

João Carlos Moreira Torres

TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO ENDODONTICA

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2011

João Carlos Moreira Torres

TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO ENDODONTICA

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2011

João Carlos Moreira Torres

TÉCNICAS DE REGENERAÇÃO ENDODONTICA

*Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Dentária*

Resumo

Nos casos de necrose pulpar, a abordagem predominante tem sido, até então, o tratamento de canal radicular (em ápices maduros), a apexificação (para ápices imaturos), ou a extracção. No entanto, uma polpa viva é estritamente necessária para manter a homeostase e longevidade dentária. Uma forma ideal de tratamento, portanto, pode consistir numa abordagem regenerativa, onde a polpa necrótica é removida e substituída por tecido pulpar regenerado com a finalidade de revitalizar o dente. Esta potencial abordagem inclui técnicas de revascularização pulpar, terapia com células estaminais, implantação pulpar, implantação de um scaffold, impressão tridimensional celular e terapia genética.

O objectivo final da regeneração endodóntica é restabelecer a funcionalidade pulpar, de modo a promover um dente vital para q possa ocorrer maturação apical.

Abstract

In cases of pulp necrosis, the dominant approach has been, until then, the root canal treatment (in mature apices), the apexification (for immature apices), or extraction. However, a vital pulp is strictly necessary to maintain homeostasis and tooth longevity. An ideal form of treatment, therefore, may consist of a regenerative approach, where the necrotic pulp is removed and replaced by regenerated pulp tissue in order to revitalize the tooth. This potential approach includes techniques such as, pulp revascularization, stem cell therapy, pulp implantation, scaffold implantation, three-dimensional cell printing and gene therapy.

The ultimate goal of regenerative endodontics is to restore a functional pul in order to promote the apical maturation of the tooth.

Agradecimentos

À Joana Ferreira pela fonte de inspiração inesgotável e pela ajuda prestada durante todos estes anos. Foi com enorme prazer e orgulho que te tive como colega e, espero ter como parceira.

Um especial agradecimento ao meu orientador Dr. Luís França Martins pela sua disponibilidade e dedicação.

Aos meus pais por tudo o que têm feito por mim.

Índice

I. Introdução	1
II. Materiais e métodos	4
III. Desenvolvimento	4
III.1. Medicina regenerativa	5
III.2. Da medicina regenerativa à endodontia regenerativa	5
III.3. Primeiras tentativas de regeneração pulpar	7
III.4. Reparação, revascularização e regeneração pulpar	8
III.5. O uso dos factores de crescimento	11
III.6. Técnicas actualmente e estudo para a regeneração pulpar	14
III.6.1. revascularização por coágulo sanguínea	17
III.6.2. células estaminais	21
III.6.3. Implantação pulpar	26
III.6.4. Implantação de um scaffold	28
III.6.5. Scaffold injectável	30
III.6.6. Impressão celular tridimensional	32
III.6.7. Terapia genética	33
III.7. Resultados	36
III.8. Discussão	44
IV. Conclusão	49
V. Bibliografia	51

Índice de figuras

Figura 1 - Os principais domínios de investigação necessária para desenvolver procedimentos de regeneração endodóntica	7
Figura 2 - Revascularização pulpar em estudos animais (cães). O dente foi extraído, e imediatamente reimplantado. Durante 45 dias, o suprimento sanguíneo alcançou o espaço pulpar.....	10
Figura 3 - Esquema de uma estratégia baseada em aplicação celular para a regeneração da polpa dentária	11
Figura 4 - Imagem radiográfica pré-operatória	19
Figura 5 - Radiografia 26 dias após colocação da pasta tri-antibiótica. Lesão periapical quase resolvida	20
Figura 6 - Radiografias de controlo, 6 e 12 meses após, respectivamente.....	20
Figura 7 - Radiografia de controlo, 18 meses após tratamento	21
Figura 8 - fonte das células estaminais dentárias e respectivo uso na regeneração.....	23
Figura 9 – (A) radiografia pré operatória. (B) Determinação do comprimento de trabalho. (C) Restauração definitiva do dente. (D) Reavaliação 6 meses após tratamento.....	32
Figura 10 - Radiografia da primeira consulta. Os incisivos apresentavam-se com desenvolvimento radicular incompleto. O ligamento periodontal do incisivo central esquerdo apresentava-se com espessamento	36

Figura 11 - radiografia tirada 19 dias após a primeira consulta. O espessamento do ligamento periodontal teria aumentado	37
Figura 12 - visualização clínica, 19 dias após primeira consulta. Foi observada a formação de um abscesso associada ao incisivo central inferior esquerdo.....	37
Figura 13 - radiografia tirada 3 meses após aplicação de hidróxido de cálcio, demonstrando sinais de fecho apical e formação de uma ponte dentinária.....	38
Figura 14 - radiografia tirada 30 meses após consulta inicial. Completa formação do ápice radicular e espessamento da raiz	38
Figura 15 - radiografia pós-operatória 13 anos depois da consulta inicial. Presença de lâmina dura.....	39
Figura 16 - Regeneração pulpar com células estaminais.....	41
Figura 17 - Fragmento dentário com scaffold de colagénio.....	42
Figura 18 - fragmento dentário com scaffold sintético.....	43

Índice de tabelas

Tabela 1 - origem, actividade e uso dos diferentes factores de crescimento	12
Tabela 2 - técnicas endodónticas regenerativas em estudos. Vantagens e desvantagens.....	16
Tabela 3 - fontes de células estaminais dentárias, e respectivo uso.....	25
Tabela 4 - características das células estaminais estudadas por diversos autores.....	26
Tabela 5 - vectores virais estudados por diversos autores na terapia genética	35
Tabela 6 - composição da pasta tri-antibiótica	46

I. Introdução

Idealmente, quando se dá uma infecção na polpa dentária causada por cárie ou outra lesão, recorre-se ao tratamento de canal, no qual a amputação total da polpa é seguida por desinfecção e preenchimento com um material obturador, nomeadamente a gutapercha (Huang, 2009).

Apesar do relatado sucesso clínico, os dentes endodônticamente tratados tornam-se mais frágeis e susceptíveis a fracturas ou outras complicações pós-operatórias, incluindo re-infecções devido a infiltração coronária ou microinfiltrações (Kim et al, 2010).

Além disso, a perda de vitalidade pulpar em dentes permanentes jovens termina a formação de dentina e subsequente maturação do dente. Assim, a pesquisa actual, em endodontia deve estabelecer métodos mais eficazes, fiáveis e seguros do que as terapias pulpares tradicionais (Nakashima, 2005; Murray et al, 2007).

O desejo de criar alternativas biológicas para o tratamento de canais tem inspirado o campo da endodontia regenerativa, onde o tecido pulpar danificado ou necrosado é removido e substituído por tecido pulpar regenerado para revitalizar os dentes.

Com esta revisão bibliográfica, pretende-se abordar e explicar em que consiste o conceito de regeneração endodôntica, bem como as técnicas actuais em estudo.

Os procedimentos de Regeneração endodôntica podem ser definidos como procedimentos com base biológica para repor estruturas danificadas, incluindo estruturas dentinárias e canulares, bem como células do complexo dentino-pulpar (Murray, 2007).

Endodontia regenerativa é um novo conceito que visa aplicar os avanços da engenharia de tecidos para a regeneração do complexo dentino pulpar. Relatos de múltiplos casos têm demonstrado a capacidade para regenerar dentes imaturos permitindo a continuação do desenvolvimento da raiz.

Quando se dá necrose de um dente imaturo, o desenvolvimento radicular termina. As opções de tratamento endodôntico para este caso passam por apexificação, barreiras apicais e mais recentemente, revascularização/regeneração.

A apexificação é um procedimento usado para promover a formação de uma barreira apical de modo a que provoque constrição apical num dente não vital até que se possa colocar um material obturador. Embora esta abordagem seja previsível e bem sucedida, o seu uso tem a desvantagem de impedir o contínuo desenvolvimento radicular em termos de maturação apical e espessamento das paredes dentinárias. A técnica de barreira artificial apical é feita pela colocação de um material na porção apical do canal. O material de eleição para esta técnica é o agregado trióxido mineral (MTA), que tem demonstrado altas taxas de sucesso e reduz o número de sessões necessárias (Huang, 2009).

Ambos os métodos mencionados partilham a mesma desvantagem de não permitir a continuação da maturação radicular, o que leva a uma raiz mais frágil e uma maior probabilidade de fracturar (Sun e tal, 2010).

Em 2004, Banchs & Trope publicaram um novo procedimento para o tratamento de dentes com ápice aberto chamado "revascularização". A técnica de revascularização consiste na desinfecção do canal com irrigação de hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5,25%, não havendo instrumentação do canal. Seguidamente, como Hoshino et al (1996) descreve, é colocada uma combinação de três antibióticos (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) que irá eliminar os agentes infecciosos presentes. Coronalmente é colocada uma restauração provisória. Numa consulta posterior (2 a 4 semanas após), a pasta é removida do canal e a região periapical é irritada recorrendo a uma lima ou sonda endodôntica, induzindo sangramento para o interior do canal. O sangramento é limitado até 3mm da junção esmalte cimento e permanece no canal a este nível durante 15 minutos para induzir formação de coágulo. O dente é depois selado com MTA, que é posicionado coronalmente ao coágulo sanguíneo. Sobre o MTA é colocado material restaurador definitivo.

A par desta técnica, muitas outras estão actualmente em estudo de forma a promover a regeneração pulpar.

Ao contrário das restantes técnicas endodónticas, os procedimentos de revascularização permitem um aumento em ambas, espessura e comprimento da raiz.

II. Materiais e métodos

Para a elaboração deste trabalho foram usados os motores de busca elsevier, Google academic, pubmed, b-on e journal of endodontics, para a pesquisa de artigos científicos com as seguintes palavras-chave: “regenerative endodontics”, “pulp revascularization”, “apexification”, “teeth regeneration”, “teeth revascularization”, “pulp regeneration”, “endodontic regeneration”, que resultou numa disponibilização de 8668 artigos, dos quais, 46 datados de 1971 até 2011 foram usados neste trabalho.

III. Desenvolvimento

III.1. Medicina regenerativa

A medicina regenerativa é uma promessa para a restauração de tecidos e órgãos danificados por doença, trauma, cancro, ou deformidade congénita. Medicina regenerativa pode ser definida como o uso de uma combinação de células, engenharia de materiais, e factores bioquímicos adequados para melhorar ou substituir as funções biológicas de modo a efectuar o avanço da medicina. A base para a medicina regenerativa é a utilização de terapias à base de engenharia de tecidos.

Provavelmente, a primeira definição de engenharia de tecidos foi por Langer e Vacanti (1993) que afirmou que ser "um campo interdisciplinar que aplica os princípios das ciências de engenharia e da vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar, manter ou melhorar a função do tecido”.

Murray (2007) descreve a engenharia de tecidos como o emprego de estratégias terapêuticas biológicas que visam a substituição, reparação, manutenção, e / ou melhoria da função do tecido. As alterações à definição de engenharia de tecidos, ao longo dos anos, são movidas pelo progresso científico. Embora possa haver muitas definições diferentes de medicina regenerativa, na prática, o termo passou a representar aplicações que reparam ou substituem tecidos estruturais e funcionais, incluindo o osso, cartilagem, e vasos sanguíneos.

III.2. Da medicina regenerativa à endodontia regenerativa

O contra-argumento para o desenvolvimento da regeneração endodôntica é que a polpa de um dente completamente desenvolvido não desempenha nenhum papel importante na forma, função ou estética, e, portanto, a sua substituição por um material de preenchimento (gutta percha) num tratamento canalar convencional é o tratamento mais prático. No entanto, em termos estéticos, há um risco potencial associado aos materiais de preenchimento endodôntico e selantes, que podem em certas condições descolorar a coroa dentária.

Um estudo retrospectivo elaborado por Caplan et al (2005), relacionou os tempos de sobrevivência dentária com obturação do canal radicular versus a restauração do dente descobriram que, apesar do tratamento canalar prolongar a sobrevivência do dente, a remoção da polpa de um dente comprometido pode ainda levar à perda dentária em comparação com os dentes com normalidade de tecidos. Por outro lado, embora a substituição da polpa tenha potencial para revitalizar os dentes, pode também tornar-se susceptível a mais doenças pulpares e pode exigir retratamento. A implantação de tecidos também exige maiores métodos de controlo microbiológico, necessários para a regeneração dos tecidos adequados (Murray, 2007).

No futuro, o âmbito da endodontia regenerativa pode ser melhorado para incluir a substituição de tecidos periapicais, ligamentos periodontais, gengiva, e até o dente todo. Isto daria aos pacientes uma alternativa clara ao uso de implantes disponibilizados actualmente. Assim, o potencial para esta área é ainda vasto (Murray, 2007; Huang, 2009).

Os princípios da medicina regenerativa podem ser aplicados à engenharia de tecidos endodônticos. A endodontia regenerativa passa pela pesquisa de células estaminais adultas, factores de crescimento, cultura de tecidos e órgãos e engenharia de tecidos (Fig.1). Estas técnicas crescem de vantagem quando combinadas, em vez de usadas individualmente para criar terapias regenerativas, e serão abordadas posteriormente neste trabalho (Murray et al, 2007).

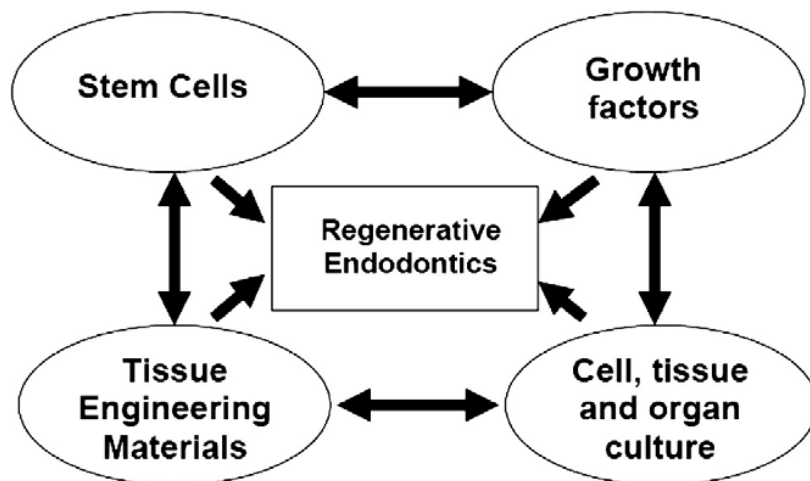


Figura 1. Os principais domínios de investigação necessária para desenvolver procedimentos de regeneração endodôntica.

III.3. Primeiras tentativas de regeneração pulpar

Para melhorar a regeneração, o uso de coágulos sanguíneos tem sido uma rica fonte de factores de crescimento para ajudar na reparação tecidular. Criar uma hemorragia para preencher o espaço endodôntico tem sido uma rotina usada no âmbito da revascularização. Esta ideia foi testada por Ostby em 1960 para determinar se o preenchimento do canal com um coágulo de sangue poderia levar à regeneração de tecido pulpar. Na década de 70, experiências semelhantes foram realizados por um outro grupo (Myers et al, 1974) onde foi observada geração de tecido conjuntivo mole. A média de crescimento de tecido para o interior do canal foi de apenas 0,1-1,0 mm. A contrapartida desta abordagem é que o tecido pulpar é diferente do tecido periapical, portanto, é improvável a regeneração pulpar produzida por células de tecidos adjacentes.

Quando há uma perda total de tecido pulpar devido a trauma, o espaço do canal é preenchido por tecidos periapicais, incluindo ligamento periodontal, osso e cimento, mas não pulpar (Huang, 2009).

Desde então, tem havido enormes melhorias nas ferramentas clínicas (materiais, instrumentos e medicamentos), no conhecimento da biologia de células estaminais e engenharia de tecidos, que promovem o surgimento de abordagens biológicas para a regeneração de uma polpa funcional de modo a revitalizar um dente (Nakashima e Akamine, 2005; Murray et al, 2007;. Huang, 2009; Scheller et al, 2009). Além disso, relatos de casos recentes indicam que tratamentos endodônticos com bases biológicas podem resultar num contínuo desenvolvimento radicular, aumento da espessura da parede dentinária e fecho apical no tratamento de casos de dentes permanentes necróticos imaturos (Huang, 2009).

III.4. Reparação, revascularização e regeneração pulpar

Embora a terminologia utilizada para o reparo, revascularização e regeneração da polpa dentária representem situações clínicas diferentes, o que implica abordagens terapêuticas distintas, muitas vezes estes conceitos são misturados ou usados de uma forma confusa, sugerindo que sejam praticamente indistinguíveis. No entanto, as diferenças entre estes termos referem realidades clínicas que não são sobrepostas. Por isso, há primariamente uma necessidade básica para uma utilização clara e correcta destes termos.

Reparação: O termo reparação pulpar, deve ser usado para terapias com o objectivo de promover a cura de uma polpa que ainda está viva. É o caso de uma lesão cariosa que afecte a dentina ou após um trauma dentário, que envolva ou não a exposição pulpar. Os sintomas clínicos devem indicar uma lesão reversível. Nestes casos, o reparo ocorre após o tratamento da lesão com um recobrimento pulpar directo ou indirecto, seguido da colocação de um material restaurador biocompatível. Se não houver exposição pulpar, nem sinais clínicos de danos irreversíveis, os odontoblastos sintetizam uma dentina reacionária (terciária), e sob este depósito de dentina, a polpa pode gradualmente curar (Goldberg et al, 2011).

Após uma exposição pulpar moderada, o recobrimento directo com hidróxido de cálcio ou MTA promove o recrutamento e a diferenciação das células progenitoras pulpares. As células estaminais ou células pluripotentes que têm origem na polpa estão

implicadas na produção de uma ponte dentinária reparadora. Novamente, devido à eficiência do agente do recobrimento, a polpa pode recuperar e é iniciada uma reparação espontânea. Isto apenas se sucede devido à ausência de um processo inflamatório agudo e a um suficiente aporte sanguíneo pulpar para promover a cicatrização, principalmente em dentes de pacientes jovens (Goldberg et al, 2011).

Após o recobrimento pulpar directo com Ca(OH)_2 , ocorre uma cicatrização superficial, e as células pulpares contribuem para a formação de uma ponte dentinária. Uma vez que a polpa ainda está vascularizada e isolada de agentes nocivos presentes na cavidade oral, tem a capacidade de resolver gradualmente os efeitos nocivos da lesão (Goldberg et al, 2011)..

Neste contexto, as moléculas bioactivas, tais como a sialoproteína óssea, ou pequenos peptídeos libertados após clivagem enzimática, estão envolvidas na proliferação, migração, e diferenciação terminal das células progenitoras pulpares em células pulpares dentárias e ósseas que produzem moléculas envolvidas na reparação pulpar e na formação de dentina terciária.

Revascularização: O termo revascularização, passa obrigatoriamente pelo processo de angiogénese (formação de novos vasos sanguíneos). Este procedimento em dentes necróticos imaturos tem muitas potenciais vantagens.

Segundo Martin Trope (2008), a revascularização pode ser alcançada em dentes jovens que foram traumáticamente avulsionados com necrose pulpar, mas não infectados. Skoglund e seus colaboradores demonstraram em estudos animais, que a revascularização pulpar é iniciada imediatamente após o reimplante dentário, e é concluída cerca de 45 dias depois (Fig.2).

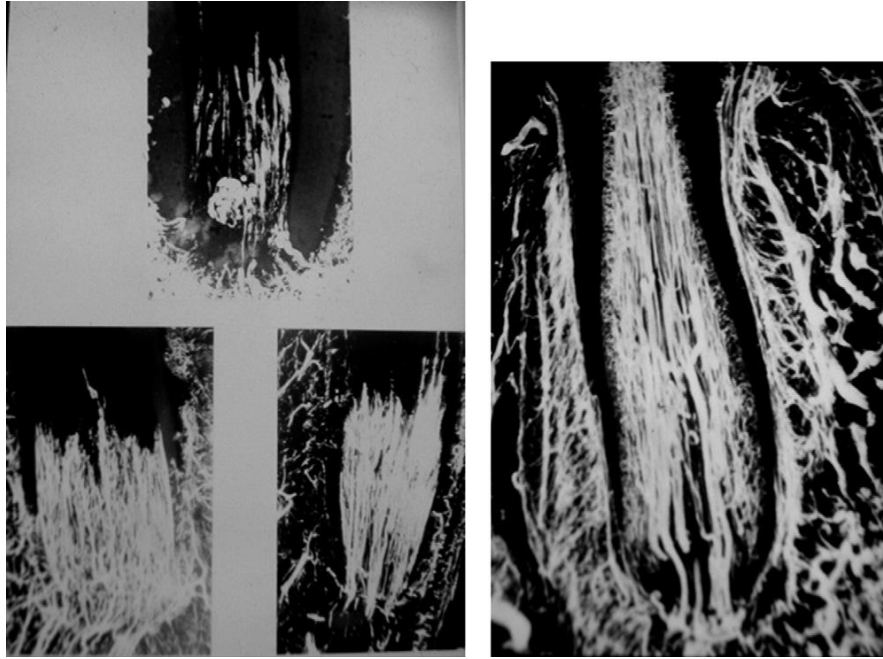


Figura 2: Revascularização pulpar em estudos animais (cães). O dente foi extraído, e imediatamente reimplantado. Durante 45 dias, o suprimento sanguíneo alcançou o espaço pulpar. (Trope, 2008)

O dente avulsionado imaturo tem um ápice aberto, raiz curta, e tecido pulpar intacto, mas necrótico. Portanto, o novo tecido tem fácil acesso para o sistema de canais radiculares e uma distância relativamente curta para proliferar e alcançar os cornos pulpares. Isto é possível, uma vez que a polpa necrótica isquêmica que é exclusiva num caso de avulsão funciona como uma matriz ou esqueleto (scaffold) onde o novo tecido cresce (Trope, 2008).

Revascularização e regeneração pulpar são termos muito semelhantes, que no entanto devem ser distinguidos. No entanto, num caso de revascularização só se pode concluir com certeza que o espaço pulpar voltou a um estado vital. Com base em pesquisas recentes, conclui-se que é mais provável que o tecido que preenche o espaço pulpar é mais semelhante ao ligamento periodontal do que a tecido pulpar. A probabilidade do tecido pulpar reentrar novamente para o espaço pulpar é de apenas 30%. (Trope, 2008)

Regeneração: Se uma lesão não for tratada, a presença de bactérias / toxinas e proteases endógenas pode levar a um extenso processo inflamatório e, seguidamente, a uma degradação pulpar total, que constitui uma alteração pulpar irreversível.

Situações semelhantes ocorrem se a polpa ficar exposta após um trauma não tratado em tempo útil. Os restos necróticos pulpares e as bactérias / toxinas remanescentes no interior do canal radicular devem ser eliminados, e o lúmen limpo antes do tratamento endodóntico convencional. No entanto, esta abordagem não é biológica. Outra opção recai sobre a regeneração pulpar *de novo*. As tecnologias de engenharia de tecidos fornecem novos meios potenciais para a construção de uma “polpa artificial”, que é onde se insere o termo regeneração endodóntica.

Define-se regeneração endodóntica como todos os procedimentos biológicos projectados para substituir as estruturas pulpares danificadas.

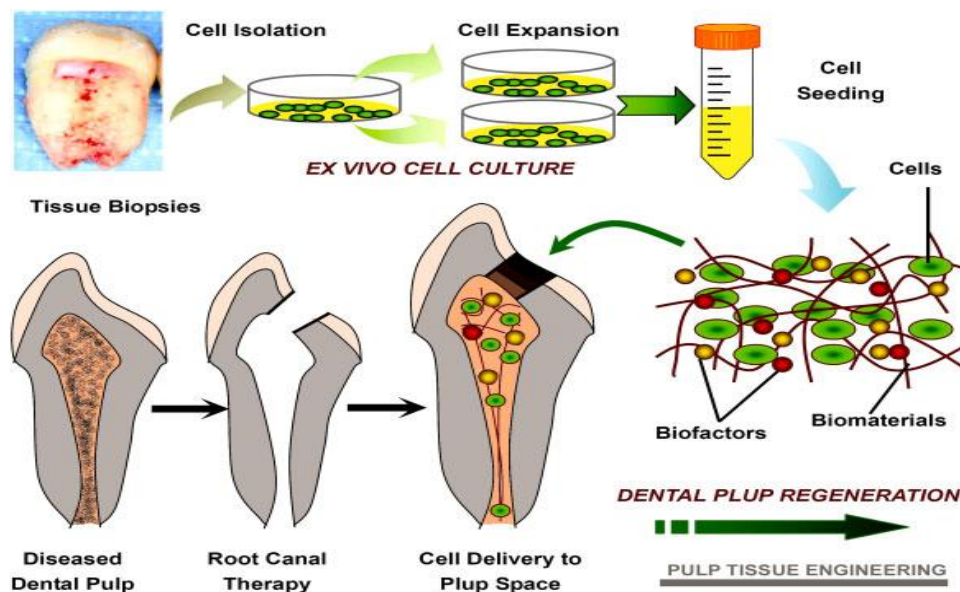


Figura 3: Esquema de uma estratégia baseada em aplicação celular para a regeneração da polpa dentária (Sun e tal, 2010)

III.5. O uso dos factores de crescimento

Os factores de crescimento são proteínas que se ligam aos receptores na célula e induzem a proliferação e/ou diferenciação celular. Muitos factores de crescimento são bastante versáteis, estimulando a divisão celular em numerosos tipos celulares, enquanto outros são mais específicos. Na maioria das vezes, os nomes dados a cada factor de crescimento têm pouco a ver com as suas funções mais importantes, e existem por causa das circunstâncias históricas em que surgiram (Murray et al, 2007, Bansal et al, 2011, Sun et al, 2010).

Actualmente, uma grande variedade de factores de crescimento foi identificada, com funções específicas que podem ser usados como parte de tratamentos de células estaminais e de engenharia de tecidos. Muitos factores de crescimento podem ser usados para controlar a actividade das células estaminais, como, aumentar a taxa de proliferação, induzir a diferenciação celular num outro tipo de tecido, ou estimular as células estaminais para sintetizar e secretar matriz mineralizada. Um resumo da origem, actividade, e utilidade dos factores de crescimento é esquematizado na tabela 1 (Murray et al, 2007).

Abbreviation	Factor	Primary Source	Activity	Usefulness
BMP	Bone morphogenetic proteins	Bone matrix	BMP induces differentiation of osteoblasts and mineralization of bone	BMP is used to make stem cells synthesize and secrete mineral matrix
CSF	Colony stimulating factor	A wide range of cells	CSFs are cytokines that stimulate the proliferation of specific pluripotent bone stem cells	CSF can be used to increase stem cell numbers
EGF	Epidermal growth factor	Submaxillary glands	EGF promotes proliferation of mesenchymal, glial and epithelial cells	EGF can be used to increase stem cell numbers
FGF	Fibroblast growth factor	A wide range of cells	FGF promotes proliferation of many cells	FGF can be used to increase stem cell numbers
IGF	Insulin-like growth factor-I or II	I - liver II-variety of cells	IGF promotes proliferation of many cell types	IGF can be used to increase stem cell numbers
IL	Interleukins IL-1 to IL-13	Leukocytes	IL are cytokines which stimulate the humoral and cellular immune responses	Promotes inflammatory cell activity
PDGF	Platelet-derived growth factor	Platelets, endothelial cells, placenta	PDGF promotes proliferation of connective tissue, glial and smooth muscle cells	PDGF can be used to increase stem cell numbers
TGF- α	Transforming growth factor-alpha	Macrophages, brain cells, and keratinocytes	TGF- α may be important for normal wound healing	Induces epithelial and tissue structure development
TGF- β	Transforming growth factor-beta	Dentin matrix, activated TH ₁ cells (T-helper) and natural killer (NK) cells	TGF- β is anti-inflammatory, promotes wound healing, inhibits macrophage and lymphocyte proliferation	TGF- β 1 is present in dentin matrix and has been used to promote mineralization of pulp tissue
NGF	Nerve growth factor	A protein secreted by a neuron's target tissue	NGF is critical for the survival and maintenance of sympathetic and sensory neurons.	Promotes neuron outgrowth and neural cell survival

Tabela 1: origem, actividade e uso dos diferentes factores de crescimento (Murray et al, 2007)

Para que a endodontia regenerativa tenha um efeito significativo sobre a prática clínica, deve se concentrar primariamente na prestação de terapias eficazes para regenerar tecido pulpar funcional e, idealmente, restaurar estrutura dentinária perdida. Em direcção a este objectivo, uma melhor compreensão dos processos biológicos mediadores da reparação tecidual permitiu que alguns investigadores imitassem ou suplementassem as respostas reparadoras do dente. A dentina contém muitas proteínas capazes de estimular respostas tecidulares. A desmineralização dos tecidos dentários pode levar à libertação de factores de crescimento após a aplicação de agentes cauterizantes na cavidade, materiais restauradores, e até mesmo cáries. De facto, é provável que grande parte do efeito terapêutico do hidróxido de cálcio possa ser devido à extracção de factores de crescimento da matriz dentinária. Uma vez libertados, estes factores de crescimento podem ter papéis chave na activação da dentinogénese terciária, uma resposta da reparação pulpo dentinária (Murray et al, 2007).

Os factores de crescimento são normalmente produzidos para recrutar células implantadas saudáveis, no entanto, num ambiente como o interior de um dente, onde os tecidos têm uma capacidade regenerativa muito baixa ou a regeneração de tecidos não ocorre frequentemente, os factores de crescimento devem ser fornecidos exogenamente para criar a actividade celular desejada e, portanto, apropriada regeneração pulpar. (Sun et al, 2010)

Duas importantes famílias de factores de crescimento que desempenham um papel vital são o factor de crescimento transformador (TGF) e a proteína morfogenética óssea (BMPs).

TGF- β 1 e β 3 são importantes na activação celular para diferenciação odontoblástica e estimulação da secreção de matriz dentinária. Estes factores de crescimento são secretados por odontoblastos e são depositados dentro da matriz da dentina, onde permanecem protegidos numa forma activa através da interacção com outros componentes da matriz dentinária. A adição de fracções proteicas de dentina purificada estimula um aumento de secreção de dentina terciária na matriz, sugerindo que o TGF- β 1 está envolvido na sinalização do dano causado e na reacção de cicatrização dentária.

Outra importante família de factores de crescimento no desenvolvimento da regeneração dentária consiste nas proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs).

As BMPs induzem a dentina terciária em maior quantidade, e mais homogénea, com a presença dos tubulos dentinários e respectivos processos odontoblásticos bem definidos em comparação aos que são formados com hidróxido de cálcio. BMP- 2, BMP-4 e BMP-7 estimulam a diferenciação de células estaminais adultas em odontoblastos e subsequente formação de dentina, demonstrando assim, que a família das BMP são o candidato mais provável como factores de crescimento. Alguns materiais naturais, como a dentina também são usados porque libertam moléculas bioactivas. Derivados da matriz de esmalte também induzem a formação de dentina, quando aplicados ao complexo dentino pulpar (Bansal et al, 2011).

Isto indica o potencial de adicionar factores de crescimento antes da protecção pulpar, ou incorporando-os em materiais restauradores endodónticos para estimular a regeneração de dentina e polpa. Segundo Murray et al (2007), a longo prazo, os factores de crescimento provavelmente serão usados em conjunto com células estaminais pós-natais para realizar a substituição pulpar de um dente afectado.

III.6. Técnicas actualmente em estudo para a regeneração endodóntica

O avanço dos conhecimentos sobre a patologia pulpar e o avanço nas tecnologias e materiais dentários actualmente disponíveis, permitiu a muitos autores estudarem novas abordagens e técnicas para casos de necrose pulpar, preferencialmente em dentes imaturos jovens, de modo a re-promover uma continuidade no desenvolvimento da estrutura dentária.

As técnicas actualmente em estudo são:

- Revascularização por coágulo sanguíneo,
- Terapia de células estaminais,
- Implantação pulpar,
- Implantação de um scaffold,

- Impressão celular tridimensional,
- Scaffold injectável
- Terapia genética

A seguinte tabela, descrita por Murray, representa as principais prioridades de investigação no desenvolvimento de técnicas endodônticas regenerativas, e as vantagens e desvantagens de cada uma. Estas técnicas não estão listados em ordem de prioridade, mas sim na sequência que deveria ser aplicada e serão abordadas individualmente.



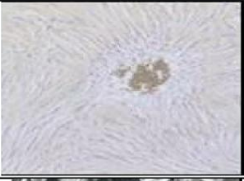
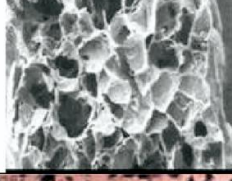
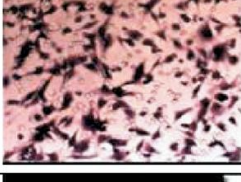


Technique	Image	Advantages	Disadvantages
<p>Root-canal revascularization: open up tooth apex to 1 mm to allow bleeding into root canals</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Lowest risk of immune rejection ✓ Lowest risk of pathogen transmission 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Minimal case reports published to date ➤ Potential risk of necrosis if tissue becomes reinfected
<p>Stem cell therapy: autologous or allogenic stem or cells are delivered to teeth via injectable matrix</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Quick, ✓ Easy delivery ✓ Least painful ✓ Cells are easy to harvest 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Low cell survival ➤ Cells do not produce new functioning pulp ➤ High risk of complications
<p>Pulp implant: pulp tissue is grown in the laboratory in sheets and implanted surgically</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Sheets of cells are easy to grow ✓ More stable than an injection of dissociated cells 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Sheets lack vascularity so only small constructs are possible ➤ Must be engineered to fit root canal precisely
<p>Scaffold implant: pulp cells are seeded onto a 3-D scaffold made of polymers and surgically implanted</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Structure supports cell organization ✓ Some materials may promote vascularization 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Low cell survival after implantation ➤ Must be engineered to fit root canal precisely
<p>3-D cell printing: ink-jet-like device dispenses layers of cells in a hydrogel which is surgically implanted</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Multiple cell types can be precisely positioned 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Must be engineered to fit root canal precisely ➤ Early-stage research has yet to prove functional in vivo
<p>Injectable scaffolds: polymerizable hydrogels, alone or containing cell suspension are delivered by injection</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ Easy delivery ✓ May promote regeneration by providing substitute for extracellular matrix 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Limited control over tissue formation ➤ Low cell survival ➤ Early-stage research has yet to prove functional in vivo
<p>Gene therapy: mineralizing genes are transfected into the vital pulp cells of necrotic and symptomatic teeth</p>		<ul style="list-style-type: none"> ✓ May avoid cleaning and shaping root canals ✓ May avoid the need to implant stem cells 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Most cells in a necrotic tooth are already dead ➤ Difficult to control ➤ Risk of health hazards ➤ Not approved by the FDA

Tabela 2: técnicas endodônticas regenerativas em estudos. As suas vantagens e desvantagens

(Adaptado de: Murray et al, 2007)

III.6.1.Revascularização do canal radicular através de um coágulo de sangue

Existe actualmente vários relatos de casos documentados de revascularização de sistemas de canais por desinfecção seguido de indução de sangramento para o interior do sistema de canais via sobre instrumentação. Um importante aspecto destes casos é o uso de irrigantes intracanales (NaOCl e clorhexidina) com colocação de antibióticos (por exemplo, uma mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) durante várias semanas. Esta combinação particular de antibióticos efectivamente desinfecta o canal radicular e aumenta a revascularização de dentes necróticos avulsionados, sugerindo que este é um passo crítico na revascularização (Hargreaves et al, 2008).

A selecção de irrigantes e medicamentos diversos é digno de pesquisas adicionais, pois estes materiais podem conferir diversos efeitos importantes para a regeneração, para além da sua propriedade antimicrobiana. Por exemplo, a tetraciclina reforça o crescimento das células do hospedeiro em dentina, não por uma acção antimicrobiana, mas através da exposição das fibras de colagénio ou factores de crescimento embutidos. No entanto, ainda não se sabe se minociclina partilha este efeito e se essas propriedades adicionais podem contribuir para o sucesso da revascularização (Banches e Trope, 2004).

Embora esses relatos de casos sejam em grande parte, dentes com incompleto desenvolvimento apical, constatou-se que o reimplante de dentes avulsionados com uma abertura apical de aproximadamente 1,1 milímetros demonstra uma maior probabilidade de revascularização. Este achado sugere que a revascularização de polpas necróticas com ápices completamente formados (fechado) podem requerer instrumentação do ápice do dente para aproximadamente 1 a 2mm de diâmetro apical para permitir o sangramento sistémico em sistemas de canal radicular. Claramente, o desenvolvimento de procedimentos endodônticos regenerativos podem requer reformulações de muitos dos conceitos tradicionais dos procedimentos endodônticos (Murray et al,2007).

O método de revascularização assume que o espaço do canal radicular esteja desinfectado e que a formação de um coágulo de sangue produza uma matriz (por

exemplo, fibrina) que retêm as células capazes de iniciar nova formação de tecido. Não está claro que o fenótipo do tecido regenerado se assemelha a polpa dentária, no entanto, relatos de casos publicados até à data demonstraram a contínua formação de raízes e o restabelecimento de uma resposta positiva aos testes térmicos pulpares. Outro ponto importante é que pacientes mais jovens geralmente têm uma maior capacidade de cicatrização (Murray et al,2007).

Existem várias vantagens para uma abordagem de revascularização. Esta abordagem é tecnicamente simples e pode ser complementada com instrumentos e medicamentos actualmente disponíveis sem recurso a biotecnologia dispendiosa. A regeneração do tecido em sistemas de canal radicular por células sanguíneas do próprio paciente evita a possibilidade de rejeição imunológica e transmissão de patógenos comparativamente com o uso de uma material artificial. No entanto, vários aspectos precisam ainda de ser abordados em pesquisas futuras. Primeiro, os relatos de casos de um coágulo de sangue ter a capacidade para regenerar tecido pulpar são promissoras, mas é necessário ter em atenção o facto da origem do tecido regenerado não ser ainda identificado. É ainda necessário mais estudo neste âmbito, para investigar o potencial desta técnica, para que possa ser recomendada para uso geral em pacientes (Banches e Trope, 2004,Murray et al, 2007).

Geralmente, a engenharia de tecidos não depende da formação de um coágulo de sangue, porque a concentração e composição de células presentes no coágulo de fibrina são imprevisíveis. Esta é uma limitação fundamental para uma abordagem da revascularização à base do coágulo sanguíneo, porque a engenharia de tecidos é fundamentada na entrega de concentrações eficazes e composições de células para restaurar a função. É muito possível que as variações na concentração de células e composição, particularmente em pacientes mais velhos (onde a presença de células estaminais pode ser inferior) podem levar a variações nos resultados do tratamento. Por outro lado, alguns aspectos desta abordagem podem ser úteis, os coágulos de fibrina derivada de plasma estão a ser usados para o desenvolvimento de matrizes em vários estudos (Huang, 2009).

O alargamento do foramen apical é necessário para promover a revascularização e manter a viabilidade celular inicial através de difusão de nutrientes. Relacionado com este ponto, as células devem ter uma reserva disponível de oxigénio e, portanto, é provável que as células da porção coronal do canal radicular possam não sobreviver ou sobreviveriam em condições de hipóxia antes da angiogénese. Curiosamente, as células endoteliais libertam factores solúveis em condições de hipoxia que promovem a sobrevivência celular e a angiogénese, enquanto que, outros tipos celulares demonstram respostas semelhantes à baixa disponibilidade de oxigénio (Banches e Trope, 2004).

O seguinte relato de um caso clínico descrito por Banches e Trope (2004), demonstra a aplicação da técnica de coagulação sanguínea para promover revascularização. Neste caso, um rapaz de 11 anos surge na consulta para avaliar um segundo pré-molar inferior, com fractura do tubérculo oclusal. O diagnóstico pulpar foi inconclusivo, registando-se apenas uma sensibilidade positiva à percussão e palpação. Ao exame radiográfico presenciou-se um ápice com abertura de 4 mm e paredes dentinárias finas propensas a futuras fracturas, para além disso ainda estava presente uma lesão periapical (fig. 4). Optou-se por isso por uma abordagem regenerativa.



Figura 4: Imagem radiográfica pré-operatória (Banches e Trope, 2004)

Após cavidade de acesso e drenagem purulenta confirmou-se a necrose pulpar. O canal foi seguidamente irrigado com 20ml de NaOCl até 1mm aquém do comprimento total do dente. Uma mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina foi preparada e colocada no canal. A cavidade de acesso foi fechada com um material provisório

(*Cavit*). O paciente regressou à consulta 26 dias depois, assintomático, e com uma evidente redução da radiolusência (Fig. 5).



Figura 5: Radiografia 26 dias após colocação da pasta tri-antibiótica. Lesão periapical quase resolvida (Banches e Trope, 2004)

O canal foi novamente irrigado com 10 ml de NaOCl. Com recurso de uma sonda endodôntica irritou-se o tecido periapical para criar algum sangramento para dentro do canal. O sangramento foi interrompido a 3 mm abaixo da junção esmalte cimento e aguardou-se 15 minutos de forma a promover o coágulo a esse nível. Posteriormente foi colocado MTA cuidadosamente sobre o coágulo de sangue, seguido de uma restauração definitiva com resina composta.

Após 6 meses, o paciente estava assintomático, e com completa resolução da radiolusência (Fig. 6 e 7). Nas seguintes consultas de rotina notou-se a continuidade do desenvolvimento do ápice do dente e o espessamento das paredes dentinárias.



Figura6: Radiografias de controlo, 6 e 12 meses após, respectivamente. (Banches e Trope, 2004)



Figura 7: Radiografia de controle, 18 meses após tratamento (Banches e Trope, 2004)

III.6.2. Células estaminais

As células mais valiosas para a medicina regenerativa são as células estaminais, principalmente as células estaminais pós-natais ou adultas. Este grupo celular acarreta uma grande promessa na medicina regenerativa, mas ainda há muitas perguntas sem resposta que terão de ser abordadas previamente ao uso como rotina em pacientes, especialmente no que diz respeito à segurança do procedimento. São ainda necessário extensos ensaios clínicos para avaliar a eficácia e segurança pela frente, antes que sejam aprovados procedimentos endodônticos regenerativos com a utilização de células estaminais.

Todos os tecidos têm origem a partir de células estaminais. Uma célula estaminal é comumente definida como uma célula que tem a capacidade de dividir e produzir continuamente células descendentes que se diferenciam em vários outros tipos de células ou tecidos. Há basicamente dois tipos de células estaminais: células estaminais embrionárias ou fetais, e células estaminais adultas ou pós-natais (Bansal et al, 2011).

A razão pela qual é importante a distinção entre as células estaminais embrionárias e pós-natais é porque estas células têm um potencial diferente para se desenvolverem em

várias células específicas, isto é, plasticidade. Tradicionalmente, a plasticidade das células estaminais embrionárias parecia ser muito maior do que a de células estaminais pós-natais, mas estudos recentes indicam que as células estaminais pós-natais têm uma maior plasticidade do que se imaginava a princípio. A plasticidade da célula estaminal define a sua capacidade de produzir células de diferentes tecidos. Quanto maior a plasticidade das células estaminais, mais valiosas são para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

Uma vez que a preservação de células estaminais embrionárias (crio preservação) é ainda controverso e rodeado por questões éticas e legais, os autores vêm-se forçados a focarem-se no desenvolvimento de tratamentos com células estaminais pós-natais (Bansal et al, 2011).

As células estaminais pós-natais, ou adultas, estão presentes em diversos tecidos do organismo humano adulto e apresentam um elevado potencial de diferenciação. Estas células podem ser classificadas pela sua fonte em: células estaminais autólogas, que são obtidas a partir do mesmo indivíduo a quem será implantada; células estaminais alogénicas, que são originárias de um dador da mesma espécie; e células xenogénicas, que são isoladas de indivíduos de outra espécie.

Para a regeneração endodôntica, as células mais promissoras são as células estaminais pós-natais autólogas, uma vez que há menos hipóteses de rejeição imunológica e demonstram maior afinidade para a estrutura dentária. (Bansal et al, 2011) A colheita de células do próprio paciente torna o procedimento menos caro e evita preocupações éticas e legais. No entanto, em alguns casos, as células do dador adequado podem não estar disponíveis, é o caso de pessoas muito doentes ou idosos.

Células estaminais de origem dentária

Até o momento, cinco tipos de células estaminais dentárias foram isoladas e caracterizadas:

- Células estaminais da polpa dentária (DPSCs)
- Células estaminais de dentes decíduos (SHED)
- Células estaminais da papila apical (SCAP)
- Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs)
- Células do folículo dentário (DFPCs)

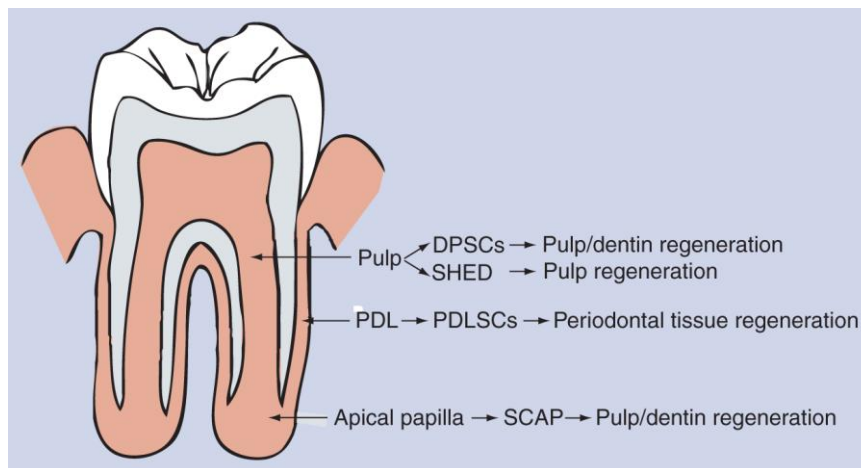


Figura 8: fonte das células estaminais dentárias e respectivo uso na regeneração (Huang, 2009)

Todas estas células estaminais demonstram multipotencialidade e capacidade para regenerar múltiplos tecidos dentários e periodontais *in vitro* e *in vivo* (Huang, 2009). De entre estas células, todas, excepto as SHED são de dentes permanentes. Estas células estaminais dentárias são consideradas células estaminais mesenquimatosas (MSCs) e possuem diferentes capacidades para formarem tecidos específicos.

Estas células *in vivo* expandidas podem-se diferenciar em células odontoblásticas e produzir tecido dentinário em ambos os estudos *in vitro* e *in vivo* (Sun et al, 2010).

Estas células estaminais, são isoladas de um tecido específico, e possuem potentes capacidades de se diferenciarem em células odontogênicas, no entanto, também têm a capacidade de dar origem a outras linhagens celulares, semelhantes, mas diferentes na potência, às células estaminais da medula óssea. De ambas as células DPSCs e SHED, é relatado que tecido semelhante ao do complexo dentino-pulpar pode ser regenerado e posteriormente utilizado para regeneração endodôntica.

As SHED são adquiridas a partir de um tecido que é 'descartável' e de fácil acesso, os melhores candidatos para SHED são caninos e incisivos moderadamente reabsorvidos com o presença de polpa saudável. Em crianças, outras fontes de células estaminais de fácil acesso são: os dentes supranumerários, os mesiodens, dentes decíduos retidos associados à falta de dentes permanentes, molares extraídos por indicações ortodônticas, entre outros. As SHED demonstram maior capacidade de proliferação, uma oferta abundante de células e uma coleta celular indolor com invasão mínima. Assim, as SHED poderiam ser uma opção desejável como uma fonte de células para a endodontia regenerativa, no entanto, em comparação, as DPSCs apresentam maior inclinação para a linhagem neuronal. As células estaminais também são isoladas de dentes em envelhecimento, mas observou-se que o número de células e sua taxa de proliferação diminui com a idade e é máxima apenas quando a coroa é formada (gêmen dentário) (Huang, 2009).

As SCAP têm maior taxa de proliferação, em comparação com as DPSCs. Parecem ser a fonte dos odontoblastos primários, que são responsáveis pela formação da dentina radicular, enquanto as DPSCs são a fonte provável dos odontoblastos de substituição. As SCAP representam as células progenitoras, e assim são uma fonte de células estaminais mais adequada que as DPSCs e SHED, mas requerem investigação adicional (Bansal et al, 2011).

Para regeneração do periodonto, são melhores as PDLSCs como fonte de células estaminais, em comparação com células isoladas a partir da polpa. Um ligamento periodontal viável é gerado a partir das PDLSCs (Bansal et al, 2011).

Células estaminais autólogas são relativamente fáceis de adquirir e fáceis de injectar com uma seringa (tratamento de injeção de células estaminais). Mas nesta técnica, as células têm baixa taxa de sobrevivência e podem migrar para locais diferentes dentro do corpo, possivelmente, levando a padrões aberrantes de mineralização. A solução para este problema é aplicar as células juntamente com um scaffold (esqueleto). (Bansal et al, 2011) Deste modo, prova-se a vantagem da conjugação de dois métodos diferentes, de modo a obter uma maior eficácia na regeneração endodôntica, conforme descrito anteriormente.

Tissue sources	Stem cells	Multiple differentiation potential	Applications	Selected references
Pulp of permanent teeth	DPSCs	Osteogenic; dentinogenic; adipogenic; chondrogenic; myogenic; neurogenic	Pulp/dentine regeneration	Gronthos <i>et al.</i> , 2000, 2002; Batouli <i>et al.</i> , 2003; Prescott <i>et al.</i> , 2008
Exfoliated primary (deciduous) teeth	SHED	Dentinogenic; osteo-inductive; adipogenic; chondrogenic; myogenic; neurogenic	Pulp regeneration	Miura <i>et al.</i> , 2003; Shi <i>et al.</i> , 2005; Cordeiro <i>et al.</i> , 2008
Apical papilla	SCAP	Dentinogenic; adipogenic; neurogenic	Pulp/dentine regeneration	Sonoyama <i>et al.</i> , 2006; Huang <i>et al.</i> , 2008; Sonoyama <i>et al.</i> , 2008
Periodontal ligament	PDLSCs	Osteogenic; cementogenic; adipogenic; chondrogenic; neurogenic	Periodontal tissue regeneration	Seo <i>et al.</i> , 2004; Shi <i>et al.</i> , 2005; Sonoyama <i>et al.</i> , 2006
Dental follicle	DFPCs	Osteogenic; dentinogenic; odontogenic; adipogenic; chondrogenic;	Dentine and periodontal regeneration	Morszeck <i>et al.</i> , 2005; Wu <i>et al.</i> , 2008; Guo <i>et al.</i> , 2009; Tsuchiya <i>et al.</i> , 2010

Tabela 3: fontes de células estaminais dentárias, e respectivo uso (adaptado de: Sun et al., 2010)

De entre os vários tipos de células que foram contemplados, as DPSCs da polpa são consideradas as células lógicas de escolha. Além das duas principais propriedades (auto-renovação e diferenciação), as DPSCs possuem ainda vantagens associadas à sua aplicação em engenharia de tecidos: o acesso ao local de colecta destas células é fácil e produz uma baixa morbidade, a extracção de células estaminais do tecido pulpar é altamente eficiente, têm uma capacidade de diferenciação extensiva e boa interactividade com os biomateriais. A fácil gestão das DPSCs faz delas uma fonte de células viáveis promissora para um uso futuro em ensaios clínicos humanos.

A seguinte tabela ilustra as características das células estaminais estudadas por diversos autores:

Researcher	Results of the study
Gronthos <i>et al.</i> ^[20] Shi <i>et al.</i> ^[14] Gronthos <i>et al.</i> ^[21]	DPSCs have the potential to form dense calcified nodules DPSCs are located predominantly in perivascular area of pulpal cavity. Characterized the self-renewal capability, multilineage differentiation capacity and clonogenic efficiency of DPSCs.
Murray <i>et al.</i> ^[15]	DPSCs are capable of forming ectopic dentin and associated pulp tissue <i>in vivo</i> . Histomorphometric analysis of pulpal cell population with ageing indicate that some reduction in pulpal cell numbers occur including the subodontoblastic cells which may be the prime candidate for participation in regeneration.
Shi <i>et al.</i> ^[14]	DPSCs express dentin-sialo-phospho-protein (DSPP)-dentin marker in Xenogenic transplant and that this expression is not present in bone formed by bone marrow stromal cells suggesting their undifferentiated preodontogenic phenotype.
Laino <i>et al.</i> ^[17]	Stem cells can also be derived from human adult [aged 30-45 yrs] dental pulp; newly formed tissue constitutes an ideal source of odontoblast and mineralized tissue.
Zhang <i>et al.</i> ^[11] Yang <i>et al.</i> ^[18]	DPSCs maintain their stem cell properties even after cryopreservation. DPSCs exhibit differentiation potential toward adipogenic, neurogenic, myogenic and chondrogenic lineages under the influence of inductive media.
Yu <i>et al.</i> ^[20] and Huang <i>et al.</i> ^[12] Stevens <i>et al.</i> ^[19] Takeda <i>et al.</i> ^[22]	DPSCs have more striking odontogenic capability than BMMSCs. DPSCs culture contains multipotent neural crest stem cells. DPSCs from human tooth germ (crown completed stage) show higher proliferation rate than those isolated at a later stage. But in long term, these DPSCs underwent a change in morphology and lost their differentiation ability.
Sumita <i>et al.</i> ^[23]	DPSCs from pulp horn were mature than pulp core cells. Cervical loop epithelial cells combined with pulp horn cells mainly reconstitute dentin-cementum structure. By contrast, cervical loop epithelial cells combined with pulp core cells reconstituted enamel-dentin structures.
Miura <i>et al.</i> ^[24]	SHED were reported to have higher proliferation rate and higher population doublings. SHED are identified to be capable of differentiating into a variety of cell types including neural cells, adipocytes and odontoblasts.
Cordiero ^[25]	Both DPSCs and SHED are capable of regenerating pulp and dentin, if proper biochemical stimuli are provided.
Koyama <i>et al.</i> ^[26]	DPSCs and SHED are pluripotent cells. These cells expanded <i>in vitro</i> and differentiated into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes.
Gould <i>et al.</i> ^[27]	Periodontium contains progenitor cells that can migrate and differentiate into either cementoblasts or osteoblasts.
Seo ^[28]	PDLSCs expressed mesenchymal stem cell markers STRO-1 and CD146/MUC18. PDLSCs differentiated into cementoblast like cells, adipocytes and collagen-forming cells. In mice they generated cementum /periodontal like structure. They form sparse calcified nodules as compared to DPSCs.
Ballini <i>et al.</i> ^[29] Yang <i>et al.</i> ^[30]	PDLSCs possess self-renewal capability and multilineage differentiation quality. PDLSCs differentiate into cementoblast like cells and formation of cementum/periodontal ligament like tissues.
Sonoyama <i>et al.</i> ^[31]	Discovered mesenchymal stem cells from apical papilla of human immature permanent teeth. Cells in apical papilla proliferated 2-3-fold greater than those in the pulp in organ culture. Apical papilla is distinctive to the pulp in terms of containing less cellular and vascular components than those in pulp.
Huang <i>et al.</i> ^[32] Park <i>et al.</i> ^[33]	SCAP exhibited adipogenic, neurogenic differentiation capability. Dental papilla derived stem cells have osteogenic potential and could be used as additional source of cells.
Huang <i>et al.</i> ^[10] Karaöz <i>et al.</i> ^[13] Sakdee <i>et al.</i> ^[34]	DPSCs derived from Mesiodens expressed stem cell-like qualities. hNDP showed adipogenic, osteogenic, chondrogenic, myogenic and neurogenic potential. DPSCs proliferated significantly more in hypoxia (3% oxygen tension) than in normoxia (20% oxygen tension)
Arthur <i>et al.</i> ^[35] Yu <i>et al.</i> ^[34]	DPSCs may induce neuroplasticity The differentiation capacity of DPSCs into odontoblasts, osteoblasts and chondrocytes changes during cell passaging and is restricted to osteoblast lineage only at the ninth passage.

Tabela 4: características das células estaminais estudadas por diversos autores (adaptado de: Bansal et al, 2011)

III.6.3. Implantação pulpar

A maioria das culturas de células *in vitro* cresce como uma monocamada única anexada à base dos frascos de cultura. No entanto, algumas células estaminais não sobrevivem, a menos que sejam cultivadas sobre uma camada de células alimentadoras.

Em todos estes casos, as células estaminais são cultivadas em duas dimensões. Em teoria, para tornar culturas de células bidimensionais em tridimensionais, as células pulpares devem ser cultivadas em filtros de membranas biodegradáveis (Murray et al, 2007).

São necessários muitos filtros para se enrolar e formar um tecido pulpar tridimensional, para posteriormente ser implantado em canais radiculares desinfetados. As vantagens deste sistema baseiam-se na facilidade de cultivar as células em filtros laboratoriais. O crescimento de células sobre os filtros foi realizado por várias décadas, já que esta é a forma como a citotoxicidade de muitos testes a materiais é avaliada. Além disso, os agregados celulares são mais estáveis do que as células dissociadas, injectadas no sistema de canais radiculares vazios.

Os problemas potenciais associados com a implantação de agregados de tecido pulpar são procedimentos especializados que podem ser necessários para assegurar que as células adiram adequadamente às paredes do canal radicular. Nestas lâminas de agregados celulares, há falta de vascularização, portanto, apenas a parte apical do canal receberia estas culturas celulares, sendo a parte coronal preenchida por uma matriz capaz de apoiar a proliferação celular. Uma vez que os filtros são finas camadas celulares, são extremamente frágeis, e isso pode torná-los difíceis de colocar no canal, sem ruptura (Bansal et al, 2011).

Na implantação pulpar, o tecido pulpar de substituição é transplantado para canais radiculares limpos e conformados. A fonte de tecido pulpar pode ser, ou uma linha de células estaminais purificadas isentas de doença e de agentes patogênicos, ou ser criado a partir de uma biópsia celular, previamente cultivada em laboratório. A cultura de agregados de tecido pulpar é feita *in vitro* em polímeros biodegradáveis de nanofibras, ou em lâminas de proteínas de matriz extracelular, como o colagénio tipo 1 ou fibronectina. Até agora, fazer crescer células pulpares em colagénio tipo I e III não demonstrou ser bem sucedida, mas outras matrizes, incluindo vitronectina e a laminina, ainda requerem mais investigação (Huang, 2009).

A vantagem de ter as células agregadas é que localiza as células estaminais pós-natais no sistema de canais radiculares. A desvantagem desta técnica é que o implante de lâminas celulares pode ser tecnicamente difícil. As lâminas são muito finas e frágeis, pelo que é necessário desenvolver técnicas implantares mais fiáveis. As lâminas celulares também carecem de vascularização, por isso teriam de ser implantadas na zona apical do sistema de canais radiculares com a exigência da aplicação coronal de uma matriz capaz de suportar a proliferação celular. Outra desvantagem, é que as células localizadas a mais de 200µm da difusão de oxigénio do suprimento do capilar sanguíneo possuem risco de anoxia e necrose. O desenvolvimento desta terapia endodôntica de engenharia de tecidos parece apresentar baixo risco de perigo para os pacientes, embora haja preocupações relativamente à resposta imunológica e a possíveis falhas para formar tecido pulpar funcional (Bansal et al, 2011, Huang, 2009, Murray et al, 2007).

III.6.4. Implantação de um scaffold

Para criar uma terapia endodôntica de engenharia de tecidos mais prática, as células estaminais pulpares devem ser organizadas numa estrutura tridimensional que possa apoiar a organização celular e respectiva vascularização. Isto pode ser obtido, recorrendo a um scaffold de polímero poroso com células estaminais pulpares embutidas. Entende-se por scaffold um tipo de “esqueleto” capaz de suportar estruturas celulares.

Um scaffold deve conter factores de crescimento para auxiliar na proliferação e diferenciação das células estaminais, levando a um melhor e mais rápido desenvolvimento do tecido. O scaffold pode também conter nutrientes para promover a sobrevivência e crescimento da célula e, possivelmente, antibióticos para prevenir qualquer crescimento bacteriano nos canais radiculares (Sun et al, 2010).

A engenharia de scaffolds nanoparticulados pode ser útil na administração medicamentosa de tecidos específicos. Além disso, o scaffold pode exercer funções mecânicas e biológicas necessárias para a substituição de um tecido. Em casos de exposição pulpar, o recurso a “lascas” de dentina parece estimular a dentina terciária. Estas lascas de dentina podem fornecer uma matriz de fixação para as células estaminais

pulpares e também ser um reservatório de factores de crescimento. A actividade reparadora natural das células estaminais pulpares em resposta a detritos de dentina fornece algum suporte para o uso de scaffolds, para regenerar o complexo dentino pulpar.

Para atingir a meta da reconstrução do tecido pulpar, os scaffolds devem atender a alguns requisitos específicos. A biodegradabilidade é essencial, pois os scaffolds precisam de ser absorvidos pelos tecidos circundantes, sem a necessidade de remoção cirúrgica. A alta porosidade e um adequado tamanho dos poros são fundamentais para facilitar a fixação celular e subsequente difusão por toda a estrutura de ambas as células e nutrientes. A taxa de degradação que ocorre tem que coincidir, tanto quanto possível com a taxa de formação de tecido, o que significa que as células ao mesmo tempo que estão a fabricar as suas próprias matrizes estruturais em torno de si próprias, o scaffold tem que ser capaz de assegurar a sua integridade estrutural dentro do corpo, para que seja posteriormente desmembrado, deixando o tecido recém-formado que vai assumir a carga mecânica (Murray et al, 2007).

A maioria dos materiais usados em scaffolds têm uma longa história de uso na medicina, como as suturas reabsorvíveis ou as malhas usadas em curativos. O scaffold, que pode ser biodegradável ou permanente, pode ainda ter uma origem natural (colagénio, dentina, fibrina, alginato, seda) ou sintética (polímeros diversos, como PLA, PGA, etc.). Os polímeros sintéticos são geralmente degradados por hidrólise simples, enquanto os polímeros naturais são degradados enzimaticamente (Bansal et al, 2011).

Estes scaffolds têm sido usados com sucesso para aplicações de engenharia de tecidos, porque são estruturas degradáveis fibrosas com a capacidade de suportar o crescimento de vários tipos diferentes de células estaminais. As desvantagens principais estão relacionadas com as dificuldades de obtenção de uma alta porosidade e um tamanho dos poros regulares. É por esta razão que a engenharia de scaffolds realiza-se a nível nanoestrutural para melhorar as interacções celulares. Os scaffolds também podem ser construídos a partir de materiais naturais, em particular, alguns derivados da matriz extracelular têm sido estudados para avaliar sua capacidade de apoiar o crescimento celular. A maior parte dos materiais usados na engenharia de tecidos são à base de

biomateriais para scaffolds que já estão aprovados. Embora os resultados iniciais sejam promissores em termos de promover as funções e a sobrevivência celular, algumas reações imunes a este tipo de materiais podem ameaçar o seu uso futuro, como parte da medicina regenerativa (Murray et al, 2007).

III.6.5. Scaffold injectável

Estruturas rígidas de scaffolds fornecem um excelente suporte para as células usadas nos ossos e outras áreas do corpo onde a engenharia de tecidos é necessária para fornecer suporte físico. No entanto, no canal radicular, a engenharia de tecidos não é necessária para fornecer suporte estrutural ao dente. Isto permitirá que o novo tecido pulpar seja administrado numa matriz de scaffold tridimensional macia, como por exemplo, um polímero de hidrogel.

Os hidrogéis são scaffolds injectáveis que podem ser aplicados por seringa. Estes hidrogéis têm o potencial de ser não invasivos e fáceis de aplicar nos sistemas de canais radiculares. Possuem ainda a característica de terem propriedades físicas semelhantes com a de tecido vivo, que é devido ao seu alto teor de água, consistência macia e elástica e baixa tensão interfacial com a água ou fluidos biológicos. Teoricamente, o hidrogel pode promover a regeneração pulpar, fornecendo um substrato para proliferação e diferenciação celular numa estrutura tecidual organizada. Problemas passados relacionados com o uso de hidrogéis incluíam um controle limitado na formação e desenvolvimento de tecido, mas os avanços na formulação melhoraram a sua capacidade de suportar a sobrevivência celular. Apesar destes avanços, os hidrogéis estão numa fase inicial de pesquisa, e este tipo de sistema de aplicação, apesar de promissor, ainda não foi provado in vivo. Para fazer hidrogéis mais práticos, é necessário torná-los fotopolimerizáveis ou de auto- endurecimento, de modo a que formem estruturas rígidas, a partir do momento em que são implantados nos tecidos locais (Murray et al, 2007).

Outro scaffold injectável em estudo é o fosfato β -tricálcico. É um alginato em fase de gel que forma gotas em fase sólida. A matriz dentinária tratada também oferece um ambiente adequado para a regeneração do tecido dentário. Scaffolds de seda também

podem ser usados para formação de osteo-dentina mineralizada. O tamanho e a forma dos poros do scaffold orientam a mineralização do tecido. Derivados de matriz de esmalte (Emdogain), cujo principal componente são as amelogeninas, também são usados como potenciais scaffolds. A aplicação de células em scaffolds é conhecido como "a criação de uma construção de tecido".

O uso de PRP como potencial scaffold num estudo de caso

O plasma rico em plaquetas (PRP) também é mencionado como um potencial scaffold, ideal para tratamentos endodônticos regenerativos. Torabinejad et al (2011) relatou a sua aplicação clínica num rapaz de 11 anos, que se queixava de sensibilidade mastigatória num segundo pré-molar maxilar. De referir que esta peça dentária teria sido avulsionada acidentalmente, e de imediato reimplantada, no mês anterior à consulta. O diagnóstico dentário revelou uma necrose pulpar e periodontite apical aguda, com a raiz imatura e o ápice aberto (fig. 9A) (Torabinejad et al, 2011).

Após ter calculado o comprimento de trabalho (fig. 9B), o canal foi irrigado com aproximadamente 10ml de NaOCL a 5,25% e seco com cones de papel. Uma pasta tri-antibiótica foi preparada com iguais proporções de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina e seguidamente aplicada no canal. Após isto, a cavidade de acesso foi selada com material provisório. O paciente surgiu 22 dias mais tarde na consulta sem quaisquer sintomas no dente referido.

Uma amostra de 20ml de sangue foi recolhida do braço do paciente para a preparação do PRP, recorrendo a um dispositivo da *Harvest Technologies Corp*. A pasta tri-antibiótica foi removida do canal recorrendo a uma solução salina esterilizada, e após a secagem do canal, foi injectada a solução com PRP no espaço canal até ao nível da junção amelocimentária, e esperou-se 5 minutos para permitir a coagulação. Sobre o coágulo, foi directamente colocado MTA cinzento, e sobre este uma restauração em amalgama. (fig. 9C)

Após 6 meses, o paciente surge novamente na consulta para reavaliação. O exame radiográfico revelou a regressão da lesão periapical, contínuo desenvolvimento radicular, e fecho apical. (fig. 9D)

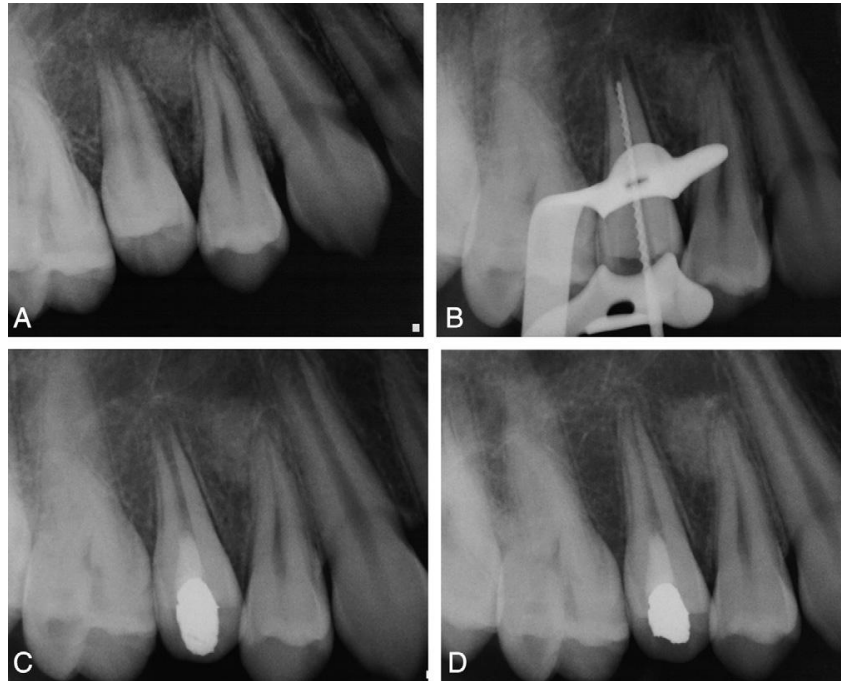


Figura 9: (A) radiografia pré operatória. (B) Determinação do comprimento de trabalho. (C) Restauração definitiva do dente. (D) Reavaliação 6 meses após tratamento

III.6.6. Impressão celular tridimensional

A aproximação final para a criação de tecido de reposição pulpar poderá passar pela técnica de uma impressão celular tridimensional. Teoricamente, trata-se de um dispositivo tipo jacto de tinta que é utilizado para dispensar camadas de células em suspensão num hidrogel, para recriar a estrutura pulpar.

As técnica de impressão celular a três dimensões pode ser usada para posicionar as células com precisão, e este método tem o potencial de criar construções de tecidos que mimetizam os aspectos naturais da estrutura pulpar.

O posicionamento ideal de células numa construção de tecidos, passa pela colocação de células odontoblásticas em torno da periferia para manutenção e reparação de dentina, com fibroblastos no núcleo pulpar para apoiar uma rede de células vasculares e nervosas.

A desvantagem da utilização desta técnica tridimensional é que, é estritamente necessária uma orientação cuidadosa do tecido pulpar, de acordo com a sua assimetria apical e coronal, durante a colocação nos canais radiculares devidamente limpos e conformados. No entanto, é necessária ainda uma vasta pesquisa para poder provar que esta técnica de impressão possa criar tecidos funcionais *in vivo* (Sun et al, 2010, Murray et al, 2007).

III.6.7. Terapia genética

Em 14 de Abril de 2003, vinte centros de sequenciação em cinco países diferentes declararam o projecto do genoma humano completo. Este marco possibilitou novos tratamentos médicos que envolvam a terapia genética.

Todas as células humanas contêm um fio de 1 m de DNA constituído por 3.000 milhões de pares base, com a única excepção das células não nucleadas, como células vermelhas. O DNA contém sequências genéticas (genes) que controlam a actividade e função celular, um dos genes mais relevantes é o p53 (Murray et al, 2007).

As novas técnicas que envolvem vectores virais ou não virais podem aplicar genes em factores de crescimento, morfogenes, factores de transcrição, e matrizes extracelulares em populações celulares alvo. Os vectores virais são modificados para evitar a possibilidade de causar doença, mas ainda mantêm a capacidade de infecção.

Os sistemas de aplicação de genes não-virais incluem plasmídeos, peptídeos, complexos DNA-ligando, electroporação, sonoporação, e lipossomas catiónicos. A escolha do sistema de aplicação de genes depende da acessibilidade e das características fisiológicas da população celular alvo. Segundo Bansal e companheiros, as técnicas não virais envolvem tanto electroporação como métodos de ultra-som para a aplicação do

gene. A aplicação de genes mediada por ultrasons parece ser bem sucedida, tanto in vivo como in vitro, mas nos métodos de electroporação, o sucesso demonstra-se apenas in vitro. Isto deve-se à falta de eritrócitos no coágulo sanguíneo resultante da mudança térmica ocorrida na electroporação in vivo. Na abordagem in vivo, o gene é aplicado sistematicamente na corrente sanguínea ou localmente nos tecidos através de injeção ou inalação. Nesta abordagem, o potencial de cura do tecido pulpar é reforçado por genes que induzem formação de dentina directamente sobre a polpa dentária exposta. A abordagem ex vivo, envolve a manipulação genética de células in vitro, que são posteriormente transplantadas para o local de regeneração. A terapia genética ex vivo estimula a formação de dentina reparadora de uma forma mais rápida e melhor em comparação com a terapia genética in vivo (Murray et al, 2007).

O uso da genética em endodontia, envolve a aplicação de genes mineralizados em tecido pulpar para promover a mineralização do tecidular, no entanto, existem riscos de saúde potencialmente graves com o uso de terapia genética, associados ao vector deste sistema (transferência de genes), e não da expressão genética.

A terapia genética chegou a ser aprovada pela FDA, e envolvia doentes terminais humanos, mas a aprovação foi retirada em 2003 após ter surgido o desenvolvimento de vários tumores em diferentes partes do corpo de um rapaz de 9 anos que tivera recebido tratamento genético (Bansal et al, 2011, Murray et al, 2007).

A pesquisa em terapia genética, ainda terá de passar por uma melhor precisão no controle genético das células e torná-lo mais específico para desenvolver um tratamento seguro para ser usado clinicamente. Esta área é relativamente recente, e faltam evidências para demonstrar o potencial de recuperação de uma necrose pulpar.

A partir dos poucos dados disponíveis, há ainda muita pesquisa a ser feita nesta área, que, segundo Bansal e companheiros, passará pela necessidade de estabelecer um protocolo de tratamento; sistemas de aplicação de seguros e eficientes; estudo do potencial riscos de saúde com o uso de terapia genética; pelo controlo preciso da técnica; e pelos requisitos para demonstrar que a terapia genética possa fornecer um tratamento que seja eficaz, económico e seguro a longo prazo (Bansal et al, 2011).

Na seguinte tabela, estão retratados os vectores virais estudados por diversos autores:

Researchers	Viral vector studied	Results of the study
Naldini <i>et al.</i> ^[192]	Retrovirus	Demonstrated <i>in vivo</i> gene delivery and stable transduction of non-dividing cells.
Rutherford <i>et al.</i> ^[193]	Recombinant virus encoding BMP-7	Effective method for inducing dentin regeneration in teeth with reversible pulpitis.
Sugiyama <i>et al.</i> ^[194]	Lentivirus vector encoding BMP-2	Bone marrow stromal cells infected with this vector showed stable expression of BMP-2
Yang <i>et al.</i> ^[195]	Adenovirus encoding BMP-2 gene	Showed enhanced odontogenic differentiation
Zhang <i>et al.</i> ^[196]	Adenovirus encoding BMP-7	Bone formation in these scaffolds was greater.
Shang <i>et al.</i> ^[197]	Adenovirus encoding PDGF-B	Modulate proliferation activity of PDLSCs; high expression of collagen Type I
Scheller <i>et al.</i> ^[198]	Retrovirus encoding active form of β -catenin	Over-expression of β -catenin suppresses the differentiation and mineralization of DPSCs (negatively regulate odontoblast-like differentiation of DPSCs)
Zhang <i>et al.</i> ^[199]	Adenovirus encoding BMP-7, PDGF-B or combination of both	All the three scaffolds revealed increase in bone formation (highest increase in combination)

Tabela5: vectores virais estudados por diversos autores na terapia genética (Adaptado de: Bansal et al, 2011)

III.7. Resultados

Apesar de ser considerado um conceito em ascensão, a regeneração endodôntica é já uma realidade estudada por diversos autores.

Iwaya e colaboradores (2011), relataram o processo de revascularização num rapaz de 7 anos, em que o incisivo central mandibular (3.1) imaturo apresentava-se com lesão periapical associada a uma luxação lateral. Este caso foi observado por um período de 13 anos, onde se observou o desenvolvimento radicular.

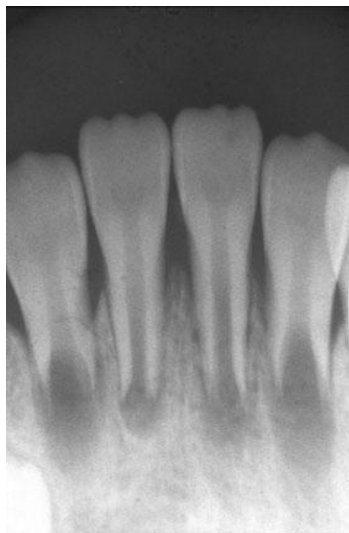


Figura 10: Radiografia da primeira consulta. Os incisivos apresentavam-se com desenvolvimento radicular incompleto. O ligamento periodontal do incisivo central esquerdo apresentava-se com espessamento (Iwaya e tal, 2011)

O incisivo central esquerdo foi estabilizado com resina adesiva, e os autores prescreveram antibiótico. Passados 19 dias, o paciente surge novamente na consulta com inflamação gengival, e presença de um abscesso associado ao incisivo central esquerdo. Deste modo, assumiram um abscesso apical agudo associada a esta peça dentária (fig. 11 e 12), começando de imediato o tratamento canal. O paciente não referiu dor durante a execução da cavidade de acesso, até atingir a câmara pulpar. Os autores resolveram deixar a cavidade aberta para realizar a drenagem do abscesso pelo canal.

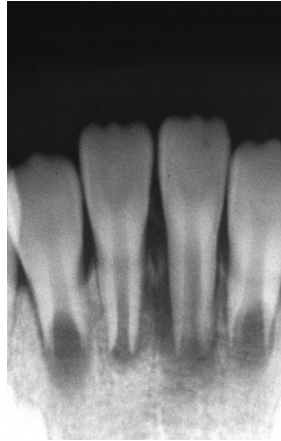


Figura 11: radiografia tirada 19 dias após a primeira consulta. O espessamento do ligamento periodontal teria aumentado.



Figura 12: visualização clínica, 19 dias após primeira consulta. Foi observada a formação de um abscesso associada ao incisivo central inferior esquerdo.

Sensivelmente um mês depois, o paciente surge novamente na consulta, onde se procedeu à irrigação canalicular com NaOCl 5% e peróxido de hidrogênio a 3%. Foi colocada posteriormente uma pasta de hidróxido de cálcio na parte superior do canal radicular. O canal não recebeu qualquer tipo de instrumentação mecânica durante o período de tratamento.

Na consulta seguinte, foi confirmado por inspeção visual a existência de tecido vital a aproximadamente 10mm do orifício canalicular. O paciente referiu dor quando se introduziu uma broca no canal. Foi novamente colocada uma pasta de hidróxido de cálcio em contacto com o tecido mole, e a cavidade de acesso selada com ionômero de

vidro. Fizeram nova radiografia 3 meses depois de este procedimento, onde se verificaram os primeiros sinais de fecho apical e a formação de uma ponte dentinária.

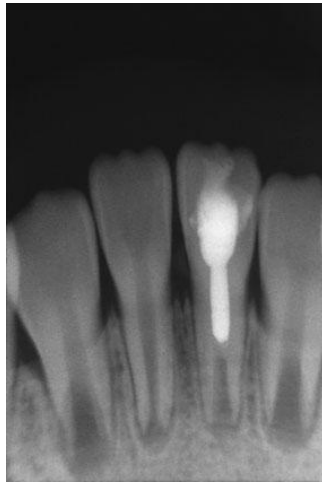


Figura 13: radiografia tirada 3 meses após aplicação de hidróxido de cálcio, demonstrando sinais de fecho apical e formação de uma ponte dentinária (Iwaya e tal, 2011)

Treze meses depois, o canal foi novamente aberto, e confirmaram a presença de uma ponte dentinária recém formada. A parte superior a esta ponte dentinária foi preenchida com gutta-percha seguida de restauração definitiva com resina composta. Um exame radiográfico feito 30 meses após o tratamento inicial confirmou o fecho apical e o espessamento da parede radicular. (fig. 14)



Figura 14: radiografia tirada 30 meses após consulta inicial. Completa formação do ápice radicular e espessamento da raiz

Treze anos depois, foi feito novo exame radiográfico revelando um dente em boas condições, sem fractura radicular, sem descoloração ou outros problemas. (fig. 15)



Figura 15: radiografia pós-operatória 13 anos depois da consulta inicial. Presença de lâmina dura

Este relato de caso mostrou a capacidade de revascularização num dente luxado. Banchs e Trope concluíram que o uso de hidróxido de cálcio poderia causar necrose dos tecidos com potencial para diferenciar nova polpa. Andreasen et al. relataram que o uso de hidróxido de cálcio a longo prazo pode aumentar o risco de fractura da raiz. No presente caso, o autor considerou o efeito citotóxico do hidróxido de cálcio insignificante, uma vez que este foi colocado apenas na parte coronal do canal, ainda assim, o uso deste material é desaconselhado.

No entanto, dentes com um foramen apical maior que 1,1mm têm maior potencial para revascularização após reimplante dentário (Iwaya et al, 2011). Quanto maior o diâmetro do foramen apical, maior o suprimento sanguíneo para o espaço canal. No presente caso, o diâmetro é nitidamente superior a 1,1 mm, sendo que, este factor pode estar directamente relacionado com o facto de ter ocorrido revascularização.

Deste modo, este relato de caso, serve apenas como prova da potencialidade da revascularização pulpar a longo prazo, e não como um protocolo fiável a seguir, uma

vez que as abordagens disponíveis actualmente vão de encontro a alguns procedimentos realizados neste acto.

A perda total do tecido pulpar pode ser o resultado de uma infecção ou trauma. Uma abordagem prática para regenerar tecido pulpar do zero, consiste na aplicação de células estaminais impregnadas num scaffold, no espaço canalar.

Nesta abordagem, realizada por Huang, foi realizada uma secção horizontal de 1mm de espessura, num dente humano. O espaço pulpar deste fragmento dentário foi então preenchido com um scaffold biossintético, ácido poli-L-láctico (PLLA). Uma porção de células estaminais (SHED) foi agregada ao scaffold, e o fragmento dentário transplantado para o espaço subcutâneo de um rato imunodeprimido.

Foi observada a formação de um tecido pulpar vascularizado 2 a 4 semanas após a implantação (fig. 16). Além disso, também constataram a formação de uma camada celular odontoblástica na superfície dentinária existente, ainda que, não tenha sido observada a formação de nova dentina.

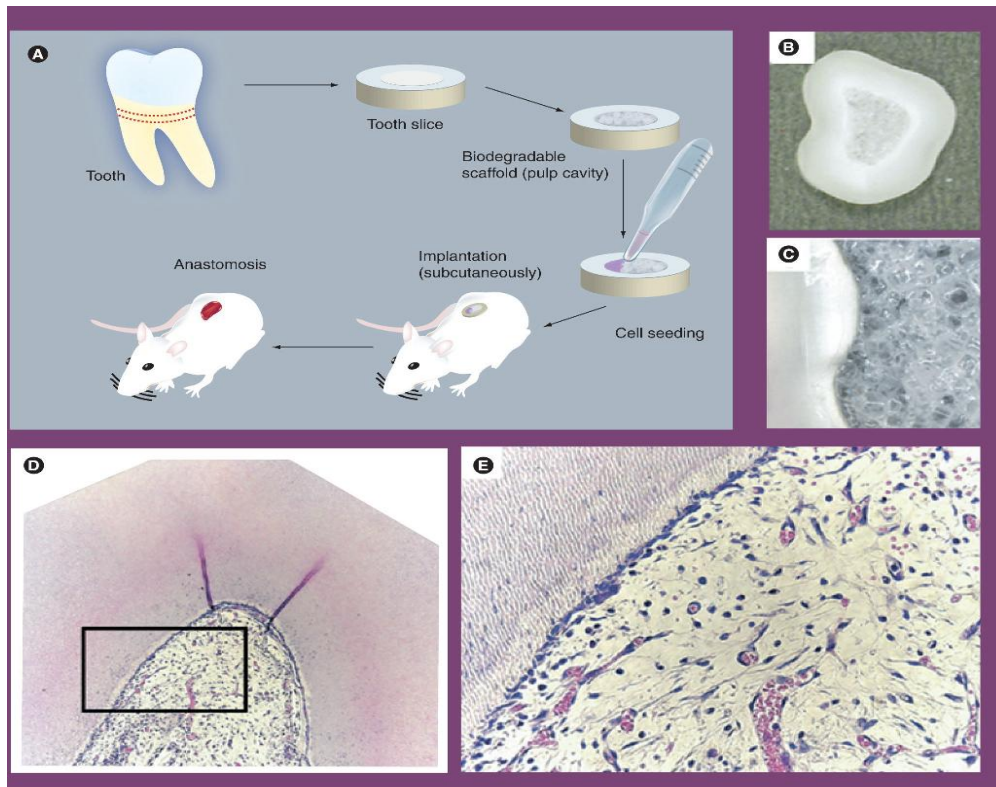


Figura 16: Regeneração pulpar com células estaminais. (A) estratégia para a engenharia de tecido pulpar. (B) scaffold biodegradável implantado no interior de um fragmento dentário e, seguidamente agregação de células estaminais de dentes decíduos (SHED). (C) ampliação do fragmento com a interface entre o scaffold e a predentina. (D) ampliação do fragmento, com primeiras evidências de microvascularização dérmica, 14 dias após implantação num rato imunodeprimido. (E) grande ampliação da zona marcada em (D), com evidência da zona odontoblástica formada.

Huang, testou numa outra abordagem semelhante, o uso de células estaminais adultas (DPSCs), associadas a um scaffold de colagénio. Desta vez, o fragmento dentário usado foi mais comprido (6 a 8 mm). O conteúdo do canal foi removido e o espaço alargado para cerca de 1 a 3 mm de diâmetro, com uma das extremidades do canal selada com MTA (fig 17A). Foi então aplicado um hidrogel de colagénio, contendo células estaminais no espaço canalalar, e a estrutura transplantada novamente para o espaço subcutâneo de um rato imunodeprimido. No entanto, foi demonstrado que o uso do colagénio como scaffold para regeneração pulpar, não é a melhor opção, visto que esta

estrutura parece contrair e não preenche as partes mais profundas do canal. Assim, também não observaram a formação de uma camada odontoblástica na parede dentinária (fig. 17B).

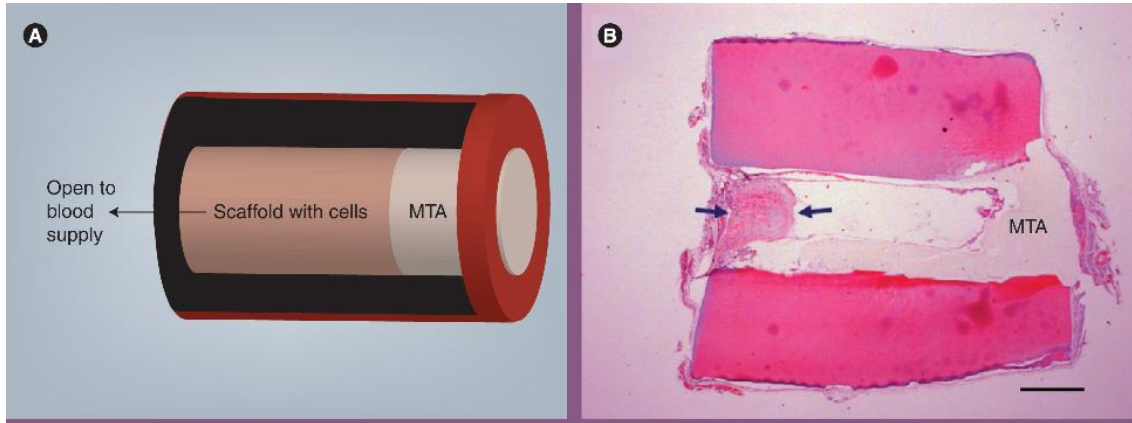


Figura 17: Fragmento dentário com scaffold de colagénio. (A) esquema da abordagem ensaiada. (B) fragmento dentário, 3 meses após transplantado num rato imunodeficiente. Observa-se a contração do hidrogel de colagénio, e formação de tecido pulpar localizada apenas na zona da abertura canalar – setas negras.

Uma vez demonstrado o fracasso associado ao uso deste scaffold, o autor resolveu testar a aplicação de novo, desta vez usando um scaffold sintético (PLG) em vez de um biológico (colagénio). O resto do procedimento foi executado de igual forma, descrita anteriormente. Como resultado, o espaço canalar estava preenchido de tecido pulpar bem vascularizado, e ainda observou a presença de uma camada dentinária mineralizada depositada na parede do canal (fig 18C).

Um outro tipo de células que pode, potencialmente, ser uma melhor fonte para a regeneração pulpo-dentinária são as células estaminais da papila apical (SCAP). Estas células parecem ser mais robustas do que as DPSCs em termos de capacidade de duplicação, na taxa de proliferação, na actividade da telomerase e na capacidade de migração celular (Huang, 2009).

Usando o mesmo modelo do estudo anterior, testaram a regeneração pulpar com células SCAP, que resultou na formação de um tecido pulpar altamente vascularizado e, mais

importante, a formação de uma camada dentinária espessa e uniforme depositada nas paredes do canal, e ainda na superfície do MTA (Fig 18D).

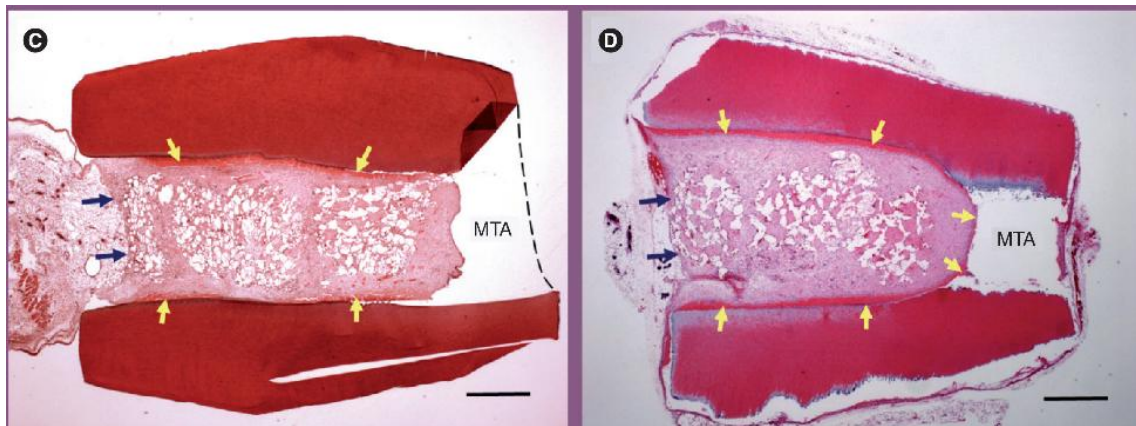


Figura 18: fragmento dentário com scaffold sintético (PLG). (C) fragmento dentário, 4 meses após ter sido transplantado num rato imunodeficiente. As setas negras indicam a demarcação entre o tecido subcutâneo do rato e o tecido pulpar regenerado no canal. As setas brancas demonstram a deposição de dentina mineralizada recém formada nas paredes do canal. (D) fragmento dentário usado para o estudo das células estaminais SCAP. As setas negras indicam a separação do tecido subcutâneo do rato e do tecido pulpar regenerado no canal. As setas brancas indicam a camada dentinária recém formada nas paredes do canal e na superfície do MTA.

III.8. Discussão

A engenharia de tecidos e a regeneração funcional é o objectivo final da medicina regenerativa. O tecido pulpar regenerado no espaço pulpar deve ser vascularizado, deve apresentar densidade celular e uma matriz extracelular adequada para que seja capaz de dar origem a novos odontoblastos que possam revestir a superfície da dentina existente (Bansal et al, 2011, Murray et al, 2007, Sun et al, 2010).

As vantagens clínicas deste tipo de abordagem, centram-se no fortalecimento das paredes radiculares de dentes imaturos, diminuindo assim a probabilidade de fractura; promover o contínuo desenvolvimento radicular até completa maturação dentária e fecho apical; promover vascularização à estrutura dentária; e evitar a extracção prematura do dente.

A vascularização pode no entanto ser difícil para os dentes em que a abertura apical do canal para os vasos sanguíneos seja pequena (<1 mm). O tamanho da abertura apical afecta o crescimento de vasos sanguíneos no tecido pulpar. Obviamente, quanto maior a abertura, mais provável é que a angiogénese possa ocorrer. Dentes imaturos com ápices abertos são, portanto, os melhores candidatos para a regeneração do tecido pulpar. É considerado que o uso de factores indutores da angiogénese, tais como VEGF e / ou PDGF, podem melhorar e acelerar este processo. Os scaffolds sintéticos, podem ser fabricados com factores de crescimento impregnados de modo a promover um tipo de matriz extracelular.

Basicamente, os tecidos corporais são compostos por dois componentes, as células e o ambiente envolvente. Este último inclui uma matriz extracelular para a proliferação e diferenciação celular (scaffold natural). As abordagens para revascularização inicialmente abordadas não eram bem sucedidas devido às limitações tecnológicas, e aos materiais e instrumentos disponíveis naqueles tempos. Mas com as tecnologias disponíveis actualmente, vários casos têm sido documentados, de revascularização em canais radiculares necróticos seguido de desinfectação do canal e estabelecimento de sangramento para o interior dos canais via sobre-instrumentação (Bansal et al, 2011).

O método de revascularização assume que o espaço do canal radicular esteja desinfetado e que a formação de um coágulo de sangue produza uma matriz (por exemplo, fibrina) que suporte células capazes de iniciar a formação de novos tecidos. Este procedimento difere da apexificação porque não é só o ápice que é fechado, mas as paredes do canal também se tornam mais espessas. É também diferente da apexogênese, que apesar de também promover o fecho do ápice e maior espessamento das paredes dentinárias, apenas o é permitido, através do uso da polpa vital remanescente.

Apesar de ainda não haver um protocolo a seguir para este procedimento, Bansal e colaboradores estabeleceram os seguintes pré-requisitos:

- A revascularização ocorre mais previsivelmente em dentes com ápices abertos e necrose pulpar secundária a trauma
- Abertura apical > 1,5 mm
- As bactérias devem ser removidas do canal por qualquer um dos seguintes métodos: pasta tri-antibiótica constituída por ciprofloxacina, metronidazol e minociclina ou hidróxido de Cálcio com formocresol.
- Selamento coronal eficaz.
- Matriz onde o tecido novo possa crescer.
- Os pacientes devem ser jovens.
- O uso de anestésico sem vasoconstritor para induzir o sangramento.
- Não instrumentação dos canais.
- O uso do hipoclorito de sódio como irrigante.
- A formação de um coágulo de sangue, provavelmente, serve como uma matriz que permite o crescimento tridimensional do tecido.

A pasta tri-antibiótica mostrou-se ser efectiva em diversos casos, Trope descreve a sua composição como uma mistura de 200mg de ciprofloxacina, 500mg de metronidazol e 100mg de minociclina.

3Mix-MP

- Antibiotics (3Mix)
 - Ciprofloxacin 200mg
 - Metronidazole 500mg
 - Minocycline 100mg
- Carrier (MP)
 - Macrogol ointment
 - Propylene glycol

Protocol for preparation

- Antibiotics (3Mix) – be sure to not cross-contaminate
 - Remove sugar coating from tablets with surgical blade, crush individually in separate mortars
 - Open capsules, crush in individually in separate mortars
 - Grind each antibiotic to a fine powder
 - Combine equal amounts of antibiotics (1:1:1) on mixing pad
- Carrier (MP)
 - Equal amounts of macrogol ointment and propylene glycol (1:1)
 - Using clean spatula, mix together on pad
 - Result should be opaque
- Separate out small portions of 3Mix and incorporate into MP using the following:
 - 1:5 (MP:3Mix) → creamy consistency
 - 1:7 (standard mix) → smears easily but does not crumble
 - If result is flaky or crumbly, then too much 3Mix has been incorporated

Storage

- Antibiotics must be kept separately in moisture-tight porcelain containers
- Macrogol ointment and propylene glycol must be stored separately
 - Discard if mixture is transparent (evidence of moisture contamination)

Tabela 6: composição da pasta tri-antibiótica (Trope, 2008)

Se for possível obter um bom suprimento sanguíneo, deverá haver uma densidade celular ideal e um estabelecimento de uma matriz extracelular de qualidade, resultando na formação de uma nova camada odontoblástica contra a parede dentinária previamente desinfetada. Assim, uma nova camada dentinária será formada e depositada contra as paredes dentinárias do canal, no entanto, esta dentina tem características estruturais fracas (Huang, 2009).

Relativamente à inervação, é provável que a polpa gerada / regenerada contenha fibras nervosas adjacentes aos tecidos naturais. As DPSCs demonstraram ter a capacidade de produzir factores neurotróficos ou possuir um potencial de diferenciação neural. No entanto, a inervação do complexo dentino pulpar é ainda controverso, já que a dentina recém formada não parece ter os tubulos dentinários organizados, não respondendo assim à natural sensibilidade pulpar associada à teoria hidrodinâmica (Sun et al, 2010).

Outra dificuldade nesta abordagem é a confirmação clínica da vitalidade pulpar. Uma análise histológica poderia confirmar a vitalidade pulpar, no entanto, não é ético remover uma fracção de tecido funcional, após tratamento regenerativo de um dente.

Isto dificulta a análise do funcionamento da mineralização odontoblástica e da inervação. Os únicos meios possíveis para esse efeito, seria recorrer a testes não invasivos, como o laser Doppler de fluxometria sanguínea, testes pulparem ao calor, frio e energia eléctrica e na falta de sinais ou sintomas (Murray e tal, 2007)(Zhang e Yelick, 2010). O uso da ressonância magnética (RM) também é descrito, mas o valor dos equipamentos torna esta opção descartada. O resultado clínico ideal seria um dente assintomático que nunca precisa-se de retratamento, mas os métodos de avaliação não subjectivos da vitalidade são essenciais para demonstrar que as técnicas endodônticas regenerativas são realmente eficazes.

A necrose pulpar em dentes permanentes imaturos inibe a maturação radicular deixando o dente com paredes radiculares finas, frágeis e susceptíveis à fractura. A técnica actualmente indicada para estas situações é a apexificação (Huang, 2009).

A apexificação é um procedimento usado para promover a formação de uma barreira apical de modo a que provoque constrição apical num dente não vital. Esta técnica é contudo realizada com a grande desvantagem de impedir o contínuo desenvolvimento radicular em termos de maturação apical e espessamento das paredes dentinárias.

A apexificação não permite a geração ou regeneração de tecidos vitais no espaço canal, enquanto que uma abordagem regenerativa oferece uma nova oportunidade para os dentes afectados.

Com o surgimento deste novo tipo de abordagem, a técnica de apexificação até então usada pode deixar de ser a primeira opção preferida para tratar os dentes permanentes imaturos com polpas necrosadas. A regeneração de tecidos vitais no espaço pulpar pode permitir um maior espessamento radicular, levando a um dente mais estruturalmente enriquecido, e com um risco de fractura potencialmente reduzido.

O progresso da regeneração pulpo-dentinário até agora tem sido promissor e é provável a sua aplicação clínica num futuro não distante. Existem ainda algumas incertezas sobre a forma como a regeneração pulpar poderá ser efectuada, e conseqüentemente, a formulação de um protocolo que possa ser seguido de modo seguro.

Das técnicas enumeradas anteriormente, muitas são ainda hipotéticas, outras ainda necessitam de ser demonstradas em casos clínicos.

As abordagens mais promissoras, e já demonstradas em alguns relatos de casos são a técnica do coágulo sanguíneo e a da aplicação de células estaminais associadas a um scaffold, conforme já apresentadas.

A criação do coágulo sanguíneo através da irritação da área periapical é importante porque funciona como matriz permitindo o crescimento de novas células para o canal radicular. A matriz de fibrina irá captar as células responsáveis pela neoformação tecidual. Thibodeau demonstrou, através de estudos conduzidos em modelos animais que a criação do coágulo sanguíneo após desinfecção do canal tem melhores resultados a nível do alargamento das paredes radiculares, resolução de infecções periapicais, maturação apical e proliferação de novas células vitais intracanalares comparativamente aos casos no qual não houve a indução do coágulo sanguíneo. O coágulo sanguíneo para além de funcionar como matriz, contém factores de crescimento plaquetários responsáveis pela regeneração tecidual. Esta técnica tem a vantagem de haver um risco muito reduzido de rejeição imunitária e de transmissão patogénica. No entanto, há também um risco aumentado de necrose se o tecido re-infectar. A principal desvantagem desta abordagem, é ainda a falta de identificação do tipo de tecido que preenche o espaço canalar (Murray et al, 2007).

A terapia de células estaminais associada ao uso de um scaffold, parece, segundo Huang (2010) ser a abordagem mais sensata, visto ter sido o único a relatar a sua aplicação *in vitro*, com posterior análise histológica, e com resultados bastantes comprometedores, conforme descrito anteriormente. A aplicação de um scaffold sintético com células estaminais da papila apical (SCAP) impregnadas, demonstrou ser eficiente na regeneração pulpar e sequente formação de uma camada dentinária nas paredes do canal. A colheita deste tipo de células, aparenta ser fácil, rápido e indolor, no entanto a população celular parece não ser resistente, e não produzem uma polpa funcional. O scaffold pode servir como matriz para estas células, no entanto, é necessário o seu desenvolvimento preciso em laboratório (Murray et al, 2007).

IV. Conclusão

O sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos está dependente da possibilidade de criar um tecido pulpar funcional que possa ser aplicado nos sistemas de canais radiculares.

Apesar das técnicas regenerativas serem neste momento apenas dirigidas a dentes permanentes imaturos, é possível que a aplicação dos conhecimentos obtidos possa ser futuramente aplicada na regeneração de dentes permanentes maduros.

A restauração de tecido dentário perdido é uma tecnologia a ser estudada nos próximos anos. Apesar da potencial aplicação de transplantes e implantes dentários, estes nunca serão tão satisfatórios como a presença de um dente natural. Este trabalho demonstrou que a endodontia regenerativa tem forte probabilidade de causar um impacto significativo na prática clínica da medicina dentária e da medicina regenerativa. No entanto, antes de tentar restaurar estrutura dentinária perdida, devemos primeiramente focar na prestação de terapias eficazes para regenerar um tecido pulpar funcional.

A vitalidade do tecido pulpar é fundamental para a vida funcional de um dente e é uma prioridade para traçar estratégias clínicas, deste modo, recorrendo-se às bases da embriologia experimental, biologia molecular e os princípios do biomimetismo (imitar processos biológicos), a regeneração pulpar pode-se tornar numa realidade nas próximas décadas.

Os métodos da regeneração endodôntica têm, clinicamente, o potencial para regenerar tecido pulpar e dentinário, sendo portanto, um método alternativo para salvar os dentes com a integridade estrutural comprometida.

Após abordar todas as técnicas regenerativas em estudo, conclui-se que futuramente, o tecido pulpar deverá ser regenerado numa abordagem in vivo, que envolva a aplicação de uma combinação de células estaminais autólogas ou alogénicas em matrizes com factores de crescimento específicos incorporados, ou a implantação pulpar envolvendo a

implantação cirúrgica de tecido pulpar sintético, desenvolvido em laboratório. Cada uma destas técnicas tem as suas vantagens e limitações que as tornam mais ou menos adequadas para diferentes situações clínicas, e o conhecimento sobre quando usar cada uma delas ainda deverá ser definido. Estas novas estratégias irão fornecer um tratamento clínico inovador na prática clínica do médico dentista.

As terapias propostas que envolvem o uso de células estaminais, factores de crescimento, e engenharia de tecidos requerem uma polpa revascularizada, que só em si, já é um enorme desafio.

A regeneração não é apenas uma melhor alternativa aos procedimentos até então realizados, mas também um modelo importante para a pesquisa futura a nível da regeneração do complexo dentino-pulpar.

V. Bibliografia

1. Banchs F, Trope M.(2004) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol. J Endod 2004;30:196-200
2. Bansal R, Bansal R. (2011)Regenerative endodontics: a state of the art. Indian j dent res 2011; 22(1): 122-31
3. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K.(2009) A retrospective evaluation of radiographic outcome in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerativeendodontic procedures. J endod 2009; 35(10):1343-9
4. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP.(2009) Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. J endod 2009; 35(2):160-4
5. Claus I, Laureys W, Cornelissen R, Dermaut LR.(2004) Histologic analysis of pulpal revascularization of autotransplanted immature teeth after removal of the original pulp tissue. J orthod Dentofacial Orthop 2004;125:93-9
6. Cotti E, Mereu M, Lusso D.(2008) Regeneration treatment of na immature, traumatized tooth with apical periodontitis reporto f a case; J endod 2008;34:611-616
7. Ding RU, Cheung GC, Chen J, Yin XZ, Wang QQ.(2009) Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontit a clinical study. J endod 2009;35:745-749
8. Epelman I, Murray PE, Garcia-Godoy F, Kuttler S, Namerow KN. (2009) A practitioner survey of opinions toward regenerative endodontics. J endod 2009; 35(9):1204-10

9. Goldberg M, Schmalz G. (2011) Toward a strategic plan for pulp healing: from repair to regeneration. *Clin oral investing* 2011; 15(1): 1-2
10. Gronthos S, Brahimi J, Li W. (2002) stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J dent res* 2002; 81:531-5
11. Hans MK, Shetty S.(2009) Regenerative endodontics:a paradigm shift in dental practice. *Indian J dent res* 2009; 20(4): 517-8
12. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, et al.(2008) regenerative potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J endod* 2008;34:S51-6
13. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al.(1996) In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125-30
14. Huang GT, Shagramanova K, Chan SW.(2006) Formation of odontoblast-like cells from cultures human dental pulp cells on dentine in vitro. *J endod* 2006; 32:1066-73
15. Huang GT.(2009) Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen med* 2009; 4(5): 697-707
16. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. (2001) Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental traumatology* 2001;17:185-7
17. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M.(2011) Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent traumatol* 2011; 27(1):55-8

18. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM.(2008) Biologically based treatment of an immature permanent teeth with pulpar necrosis a case series. J endod 2008;34:876-887
19. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, et al.(2010) Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. J Endod 2010;36:1086–91
20. Kling M, Cvek M, Mejáre I,(1986) Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. Endod Dent Traumatol 1986;2:83-9
21. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A.(2011) Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. J endod 2011;37:133-8
22. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM,(2007) Regenerative endodontics: A review of current status and a call for action. J Endod 2007;33:377-90
23. N Shah, A Logani, Bhaskar A, Aggarwal V.(2008) Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. J endod 2008;34:919-924
24. Nakashima M.(2005) Tissue engineering in endodontics. Aust Endod J 2005;31:111-3
25. Nakashima M, Akamine A.:(2005) The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentine in endodontics. J Endod 2005;31: 711–718.

26. Nevins A, Wrobel W, Valachovic R, Finkelstein F.(1977) Hard tissue induction into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. J endod 1977; 3:431-3
27. Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG, Laporta R.(1976) revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel. J endod 1976;2:159-65
28. Nosrat A, Seifi A, Asgary S.(2011) Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. J endod 2011; 37:562-7
29. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O,(1971) Tissue formation in the root canal following pulp removal. Scand J Dent Res 1971;79:333-48
30. Petersson K, Soderstrom C, Kiani-Anaraki M.(1999) Evaluation of the ability of thermal and electrical tests to register pulp vitality. Endod dent traumatol 1999; 15:127-31
31. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. (2010) Challenges in regenerative endodontics: a case series. J endod 2010;36(3):536-41
32. Rafter M.(2005) Apexification a review. Dent traumatol 2005; 21:1-8
33. Reynolds JD, Johnson JD, Cohenca N.(2009) Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration a case report. Int Endod J 2009;42:84-92

34. Ritter AL, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M, (2004) Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol* 2004;20:75-84
35. Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. (2009) Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil* 2009;36:368–389.
36. Schroder U. (1985) Effects of calcium hydroxide containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J dent Res* 1985;64:541-8
37. Seale S, Glickman N.(2008) Contemporary perspectives on vital pulp therapy views from the endodontist and pediatric dentists. *J endod* 2008; 34:57-61
38. Sun HH, Jin T, Yu Q, Chen FM.(2011) Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J tissue eng regen med* 2011; 4:1-16
39. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M.(2007) Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2007;33:680-689
40. Thomson A, Kahler B.(2010) Regenerative endodontics biologically based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust dent j* 2010; 55(4): 446-52
41. Torabinejad M, Corr R, Buhley M, Wright K, Shabahang S.(2011) An animal model to study regenerative endodontics. *J endod* 2011; 37:197-202
42. Torabinejad M, Turman M.(2011) Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J endod* 2011;37:265-9

43. Trope M,(2008) regenerative potencial of dental pulp. J endod 2008; 34:13-17
44. Yamauchi N, et al.(2011) Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. J endod 2011; 37: 390-7
45. Yanpiset K, Trope M.(2000) pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. Endod Dent Traumatol 2000; 16:211-7
46. Zhang W, Yelick PC.(2010) Vital pulp therapy current progress of dental pulp regeneration and revascularization. Int j dent 2010: 856087

