considerado, em si, um processo reparativo e não regenerativo. A resposta positiva a um teste pulpar é um dos requisitos para a regeneração, que indica tecidos vitais vascularizados e inervados, portanto, a resposta positiva após REP não irá indicar necessariamente a regeneração do tecido pulpar (Kim *et al.*, 2018; Arslan *et al.*, 2019). E ainda não existem terapias regenerativas amplamente aceitas para polpa dentária infetada de dentes maduros em pacientes adultos (He *et al.*, 2017). Alguns autores defendem que a reparação não é uma cicatrização ideal de feridas - porque o tecido danificado perde a sua função fisiológica, apesar disso, no caso do REP, a função do dente é mantida (Saoud *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2019).

Uma análise de dados do protocolo clínico do REP revelou que há uma variedade de protocolos entre todos os estudos (Kontakiotis *et al.*, 2015), envolvendo presença ou ausência de coágulo sanguíneo intracanal, concentrações de solução irrigante ou tipo de medicação intracanal utilizada. Mesmo assim, os diferentes protocolos de tratamento foram capazes de alcançar a eliminação de sintomas e sinais clínicos, além da periodontite apical, indicando sucesso para promover o espessamento das paredes do canal e/ou o desenvolvimento continuado da raiz (Kontakiotis *et al.*, 2015; Diogenes *et al.*, 2016) e resposta positiva aos testes de vitalidade (Arslan *et al.*, 2019). Poucos estudos prospectivos relatam resultados após 18 meses (Tong *et al.*, 2017) de modo que a retenção a longo prazo de dentes tratados com REP ainda está por determinar (Han *et al.*, 2019). Pode ainda existir viés de publicação, sendo provável que os casos de sucesso sejam mais frequentemente relatados do que os casos fracassados, resultando numa superestimativa do sucesso dos dentes tratados com REP (Conde *et al.*, 2017).

A regeneração dentária de polpa e dentina representa um desafio devido à sua complexidade e o uso de células estaminais exógenas pode ser uma alternativa interessante para o tratamento endodôntico. Grande parte dos estudos foca-se no uso de células estaminais adultas para regeneração do tecido periodontal, osso alveolar e craniofacial, complexo dentina-polpa, tecido mucoso e músculo da língua (Bakhtiar *et al.*, 2018). Entre as mais utilizadas destacam-

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

se as provenientes de células estaminais de polpa do dente (DPSC), do ligamento periodontal (PDLSC), da papila apical (SCAP), de dentes decíduos esfoliados (SHED), do folículo dentário e do epitélio dentário (Bakhtiar *et al.*, 2018; Hu, Liu and Wang, 2018).

No REP o que se procura, ao provocar o sangramento periapical para o espaço intracanal, é a formação de um coágulo sanguíneo, libertação de fatores de crescimento e atração de células estaminais mesenquimais. No entanto, no dente maduro, já não existe papila apical. Então, o tecido formado vai ter capacidade de defesa imunológica, mas não poderá produzir dentina. Além disso, o risco de formação de tecido duro no tecido desenvolvido no interior da polpa é um ponto crítico, pois mesmo que esse tecido não seja neoplásico ou infetado, pode ainda assim acabar por causar necrose do tecido pulpar, por compressão.

As DPSCs foram as primeiras a serem usadas sendo responsáveis por cerca de 52% dos trabalhos realizados para regeneração do complexo dentina-polpa (Gronthos *et al.*, 2000; Bakhtiar *et al.*, 2018). Vários trabalhos já mostraram o potencial migratório e de diferenciação em células tipo osteoblastos, além da capacidade de mineralização que ajuda estruturalmente na formação da dentina (Almushayt *et al.*, 2006; He *et al.*, 2008). Também foi observada a formação de novos vasos após injeção de DPSCs, demonstrando o papel importante dessas células na regeneração do complexo dentina-polpa (Estrela *et al.*, 2011).

As PDLSC apresentam características bastante similares às células estaminais de medula óssea e às DPSCs. São mais usadas para regeneração dos ligamentos periodontais e quando em combinação com as DPSCs e hidroxiapatite, apresentam melhores resultados na geração de bio-raízes (Gao *et al.*, 2016). Além disso, já foi demonstrado *in vivo* o seu potencial em gerar cimento e osso (Trubiani *et al.*, 2008).

As SCAPs são provenientes do dente em desenvolvimento e são as que retêm maior estado indiferenciado, tendo inclusive maior atividade da telomerase (Huang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). São consideradas fontes primárias de geração de células tipo odontoblastos enquanto DPSCs são relatadas mais no sentido de reposição das células perdidas (Gong *et al.*, 2016). Quando comparadas com as DPSCs, apresentam maior taxa de crescimento *in vitro* (Sonoyama *et al.*, 2008). As SHEDs são as células estaminais obtidas de maneira não invasiva e quando comparadas às DPSCs, também apresentam maior proliferação e capacidade de gerar tecido ósseo (Wang *et al.*, 2012). *In vivo*, o transplante destas células foi capaz de

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

formar uma polpa dentária histológica e morfológicamente similar a uma natural (Gong *et al.*, 2016). Além da formação de células tipo odontoblastos, as SHEDs são capazes de se diferenciar em endotélio havendo posteriormente formação de vasos (Kerkis e Caplan, 2012).

Apesar do sucesso da utilização de diferentes fontes de CEM descritas acima, as limitações levaram à procura de outras células estaminais que pudessem regenerar o tecido dentário. Como descrito anteriormente, as CEP, ao contrário das CEM, não sofrem senescência e são fontes ilimitadas de células estaminais capazes de gerar todos os tipos celulares de um organismo adulto. Para além disso, são facilmente escalonadas sendo mais fácil atingir as concentrações celulares requeridas para uso na medicina regenerativa (Fernandes *et al.*, 2009; Otsu *et al.*, 2014).

Na medicina dentária, as células estaminais embrionárias são usadas para regeneração oral e craniofacial, incluindo mucosa, osso alveolar, tecido periodontal e glândula salivar (Kidwai *et al.*, 2014; Otsu *et al.*, 2014; Ozeki *et al.*, 2014). As iPS têm sido consideradas o futuro da terapia endodôntica pois apresentam todas as características das células estaminais embrionárias sem as limitações religiosas e éticas associadas, e menor possibilidade de rejeição pois são geradas a partir de células do próprio paciente (Gong *et al.*, 2016). Como já citado anteriormente, podem ser derivadas de várias células do tecido dentário, como as SCAP, DPSCs, SHED (Tamaoki *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010), células estaminais de 3^{os} molares (Oda *et al.*, 2010), de fibroblastos da mucosa bucal (Miyoshi *et al.*, 2010) e de fibroblastos do ligamento gengival e periodontal (Wada *et al.*, 2011), e são capazes de originar células mesenquimais dentárias, tipo odontoblastos e ameloblastos (Zhang *et al.*, 2010; Otsu *et al.*, 2012, 2014; Wen *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2015; Hamano *et al.*, 2018).

Apesar de complexo, o campo da regeneração dentária progrediu bastante nos últimos anos podendo ser clinicamente viável no futuro. Como parte de uma nova tecnologia, as iPS provenientes dos próprios pacientes representam uma fonte celular única e altamente promissora. Mas ainda existem poucos estudos, e grandes desafios devem ser ultrapassados até que a total regeneração do complexo dentina-polpa possa ser realizada. Entender os mecanismos biológicos envolvidos na diferenciação das células estaminais, correlacionado com os diferentes tecidos e complexidade do órgão dentário, além de cada dente ter uma forma e tamanho específicos para cada paciente, são questões ainda a serem resolvidas.

Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual: uma alternativa para o futuro da endodontia

IV. Bibliografia

- Almouemen, N., Kelly, H. M. e O’Leary, C. (2019). Tissue engineering: understanding the role of biomaterials and biophysical forces on cell functionality through computational and structural biotechnology analytical methods. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 17, pp. 591-598. doi: 10.1016/j.csbj.2019.04.008.
- Almushayt, A. *et al.* (2006). Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Therapy*, 13(7), pp. 611-620. doi: 10.1038/sj.gt.3302687.
- American Association of Endodontics (2018). *AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure*. Available at: <https://www.aae.org/specialty/>.
- Arola, D. D. *et al.* (2017). The tooth: its structure and properties. *Dental Clinics of North America*, 61(4), pp. 651-668. doi: 10.1016/j.cden.2017.05.001.
- Arslan, H. *et al.* (2019). Regenerative endodontic procedures in necrotic mature teeth with periapical radiolucencies: a preliminary randomized clinical study. *Journal of Endodontics*, 45(7), pp. 863-872. doi: 10.1016/j.joen.2019.04.005.
- Bakhtiar, H. *et al.* (2018). The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Progress in Biomaterials*, 7(4), pp. 249-268. doi: 10.1007/s40204-018-0100-7.
- Bayart, E. e Cohen-Haguenaer, O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Current Gene Therapy*, 13(2), pp. 73-92. doi: 10.2174/1566523211313020002.
- Bobis, S., Jarocho, D. e Majka, M. (2006). Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, pp. 215-230.
- Bodnar, M. S. *et al.* (2004) ‘Propagation and maintenance of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, 13(3), pp. 243-253. doi: 10.1089/154732804323099172.
- Bonfield, T. L. *et al.* (2010). Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. *Journal of Inflammation*, 7(1), p. 51. doi: 10.1186/1476-9255-7-51.

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Bucchi, C. *et al.* (2019). A regenerative endodontic approach in mature ferret teeth using rodent preameloblast-conditioned medium. *In Vivo*, 33(4), pp. 1143-1150. doi: 10.21873/invivo.11584.
- Charbord, P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human Gene Therapy*, 21(9), pp. 1045-1056. doi: 10.1089/hum.2010.115.
- Conde, M. C. M. *et al.* (2017). A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation. *International Endodontic Journal*, 50(9), pp. 860-874. doi: 10.1111/iej.12711.
- D'Amour, K. A. *et al.* (2006). Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 24(11), pp. 1392-1401. doi: 10.1038/nbt1259.
- Diogenes, A. *et al.* (2016). Regenerative endodontics. *The Journal of the American Dental Association*, 147(5), pp. 372-380. doi: 10.1016/j.adaj.2016.01.009.
- Discher, D. E., Mooney, D. J. e Zandstra, P. W. (2009). Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. *Science*, 324(5935), pp. 1673-1677. doi: 10.1126/science.1171643.
- Dominici, M. *et al.* (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Draper, J. S. e Fox, V. (2003). Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal. *Archives of Medical Research*, 34(6), pp. 558-564. doi: 10.1016/j.arcmed.2003.08.006.
- Duarte Campos, D. F. *et al.* (2019). Hand-held bioprinting for de novo vascular formation applicable to dental pulp regeneration. *Connective Tissue Research*, pp. 1-11. doi: 10.1080/03008207.2019.1640217.
- Duncan, H. F., Kobayashi, Y. e Shimizu, E. (2018). Growth factors and cell homing in dental tissue regeneration. *Current Oral Health Reports*, 5(4), pp. 276-285. doi: 10.1007/s40496-018-0194-y.
- Estrela, C. *et al.* (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 22(2), pp. 91-98. doi: 10.1590/S0103-64402011000200001.
- Evans, M. J. e Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), pp. 154-156. doi: 10.1038/292154a0.
- Fernandes, A. M. *et al.* (2009). Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 42(6), pp. 515-522. doi: 10.1590/S0100-879X2009000600007.
- Fibbe, W. E. e Noort, W. A. (2003). Mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 996, pp. 235-244. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb03252.x.
- Fogh, J. e Trempe, G. (1975). 'New Human Tumor Cell Lines', in *Human Tumor Cells in Vitro*. Boston, MA: Springer US, pp. 115-159. doi: 10.1007/978-1-4757-1647-4_5.
- Fouad, A. F. (2017). Microbial factors and antimicrobial strategies in dental pulp regeneration. *Journal of endodontics*, 43(9S), pp. S46-S50. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.010.
- Fouad, A. F. e Verma, P. (2014). Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *Journal of Endodontics*, 40(4), pp. S58-S64. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.022.
- Friel, R., Sar, S e Mee, P. (2005). Embryonic stem cells: Understanding their history, cell biology and signalling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(13), pp. 1894-1903, doi: 10.1016/j.addr.2005.08.002.
- Galler, K. M. *et al.* (2016). European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *International Endodontic Journal*, 49(8), pp. 717-723. doi: 10.1111/iej.12629.
- Gao, Z. H. *et al.* (2016). Bio-root and implant-based restoration as a tooth replacement alternative. *Journal of Dental Research*, 95(6), pp. 642-649. doi: 10.1177/0022034516639260.
- Garreta, E. *et al.* (2018). Roadblocks in the path of iPSC to the clinic. *Current Transplantation Reports*, 5(1), pp. 14-18. doi: 10.1007/s40472-018-0177-x.

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Gartner, L. P. *et al.* (1979). A fine-structural analysis of mouse molar odontoblast maturation. *Cells Tissues Organs*, 103(1), pp. 16-33. doi: 10.1159/000144994.
- Gong, T. *et al.* (2016). Current advance and future prospects of tissue engineering approach to dentin/pulp regenerative therapy. *Stem Cells International*, 2016, pp. 1-13. doi: 10.1155/2016/9204574.
- Goto, Y., Ceyhan, J. e Chu, S. J. (2009). Restorations of endodontically treated teeth: new concepts, materials, and aesthetics. *Practical procedures & aesthetic dentistry: PPAD*, 21(2), pp. 81-89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19583165>.
- Gronthos, S. *et al.* (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp. 13625-13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.
- Hamano, S. *et al.* (2018). Extracellular matrix from periodontal ligament cells could induce the differentiation of induced pluripotent stem cells to periodontal ligament stem cell-like cells. *Stem Cells and Development*, 27(2), pp. 100-111. doi: 10.1089/scd.2017.0077.
- Han, J. *et al.* (2019). Bioprinting of three-dimensional dentin–pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of Tissue Engineering*, 10, pp. 204173141984584. doi: 10.1177/2041731419845849.
- Haque, N., Kasim, N. H. A. e Rahman, M. T. (2015). Optimization of pre-transplantation conditions to enhance the efficacy of mesenchymal stem cells. *International Journal of Biological Sciences*, 11(3), pp. 324-334. doi: 10.7150/ijbs.10567.
- He, H. *et al.* (2008). Effects of FGF2 and TGF β 1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology International*, 32(7), pp. 827-834. doi: 10.1016/j.cellbi.2008.03.013.
- He, L., Zhong, J., *et al.* (2017). Regenerative endodontics by cell homing. *Dental Clinics of North America*, 61(1), pp. 143-159. doi: 10.1016/j.cden.2016.08.010.
- He, L., Kim, S. G., *et al.* (2017). Regenerative endodontics for adult patients. *Journal of Endodontics*, 43(9), pp. S57-S64. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.012.
- Hernández-Monjaraz, B. *et al.* (2018). Mesenchymal stem cells of dental origin for inducing tissue regeneration in periodontitis: a mini-review. *International Journal of Molecular*

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Sciences*, 19(4), pp. 944. doi: 10.3390/ijms19040944.
- Hu, L., Liu, Y. e Wang, S. (2018). Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Diseases*, 24(5), pp. 696-705. doi: 10.1111/odi.12703.
- Huang, G. T.-J. *et al.* (2010). Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), pp. 605-615. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0518.
- Huang, G. T. J. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regenerative Medicine*, 4(5), pp. 697-707. doi: 10.2217/rme.09.45.
- Jeong, J.-O. *et al.* (2011). Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circulation Research*, 108(11), pp. 1340-1347. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.239848.
- Kahler, B., Swain, M. V. e Moule, A. (2003). Fracture-toughening mechanisms responsible for differences in work to fracture of hydrated and dehydrated dentine. *Journal of Biomechanics*, 36(2), pp. 229-237. doi: 10.1016/S0021-9290(02)00327-5.
- Kalra, K. e Tomar, P. C. (2014). Stem cell: basics, classification and applications. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), pp. 919-930.
- Kerkis, I. e Caplan, A. I. (2012). Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 18(2), pp. 129-138. doi: 10.1089/ten.teb.2011.0327.
- Kidwai, F. K. *et al.* (2014). Human embryonic stem cell differentiation into odontoblastic lineage: an in vitro study. *International Endodontic Journal*, 47(4), pp. 346-355. doi: 10.1111/iej.12150.
- Kim, S. G. *et al.* (2018). Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International endodontic journal*, 51(12), pp. 1367-1388. doi: 10.1111/iej.12954.
- Kitamura, C. *et al.* (2012). Local regeneration of dentin-pulp complex using controlled release of FGF-2 and naturally derived sponge-like scaffolds. *International Journal of Dentistry*, 2012, pp. 1-8. doi: 10.1155/2012/190561.
- Kontakiotis, E. G. *et al.* (2015). Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *Journal of Endodontics*, 41(2), pp. 146-154. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.003.

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Kusuma, G. D. *et al.* (2017). Effect of the microenvironment on mesenchymal stem cell paracrine signaling: opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem Cells and Development*, 26(9), pp. 617-631. doi: 10.1089/scd.2016.0349.
- Kwon, S. G. *et al.* (2018). Recent advances in stem cell therapeutics and tissue engineering strategies. *Biomaterials Research*, 22(1), pp. 36. doi: 10.1186/s40824-018-0148-4.
- Li, J. *et al.* (2014). Advances in understanding the cell types and approaches used for generating induced pluripotent stem cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 7(1), pp. 50. doi: 10.1186/s13045-014-0050-z.
- Li, J., Yin, X. e Luan, Q. (2018). Comparative study of periodontal differentiation propensity of induced pluripotent stem cells from different tissue origins. *Journal of Periodontology*, 89(10), pp. 1230-1240. doi: 10.1002/JPER.18-0033.
- Linsuwanont, P., Sinpitaksakul, P. e Lertsakchai, T. (2017). Evaluation of root maturation after revitalization in immature permanent teeth with nonvital pulps by cone beam computed tomography and conventional radiographs. *International Endodontic Journal*, 50(9), pp. 836-846. doi: 10.1111/iej.12705.
- Lowry, W. E. *et al.* (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), pp. 2883-2888. doi: 10.1073/pnas.0711983105.
- Malhotra, N. (2016). Induced pluripotent stem (iPS) cells in dentistry: a review. *International Journal of Stem Cells*, 9(2), pp. 176-185. doi: 10.15283/ijsc16029.
- Malhotra, N. e Mala, K. (2012). Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: past, current and future. *Australian Endodontic Journal*, 38(3), pp. 137-148. doi: 10.1111/j.1747-4477.2012.00355.x.
- Mao, J. J. *et al.* (2012). Regenerative Endodontics. *Dental Clinics of North America*, 56(3), pp. 639-649. doi: 10.1016/j.cden.2012.05.005.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12), pp. 7634-7638. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634.
- Martin, G. R. e Evans, M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells:

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72(4), pp. 1441-1445. doi: 10.1073/pnas.72.4.1441.
- McDevitt, T. C. e Palecek, S. P. (2008). Innovation in the culture and derivation of pluripotent human stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(5), pp. 527-533. doi: 10.1016/j.copbio.2008.08.005.
- Meissner, A., Wernig, M. e Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 25(10), pp. 1177-1181. doi: 10.1038/nbt1335.
- Miyoshi, K. *et al.* (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells from oral mucosa. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(3), pp. 345-350. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.03.004.
- Moon, S. Y. *et al.* (2006). Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Molecular Therapy*, 13(1), pp. 5-14. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.09.008.
- Mountford, J. C. (2008). Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine*, 18(1), pp. 1-12. doi: 10.1111/j.1365-3148.2007.00807.x.
- Moussa, D. G. e Aparicio, C. (2018). Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(1), pp. 58-75. doi: 10.1002/term.2769.
- Mushahary, D. *et al.* (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), pp. 19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242.
- Neelamurthy, P. S. *et al.* (2018). Revascularization in immature and mature teeth with necrotic pulp: a clinical study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 19(11), pp. 1393-1399. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30602647>.
- Oda, Y. *et al.* (2010). Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(38), pp. 29270-29278. doi: 10.1074/jbc.M109.055889.
- Oh, I.-H. (2010). Mesenchymal stromal cells: new insight on their identity and potential role

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- in cell therapy. *The Korean Journal of Hematology*, 45(4), pp. 219. doi: 10.5045/kjh.2010.45.4.219.
- Okita, K., Ichisaka, T. e Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), pp. 313-317. doi: 10.1038/nature05934.
- Otsu, K. *et al.* (2012). Differentiation of induced pluripotent stem cells into dental mesenchymal cells. *Stem Cells and Development*, 21(7), pp. 1156-1164. doi: 10.1089/scd.2011.0210.
- Otsu, K. *et al.* (2014). Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Frontiers in Physiology*, 5. doi: 10.3389/fphys.2014.00036.
- Ozeki, N. *et al.* (2014). Cytokines induce MMP-3-regulated proliferation of embryonic stem cell-derived odontoblast-like cells. *Oral Diseases*, 20(5), pp. 505-513. doi: 10.1111/odi.12165.
- Paryani, K. e Kim, S. G. (2013). Regenerative endodontic treatment of permanent teeth after completion of root development: a report of 2 cases. *Journal of Endodontics*, 39(7), pp. 929-934. doi: 10.1016/j.joen.2013.04.029.
- Pashley, D. H., Walton, R. E. e Slavkin, H. C. (2002). Histology and physiology of the dental pulp. in: *Endodontics*. 5th ed. Hamilton, Ont. ; London : B C Decker, p. 974.
- Saghiri, M. A. *et al.* (2016). Effect of biomaterials on angiogenesis during vital pulp therapy. *Dental Materials Journal*, 35(5), pp. 701-709. doi: 10.4012/dmj.2015-332.
- Samsonraj, R. M. *et al.* (2017). Concise review: multifaceted characterization of human mesenchymal stem cells for use in regenerative medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), pp. 2173-2185. doi: 10.1002/sctm.17-0129.
- Saoud, T. M. *et al.* (2016). Treatment of mature permanent teeth with necrotic pulps and apical periodontitis using regenerative endodontic procedures: A case series. *Journal of Endodontics*, 42(1), pp. 57-65. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.015.
- Sedgley, C. M. e Messer, H. H. (1992). Are endodontically treated teeth more brittle?. *Journal of Endodontics*, 18(7), pp. 332-335. doi: 10.1016/S0099-2399(06)80483-8.
- Seki, D. *et al.* (2015). Differentiation of odontoblast-like cells from mouse induced pluripotent stem cells by Pax9 and Bmp4 transfection. *Stem Cells Translational Medicine*,

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

4(9), pp. 993-997. doi: 10.5966/sctm.2014-0292.

Silujjai, J. e Linsuwanont, P. (2017). Treatment outcomes of apexification or revascularization in nonvital immature permanent teeth: A retrospective study. *Journal of Endodontics*, 43(2), pp. 238-245. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.030.

Sonoyama, W. *et al.* (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of Endodontics*, 34(2), pp. 166-171. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.021.

Spees, J. L. *et al.* (2003). Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), pp. 2397-2402. doi: 10.1073/pnas.0437997100.

Stolzing, A. *et al.* (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), pp. 163-173. doi: 10.1016/j.mad.2007.12.002.

Takahashi, K. *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), pp. 861-872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp. 663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tamaoki, N. *et al.* (2010). Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *Journal of Dental Research*, 89(8), pp. 773-778. doi: 10.1177/0022034510366846.

Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), pp. 1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.

Tong, H. J. *et al.* (2017). Regenerative endodontic therapy in the management of nonvital immature permanent teeth: a systematic review—outcome evaluation and meta-analysis. *Journal of Endodontics*, 43(9), pp. 1453-1464. doi: 10.1016/j.joen.2017.04.018.

Torabinejad, M. *et al.* (2017). Regenerative endodontic treatment or mineral trioxide aggregate apical plug in teeth with necrotic pulps and open apices: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endodontics*, 43(11), pp. 1806-1820. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.029.

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine Reviews*, 27(2), pp. 208-219. doi: 10.1210/er.2005-0016.
- Trubiani, O. *et al.* (2008). Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: a morphological report. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A(4), pp. 986-993. doi: 10.1002/jbm.a.31837.
- Wada, N. *et al.* (2011). Induced pluripotent stem cell lines derived from human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 46(4), pp. 438-447. doi: 10.1111/j.1600-0765.2011.01358.x.
- Wang, M., Yuan, Q. e Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: properties and clinical application. *Stem Cells International*, 2018, pp. 1-12. doi: 10.1155/2018/3057624.
- Wang, W. *et al.* (2016). Dentin regeneration by stem cells of apical papilla on injectable nanofibrous microspheres and stimulated by controlled BMP-2 release. *Acta Biomaterialia*, 36, pp. 63-72. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.015.
- Wang, X. *et al.* (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of Oral Biology*, 57(9), pp. 1231-1240. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.02.014.
- Wen, Y. *et al.* (2012). Application of induced pluripotent stem cells in generation of a tissue-engineered tooth-like structure. *Tissue Engineering Part A*, 18(15-16), pp. 1677-1685. doi: 10.1089/ten.tea.2011.0220.
- Wernig, M. *et al.* (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448(7151), pp. 318-324. doi: 10.1038/nature05944.
- Yan, X. *et al.* (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells and Development*, 19(4), pp. 469-480. doi: 10.1089/scd.2009.0314.
- Yin, X. *et al.* (2016). Generation and periodontal differentiation of human gingival fibroblasts-derived integration-free induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(3), pp. 726-732. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.012.

**Células Estaminais de Pluripotência Induzida na regeneração tecidual:
uma alternativa para o futuro da endodontia**

- Yin, X. *et al.* (2017). Growth/differentiation factor-5 promotes in vitro/vivo periodontal specific differentiation of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14, pp. 4111-4117. doi: 10.3892/etm.2017.5030.
- Yu, J. *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), pp. 1917-1920. doi: 10.1126/science.1151526.
- Zeng, X. *et al.* (2004). Dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(6), pp. 925-940. doi: 10.1634/stemcells.22-6-925.
- Zhang, Q. *et al.* (2010). Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *The Journal of Immunology*, 184(3), pp. 1656-1656. doi: 10.4049/jimmunol.0990118.
- Zhao, H. *et al.* (2015). Research advances in tissue engineering materials for sustained release of growth factors. *BioMed Research International*, 2015, pp. 1-7. doi: 10.1155/2015/808202.