



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

# **Uso terapêutico de células estaminais derivadas polpa da dentária na regeneração dentária**

**João Carlos Landim Vieira Pinhel**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em  
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)**

**Gandra, 5 de junho de 2020**



**CESPU**

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO  
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**João Carlos Landim Vieira Pinhel**

**Dissertação conducente ao Grau de Mestre em  
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)**

**Uso terapêutico de células estaminais derivadas  
polpa da dentária na regeneração dentária**

**Trabalho realizado sob a Orientação do Prof. Doutor Pedro Bernardino**

## **Declaração de Integridade**

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.



## **Declaração do Orientador**

Eu, **Pedro Bernardino**, com a categoria profissional de professor auxiliar do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador da Dissertação intitulada “*Uso terapêutico de células estaminais derivadas da polpa dentária na regeneração dentária*”, do Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, **João Carlos Landim Vieira Pinhel**, declaro que sou de parecer favorável para que a Dissertação possa ser depositada para análise do Arguente do Júri nomeado para o efeito para Admissão a provas públicas conducentes à obtenção do Grau de Mestre.

Gandra, 5 de junho de 2020



## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar queria agradecer aos meus pais, João Pinhel e Célia Pinhel, por todo o sacrifício e pelo apoio que sempre tive ao longo deste percurso de 5 anos.

Em segundo lugar quero agradecer ao Instituto Universitário de Ciências e Saúde (IUCS), pela qualidade do corpo docente e por ter tido a oportunidade de concretizar o objetivo de ser profissional de Medicina Dentária.

Ao meu binómio e colegas de curso, deixo aqui o meu agradecimento pelo enorme companheirismo e amizade que foi criada ao longo deste percurso académico.

Por fim, quero agradecer ao meu orientador, Professor Pedro Bernardino, por ter estado sempre disponível para a elaboração deste trabalho.



## **RESUMO**

É sabido que as células estaminais são células indiferenciadas e têm capacidade de autorrenovação, podendo-se transformar em diferentes tipos celulares. A polpa dentária tanto de dentes permanentes como decíduos são ricos em células estaminais do tipo mesenquimatoso.

O principal objetivo desta revisão sistemática integrativa foi determinar através da comparação entre 2 tecidos (pulpar e periodontal) qual possuía maior potencialidade regenerativa após a implantação de células estaminais derivadas da polpa dentária.

Compararam-se os resultados dos estudos existentes entre estes 2 tipos de tecidos, procurando saber qual possuía maior viabilidade e maior taxa de proliferação celular, oferecendo assim melhores resultados em termos de aplicabilidade clínica em combinação com diferentes matrizes e fatores de crescimento.

A pesquisa literária foi realizada através das bases de dados eletrónica PUBMED, com limite temporal de 10 anos. Foram identificados 29 artigos dos quais 6 estudos abordavam a regeneração de tecidos periodontais e 6 abordavam a regeneração de tecidos pulpares, sendo que à exceção de um estudo para a regeneração periodontal que foi inconclusivo, todos os restantes apresentaram resultados positivos.

Esta revisão permitiu ver que as regenerações dos tecidos dentários analisados são bastante viáveis embora o tecido pulpar pareça dar uma maior resposta regenerativa em relação ao tecido periodontal aquando da aplicação de células estaminais derivadas da polpa dentária. Mais estudos precisam ser realizados para corroborar esta ideia e com amostras de indivíduos maiores. O futuro passará certamente em usar estas células como tratamento terapêutico.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Células estaminais da polpa, Células estaminais dentárias, Regeneração dentária, Regeneração pulpar, Regeneração periodontal



## **ABSTRACT**

It is known that stem cells are undifferentiated cells and have the ability to self-renew and can be transformed into different cell types. The dental pulp of both permanent and deciduous teeth is rich in mesenchymal stem cells.

The main goal of this study was to determine through the comparison between 2 tissues (pulp and periodontal) which one had greater regenerative potential after the implantation of stem cells derived from the dental pulp.

It was then compared through results of studies carried out in which of the two tissues had greater viability, higher rate of cell proliferation and better results after its clinical application in combination with different *scaffolds* and growth factors.

The literary research was carried out through the electronic databases PUBMED, with a time limit of 10 years. 29 articles were identified, of which 6 studies addressed the regeneration of periodontal tissues and 6 addressed the regeneration of pulp tissues, with the exception of one study for periodontal regeneration that was inconclusive, all the rest showed positive results.

This review allowed us to see that the regenerations of the analyzed dental tissues are quite viable although the pulp tissue seems to give a greater regenerative response in relation to the periodontal tissue when applying stem cells derived from the dental pulp. More studies need to be carried out to corroborate this idea and with larger samples. The future will certainly pass on using these cells as a therapeutic treatment.

## **KEYWORDS**

Dental pulp stem cells, dental stem cells, Regenerative dentistry, pulp regeneration, periodontal regeneration



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1-2</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>2</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODO .....</b>	<b>3</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>4-11</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	
<b>5.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA</b>	
<b>5.1.2 Células estaminais.....</b>	<b>12-13</b>
<b>5.1.3 Células estaminais dentárias .....</b>	<b>13-14</b>
<b>5.1.4 Células estaminais da polpa dentária .....</b>	<b>14-15</b>
<b>5.1.5 Métodos de isolamento .....</b>	<b>15-16</b>
<b>5.1.6 Engenharia tecidual .....</b>	<b>16-18</b>
<b>5.2 ANÁLISE DE ESTUDOS .....</b>	<b>18-20</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>21-24</b>

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

**MSCs**- Células estaminais mesenquimatosas

**DSCs** – Células estaminais dentárias

**DPSCs** – Células estaminais da polpa dentária

**hDPSCs** – Células estaminais humanas da polpa dentária

**mDPSCs** – Células estaminais mobilizadas da polpa dentária

**DPSCs–IPs** – Células estaminais da polpa dentária inflamada

**SHED** – Células estaminais de dentes decíduos esfoliados

**PDLSCs** –Células estaminais do ligamento periodontal

**SCAP** –Células estaminais da papila apical

**DFSCs** –Células estaminais do folículo dentário

**L-PRF** – Fibrina rica em plaquetas e leucócitos

**CBCT** – Tomografia computadorizada de feixe cônico

**PAI**- Periapical index

**G-CSF** – Fator estimulador de colónias de granulócitos

**CAL** – Perda de inserção clínica

**BMSCs** – Células estaminais da medula óssea

**adMSCs** – Células estaminais derivadas do tecido adiposo

**(Neun+)** -Biomarcador de neurónios

**PD** – Profundidade de bolsa

**FACS** – Citometria por ativação fluorescente

**MACS** -Citometria por ativação magnética

**MRI**- Ressonância magnética

**GMP**- Boas práticas de fabrico

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta de células estaminais de origem dentária (DSCs) promoveram não só o interesse nas suas características, mas também o interesse na sua aplicabilidade na medicina regenerativa. As DSCs são uma população de células-tronco mesenquimatosas/progenitoras altamente proliferativas e com potencial para autorrenovação e de diferenciação de multilinhagem celular<sup>1</sup>.

Juntamente com o avanço da pesquisa de engenharia tecidual, as DSCs têm sido testadas para a regeneração dos mais variados tecidos orais como a polpa, dentina, cimento, ligamento periodontal e osso<sup>1</sup>. Dado que os tecidos orais são facilmente acessíveis pelos médicos dentistas, as DSCs podem ser obtidas de maneira viável a partir desses tecidos e ser uma boa fonte para várias aplicações terapêuticas baseadas em células-tronco. Existem pelo menos 5 tipos de DSCs que foram isoladas e caracterizadas<sup>1,2</sup>, sendo elas as células-tronco pós-natais da polpa dentária (DPSCs) que foram as primeiras células-tronco do mesoderma dentário a serem isoladas<sup>3</sup>, as células-tronco dentárias da polpa dentária de dentes decíduos [células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos] (SHED), do ligamento periodontal [células-tronco do ligamento periodontal] (PDLSCs), da papila apical [células-tronco da papila apical] (SCAP)<sup>4</sup> e do folículo dentário [células-tronco do folículo dentário] (DFSCs)<sup>1,2</sup>.

Do conjunto de células estaminais de origem dentária, as células estaminais derivadas da polpa dentária [DPSCs] são as de mais fácil acesso porque um grande número de DPSCs são produzidas e os métodos de isolamento são menos invasivos comparado com outras fontes de tecidos, sendo por isso motivo de análise de estudo tendo capacidade de diferenciação em células tipo odontoblásticas, osteoblastos, adipócitos e células neurais<sup>1</sup>. As DPSCs foram, portanto, consideradas células dentárias estaminais com potencial para a regeneração periodontal, pulpar e de dentina<sup>3,4,5</sup>.

Dentes que apresentam lesões como exposições pulpares, cáries profundas e pulpites irreversíveis são normalmente tratadas com tratamentos endodônticos convencionais seguidos de reconstruções dentárias. Este procedimento geralmente envolve a amputação

ou a remoção total da polpa dentária e a substituição do tecido por um material inerte<sup>6</sup>. Apesar da eficácia verificada neste tipo de tratamentos, os dentes tratados endodonticamente tornam-se mais frágeis e suscetíveis a fraturas ou outras complicações pós-operatórias, estando sujeitos a infecções recorrentes por microinfiltrações ou por infiltração coronária<sup>7</sup>, sendo que uma polpa viva é imprescindível e necessária para manter a homeostasia e longevidade dentária. A regeneração de tecidos pulparem tornou-se assim um objetivo para a restauração funcional dos dentes na medicina dentária<sup>6</sup>.

Outra patologia com prevalência mundial é a periodontite que é acompanhada pela destruição de tecidos de suporte podendo resultar na perda dentária<sup>4</sup>. O objetivo principal e primordial no tratamento da periodontite é reparar os tecidos de suporte, especialmente o osso. Nos últimos anos o rápido desenvolvimento de engenharia tecidual tem mostrado um grande potencial para a reconstrução de defeitos ósseos associados à periodontite<sup>3,4</sup>. A descoberta de DPSCs e outras células estaminais odontogénicas têm fornecido novas perspectivas para a regeneração de tecidos periodontais<sup>4</sup>.

## **2. OBJETIVO**

Esta revisão sistemática integrativa tem como objetivo comparar qual dos dois tecidos (tecido pulpar e periodontal) possui maior viabilidade, maior taxa de proliferação celular e melhores resultados depois da transplantação de DPSCs, partindo da hipótese de que são expectáveis melhores resultados na regeneração de tecido pulpar por as células estaminais provirem desse mesmo tecido.

### 3. MATERIAIS E MÉTODO

Foi efetuada uma pesquisa eletrónica na base de dados de publicações científicas PUBMED usando as combinações dos seguintes termos científicos com conetor booleano AND e OR: *Regenerative dentistry AND stem cells OR mesenchymal stem cells AND periodontal tissue engineering OR periodontal tissue regeneration OR periodontal bone defect AND dental pulp regeneration OR regenerative endodontics AND dental pulp stem cells.*

Foi colocado como limite temporal publicações de até 10 anos, compreendidos entre 2010 e 2020 na língua inglesa e portuguesa, sendo que foram selecionados artigos relacionados com a espécie humana e animal, pois muitos dos ensaios clínicos ainda se encontram numa fase precoce de investigação. Os critérios de inclusão usados para a pesquisa envolveram ensaios clínicos e case reports. Para a seleção de artigos foi feita uma avaliação preliminar dos resumos para ver se os artigos iam ao encontro do estudo em questão. A totalidade dos artigos foram compilados para cada combinação de palavras-chave sendo que os artigos duplicados foram removidos usando o Mendeley citation manager.

#### 4. RESULTADOS

A pesquisa literária identificou um total de 130 artigos na base de dados eletrônica de publicações científicas PubMed como ilustra o esquema da figura 1. Feita a remoção de duplicados, 81 artigos foram removidos após a leitura e análise dos títulos e resumos dos artigos. Dos restantes 31 artigos foram incluídas 4 pesquisas manuais de referências de artigos completos. Depois de uma leitura completa dos 35 artigos, 6 foram excluídos por não se enquadrarem considerando o objetivo do presente estudo. Deste modo foram selecionados 29 artigos para a realização desta revisão.

12 artigos abordavam a regeneração nos 2 tecidos (pulpar e periodontal), 6 (50%) investigaram e abordaram a regeneração da polpa dentária através de células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária (DPSCs) enquanto que os outros 6 (50%) investigaram e abordaram a regeneração das estruturas periodontais através de células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária (DPSCs). O objetivo dos estudos, o tipo de tecido que se pretende regenerar, os efeitos terapêuticos e os resultados podem ser encontrados na tabela de artigos (figura 2). Os principais resultados são apresentados a seguir:

Dos 12 estudos analisados, 4 foram realizados em animais no qual tanto em estudos que tinham como objetivo a regeneração pulpar como a regeneração periodontal houve regeneração dos tecidos que se pretendia regenerar.

Em relação aos testes em animais (cães) para a regeneração pulpar, houve regeneração do tecido pulpar com inervação e vascularização comprovada pela neurogênese através do marcador (PGP9.5) e a angiogênese através da (BS -I lectin), tendo também sido comprovada a formação de tecido pulpar radiograficamente e histologicamente.<sup>8-10</sup>

Do ponto de vista do teste realizado em animais (porcos) para a regeneração periodontal, o estudo mostrou que melhorou significativamente a regeneração óssea periodontal e tecidos moles<sup>11</sup>.

Os estudos prévios realizados em animais mostraram, portanto que todos os requisitos para segurança e eficácia para aplicações clínicas foram estabelecidos para a completa regeneração pulpar e periodontal em humanos.

Em relação aos estudos efetuados na espécie humana foi possível observar que houve regeneração pulpar em todos os estudos efetuados<sup>12-14</sup> no qual 2 estudos foram realizados em pacientes com pulpíte irreversível<sup>13,14</sup> e 1 estudo efetuado em pacientes com necrose pulpar<sup>12</sup>.

Foram efetuados uma série de testes específicos que avaliam alguns fatores que ajudam a determinar se ocorreu regeneração pulpar, dentre eles a neurogênese e a angiogênese. Para a neurogênese foram utilizados testes pulpares elétricos que responderam positivamente, realçando que num dos estudos<sup>12</sup> complementou-se com Neun+, usado como biomarcador de neurónios, sendo que para a angiogênese utilizou-se a fluxometria doppler para a maioria dos estudos, dando-nos assim a indicação que há irrigação. Análises histológicas e radiográficas também foram utilizadas, entre eles o CBCT, destacando o uso do sinal de imagem da intensidade de ressonância magnética (MRI), em que o sinal do tecido pulpar regenerado era similar à polpa normal<sup>14</sup>. Avaliações clínicas também tiveram uma resposta normal à percussão e à palpação. Uma avaliação do ponto de vista geral permitiu-nos constatar que a implantação de células estaminais derivadas da polpa dentária permitiu a regeneração de tecido pulpar contendo nervos sensoriais em todos os estudos, destacando um estudo em que foram implantadas células estaminais derivadas da polpa dentária inflamada com resultados satisfatórios de regeneração pulpar<sup>13</sup> servindo estes estudos de base para a padronização de protocolos para futuras aplicações em regeneração pulpar.

Em contrapartida nos estudos analisados para a regeneração periodontal usando células estaminais derivadas da polpa dentária foi possível observar que houve um estudo que foi incapaz de mostrar que a aplicação autóloga de células estaminais da polpa provocasse a redução da reabsorção óssea após extração dentária<sup>15</sup>, sendo que nos restantes estudos houve uma regeneração periodontal nas áreas onde foram realizados excertos com células estaminais, melhorando significativamente os parâmetros de regeneração periodontal dentre os quais , a redução da mobilidade dentária, redução nas bolsas periodontais, redução na área de defeitos ósseos, um aumento da densidade mineral óssea nos locais onde foi realizado o excerto e um ganho médio da perda de inserção

clínica<sup>16-19</sup> sendo que num dos estudos também se recorreu a células estaminais derivadas da polpa dentária inflamada<sup>16</sup>, denotando assim grande potencial regenerativo destas células .

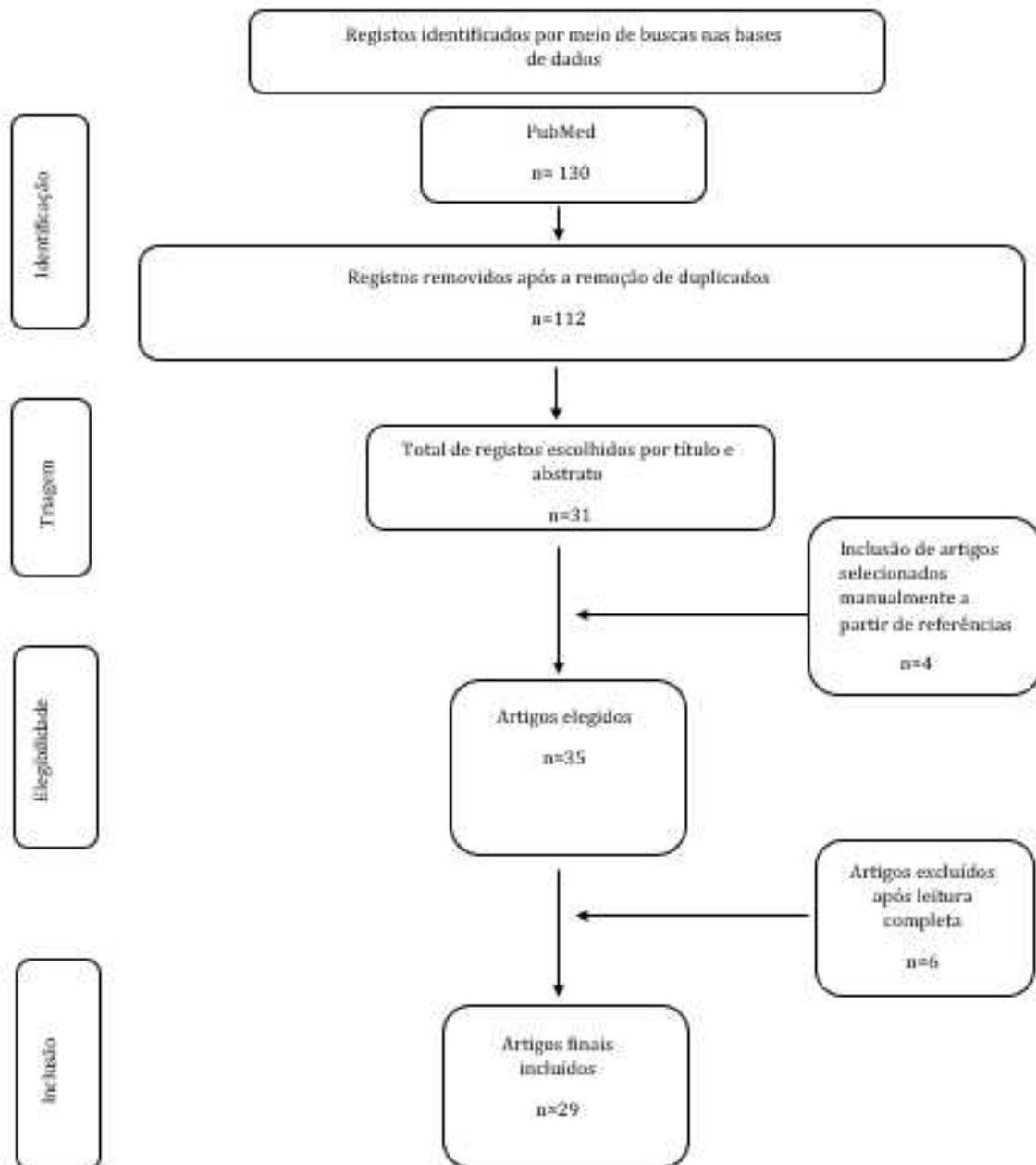


Figura 1. Esquema de pesquisa utilizado para este estudo

Figura 2. Tabela de artigos

<b>Autor (Ano)</b>	<b>Espécie/ (amostra)</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Tecido que se pretende regenerar</b>	<b>Scaffolds / fatores de crescimento</b>	<b>Efeitos terapêuticos</b>	<b>Resultados</b>
Xuan et al. (2018) <sup>12</sup>	Humana (26-alvo 10 - controlo)	Regenerar a polpa dentária e promover a sua vitalidade em dentes permanentes imaturos com necrose pulpar.	Polpa dentária	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formação do complexo dentino-pulpar comprovado radiologicamente (12 meses) e histologicamente;</li> <li>• Neurogênese comprovada através de testes pulpares elétricos e Neun+.</li> <li>• Angiogênese comprovada através da fluxometria doppler.</li> </ul>	A implantação de agregados de células SHED levou à regeneração de tecido pulpar contendo nervos sensoriais.
Meza et al. (2019) <sup>13</sup>	Humana (1 paciente)	Descrever a técnica usando a terapia celular autóloga com células estaminais mesenquimatosas derivadas da polpa dentária inflamada pré -tratadas com <i>Fibrina rica em plaquetas e leucócitos</i> (L-PRF) em um dente maduro.	Polpa dentária	(DPSCs) com L-PRF	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comprovado radiograficamente avaliando o PAI (índice periapical) e CBCT (Tomografia Computorizada de Feixe Cónico) (PAI=1; CBCT PAI=0)</li> <li>• As avaliações clínicas revelaram-se normais aos testes à percussão e à palpação;</li> <li>• Resposta positiva ao teste pulpar elétrico;</li> <li>• A fluxometria doppler indicam que há irrigação;</li> </ul>	Potencialidade do uso de DPSC autólogo e (L-PRF) como alternativa ao tratamento de dentes com pulpíte em dentes permanentes maduros, servindo de base para futuras aplicações em regeneração pulpar.

Nakashima et al. (2017) <sup>14</sup>	Humana (5 pacientes)	Averiguar a segurança, a potencial eficácia e a viabilidade da transplantação autóloga de MDPSCs em pacientes com pulpíte irreversível.	Polpa dentária	G-CSF em atelocolágeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Resposta positiva aos testes pulpares elétricos após 4 semanas;</li> <li>• CBCT (Tomografia Computorizada de Feixe Cônico Tomografia) mostrou a formação de dentina em 3 dos 5 pacientes;</li> <li>• O sinal de imagem da intensidade de ressonância magnética (MRI) do tecido pulpar regenerado era similar à polpa normal.</li> </ul>	Este estudo mostra que as MDPSCs são seguras e eficazes para a completa regeneração pulpar em humanos
Nakashima et al. (2014) <sup>10</sup>	Cães	Padronizar e estabelecer guidelines para a terapia de células estaminais na regeneração endodôntica.	Polpa dentária	G-CSF em atelocolágeno	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comprovado radiograficamente histologicamente a formação de tecido pulpar;</li> <li>• Neurogênese comprovada através do marcador (PGP9.5)</li> <li>• Angiogênese comprovada através da (BS -I lectin)</li> </ul>	A segurança pré-clínica, a viabilidade e a eficácia da regeneração pulpar pelas MDPSCs e G-CSF foram estabelecidas.
Barbier et al. (2018) <sup>15</sup>	Humana (30 pacientes)	Analisar a capacidade de formação óssea após excerto com células estaminais da polpa dentária.	Osso mandibular	Matriz de colagénio	Não foram encontradas diferenças significativas na reparação óssea, tanto a nível de densidade óssea como altura do septo interdental	Este estudo foi incapaz de mostrar que a aplicação autóloga de células estaminais da polpa para redução da reabsorção óssea após extração dentária.

Hérmendez-Monzaraz et al (2018) <sup>19</sup>	Humana (1 paciente)	Analisar a viabilidade da transplantação alogénica de células estaminais da polpa em paciente com doença periodontal	Tecidos periodontais	Esponja de colagénio	Nos 3 e 6 meses a seguir ao excerto alogénico o paciente exibiu: <ul style="list-style-type: none"> <li>• redução na mobilidade dentária</li> <li>• redução na bolsa periodontal</li> <li>• redução na área de defeito ósseo</li> <li>• densidade mineral óssea aumentada na região do excerto</li> </ul>	Regeneração periodontal na área onde foi realizado o excerto com DPSCs.
Iohara et al. (2013) <sup>8</sup>	Cães	O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia e a segurança na transplantação como um prelúdio para o início de ensaios clínicos em humanos.	Polpa dentária	G-CSF	Depois da transplantação autóloga de DPSCs com G-CSF em um cão com um dente pulpectomizado, foi regenerado tecido pulpar com inervação e vascularização completamente preenchidas no canal do dente	Os efeitos tróficos combinatórios de DPSCs e G-CSF são de grande utilidade na regeneração do complexo dentino - pulpar demonstrando todos os requisitos para segurança e eficácia para aplicações clínicas

Ferrarrotti et al. (2018) <sup>18</sup>	Humana (15 – alvo e 14- controlo)	Avaliar se as células estaminais da polpa (DPSCs) promovem regeneração periodontal quando são transplantadas com suporte em colagénio em defeitos intraósseos.	Tecidos periodontais (ósseo)	Esponja de colagénio	Os sítios testados exibiram: <ul style="list-style-type: none"> <li>• uma redução na profundidade de sondagem de (4,9 mm para 3,4 mm)</li> <li>• um ganho no CAL (4,5 contra 2,9 mm)</li> <li>• um preenchimento de defeitos ósseos (3,9 contra 1,6 mm)</li> </ul>	A aplicação de DPSCs melhorou significativamente os parâmetros de regeneração periodontal 1 ano após o tratamento
Aimetti et al. (2018) <sup>17</sup>	Humana (11 pacientes)	Avaliar se as células estaminais da polpa (DPSCs) promovem regeneração periodontal quando são transplantadas com suporte em colagénio em defeitos intraósseos	Tecidos periodontais (ósseo)	Esponja de colagénio	Observou-se: <ul style="list-style-type: none"> <li>· Um ganho médio no CAL de <math>4,7 \pm 1,5</math> mm</li> <li>· Uma profundidade de sondagem média de <math>3,2 \pm 0,9</math> mm</li> <li>· Estabilidade da margem gengival observada após 1 ano</li> <li>· (PD &lt; 3 mm) atingida em 63.6% dos sítios experimentais.</li> <li>· Análises mostram preenchimento ósseo na ordem dos <math>3.6 \pm 1.9</math> mm.</li> </ul>	A aplicação de DPSCs melhorou significativamente os parâmetros de regeneração periodontal
Li et al. (2016) <sup>16</sup>	Humana (2 pacientes)	Verificar se células estaminais da polpa derivadas de uma polpa inflamada demonstram potencial regenerativo periodontal	Tecidos periodontais (ósseo)	Fosfato tricálcio	DPSCs-IPs foram capazes de ter o efeito regenerador de novo osso para reparar defeitos periodontais	Foi desenvolvido um padrão que é potencialmente seguro para tratamento clínico periodontal usando DPSCs-IPs humanos autólogos.

Cao et al. (2015) <sup>11</sup>	Porco (20)	O objetivo do presente estudo é investigar o papel do fator de crescimento (HGF) e DPSCs em tecidos periodontais em porcos	Tecidos periodontais (osso alveolar)	Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	O estudo mostrou que injetar HGF-hDPSCs numa modelo animal melhorou significativamente a regeneração óssea periodontal e tecidos moles.	Este estudo indica que as HGF-hDPSCs produziram sob as condições de GMP melhorias significativas a nível periodontal no porco. Este método representa um potencial clínico para a regeneração periodontal
Murakami et al. (2015) <sup>9</sup>	Cães	Comparar as fontes alternativas de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) para a regeneração pulpar usando células estaminais do osso (BM) células estaminais do tecido adiposo (AD) derivadas do mesmo cão foram isoladas usando G-CSF.	Polpa dentária	G-CSF	Maior volume de polpa regenerada e maior densidade de vascularização e inervação foram observadas nas DPSCs comparadas com MBMSC e MADSC depois de transplantadas	Tecidos pulparem foram regenerados em três das células estaminais mesenquimatosas, mas valores superiores de volume e densidade foram observados em MDPCs

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Contextualização do tema

#### 5.1.2 Células estaminais

As células estaminais, também conhecidas por células-tronco, são células com capacidade de autorreplicação, ou seja, tem a capacidade de gerar uma cópia idêntica a si mesma e com potencial de diferenciar-se em vários tecidos<sup>1,20</sup>.

São células indiferenciadas e não especializadas, podem-se multiplicar mantendo-se indiferenciadas por longo período (tanto in vivo quanto in vitro), e diante de estímulos específicos, possuem a capacidade de se diferenciar em células maduras e funcionais de um tecido particular<sup>1,20</sup>. Elas possuem a propriedade de divisão assimétrica, ou seja, originam células precursoras com capacidade restrita de diferenciação a um determinado tecido, ao mesmo tempo em que repõem a população de células-tronco com a produção de células indiferenciadas<sup>20</sup>.

As células estaminais podem ser classificadas em totipotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes<sup>20</sup>.

As células totipotentes são aquelas capazes de diferenciar-se em todos os 216 tecidos que formam o corpo humano incluindo a placenta e anexos embrionários<sup>20</sup>. As células pluripotentes são aquelas capazes de diferenciar-se em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários. As células multipotentes são células indiferenciadas que conseguem originar células especializadas que permitem a reparação e manutenção do tecido onde residem<sup>1,20</sup>. Por último, temos as células oligopotentes e unipotentes. As primeiras podem diferenciar-se em poucos tipos celulares, enquanto as segundas apenas reproduzem uma única linhagem de diferenciação<sup>20</sup>.

Podem também ser classificadas pela sua natureza, como adultas ou embrionárias. As células estaminais embrionárias só podem ser encontradas nos embriões e são classificadas como totipotentes ou pluripotentes, devido ao seu elevado potencial de diferenciação. As células estaminais adultas existem em quase todos os tecidos humanos, são células multipotentes<sup>1,20</sup>.

Dentre os principais tipos de células-tronco adultas identificadas, temos as células-tronco mesenquimatosas, que atuam na homeostase e reparo de vários tecidos do corpo. Estas são células multipotentes capazes de originar células mesodérmicas. As células-tronco mesenquimatosas podem ser extraídas de diversos órgãos e podem ser induzidas a diferenciarem-se em múltiplos tipos celulares<sup>1,20</sup>.

### **5.1.3 Células estaminais dentárias**

Os principais tipos de células estaminais orais são as células estaminais mesenquimatosas (MSCs) e as células estaminais epiteliais<sup>20</sup>. Há uma diferenciação das células estaminais epiteliais em pré-ameloblastos, que após a maturação dão origem a ameloblastos, responsáveis pela formação do esmalte<sup>21</sup>. Posto isto após o dente estar funcional, só as MSCs se mantêm enquanto populações estaminais na cavidade oral<sup>1,21</sup>.

Estas células alojam-se em áreas específicas de cada tecido, formando nichos de células estaminais, que se localizam no mesênquima<sup>21</sup>.

Na cavidade oral existem vários tipos de células estaminais multipotentes, de origem mesenquimatosas<sup>1,21</sup>.

As primeiras células estaminais adultas dentárias a ser identificadas foram as células estaminais da polpa dentária (DPSCs)<sup>1</sup>, posteriormente foram também isoladas MSCs da polpa dentária de dentes decíduos (SHED)<sup>1,6</sup>, sendo que os dentes decíduos são uma ótima fonte de células estaminais devido à sua colheita ser minimamente invasiva<sup>1</sup>, o que diminui as preocupações éticas e legais associadas. Comparativamente às DPSCs, apresentam uma maior capacidade de proliferação<sup>1</sup>. As células estaminais do ligamento periodontal (PDSCs) são outra fonte de MSCs, que podem ser isoladas a partir de dentes extraídos e possuem a capacidade de regenerar tecidos periodontais como cemento, osso alveolar e ligamento periodontal<sup>1,5</sup>. Células estaminais da papila apical (SCAP) foram encontradas ao nível do ápice da raiz de dentes em desenvolvimento<sup>1,4,6</sup>. Em dentes imaturos, quando as raízes estão ainda em desenvolvimento, a papila dentária assume uma posição entre a polpa e o diafragma epitelial, estando aderida ao ápice da raiz, de onde pode ser facilmente colhida. Entre a papila apical e a polpa dentária existe uma zona altamente povoada de células (nicho celular)<sup>1,21</sup>.

As SCAP mostram uma capacidade proliferativa duas a três vezes superior à das DPSCs, e um potencial muito maior para regenerar dentina<sup>1,6</sup>. Por último, temos as células estaminais do folículo dentário (DFSCs) localizadas no folículo dentário, que contém o

dente em desenvolvimento e se diferencia em ligamento periodontal com a capacidade de regenerar tecidos periodontais como ligamento periodontal e osso alveolar<sup>1,6</sup>.

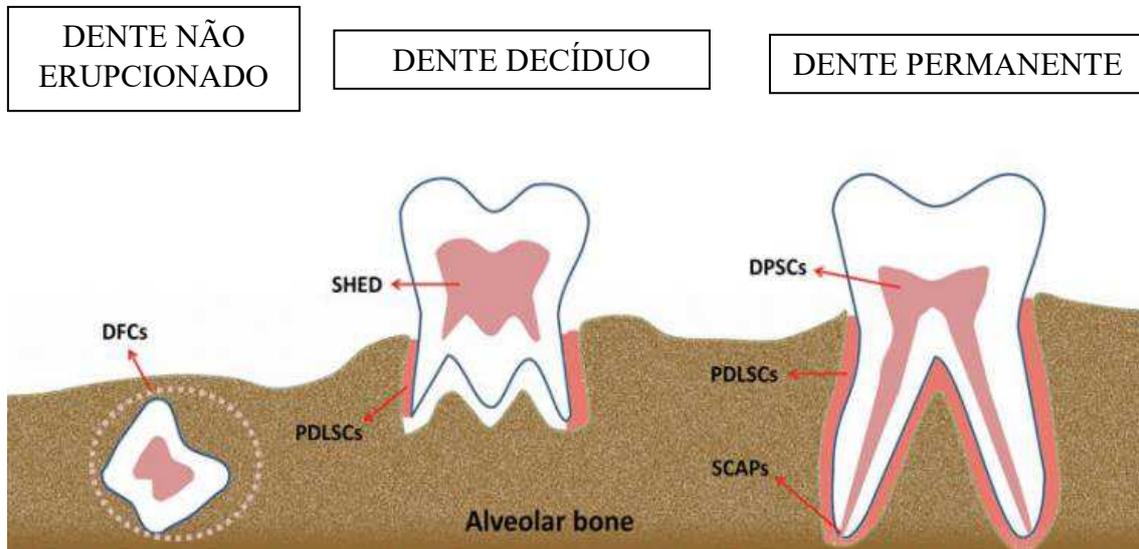


Fig. 3. Representação da localização das células estaminais dentárias<sup>23</sup>

#### 5.1.4 Células estaminais da polpa dentária (DPSC)

A polpa dentária é um tecido oral não mineralizado composto de tecido conjuntivo laxo, componentes linfáticos vasculares e elementos nervosos que ocupam a câmara pulpar central de cada dente. A polpa dentária contém diferentes tipos de células, como células endoteliais, neurónios, fibroblastos, osteoblastos / osteoclastos e odontoblastos<sup>22</sup>.

As DPSCs podem ser obtidas através da polpa de dentes definitivos e decíduos, especialmente através de terceiros molares impactados, de dentes decíduos exfoliados e também de dentes supranumerários<sup>22</sup>.

As hDPSCs são células estaminais derivadas da ectoderme, originárias de células migrantes da crista neural e possuem propriedades de células-tronco mesenquimatosas, como morfologia semelhante a fibroblastos, aderência a uma superfície plástica e formam colônias quando cultivadas *in vitro*<sup>7</sup>.

Além disso, as DPSCs possuem a capacidade de diferenciação de várias linhagens. Essas células podem se diferenciar em condrócitos, adipócitos, odontoblastos e células do tipo neural sob condições apropriadas de indução<sup>1</sup>.

As células estaminais da polpa dentária também expressam marcadores mesenquimatosos, como: CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD146 e não expressa marcadores hematopoiéticos: CD 34, CD45, CD71<sup>22</sup>.

### 5.1.5 Métodos de isolamento

Um dos passos mais importantes ao usar células estaminais mesenquimatosas (MSCs) é a sua preparação prévia antes da administração deste tipo de células. O primeiro passo para esta preparação é o isolamento de MSCs dos seus tecidos originais<sup>23</sup>.

Para o isolamento de DPSCs a cultura de explantes e o método de digestão enzimática têm sido usados e comparados, no qual, os resultados indicam que os dois métodos são eficientes para produzir populações de células estaminais capazes de formação de colónias. Não havendo assim diferenças significativas entre os dois métodos de isolamento no que concerne à taxa de proliferação e formação de colónias<sup>23</sup>.

Nos estudos analisados a maioria dos métodos utilizados para o isolamento de células estaminais foi o método de digestão enzimática, sendo também o método de eleição para o isolamento de células estaminais dentárias<sup>23</sup>.

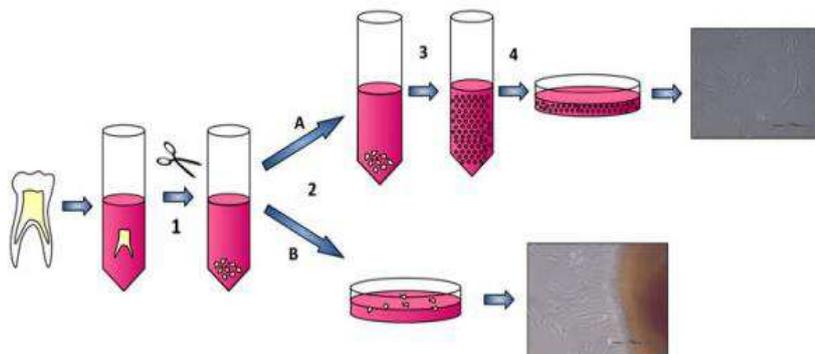


Figura 4. Ilustração dos métodos de isolamento de DPSCs.<sup>23</sup>

O tecido pulpar é removido da câmara pulpar, lavado com meio de cultura e cortado em pedaços de 1 mm<sup>3</sup> (1).

Em seguida (2): digestão enzimática (A) ou método de explante (B).

No método de digestão enzimática (A), os fragmentos de tecido são incubados com uma solução de colagenase / dispase por 1 hora a 37 ° C (3).

Esta solução é centrifugada a 300 g e passada através de um filtro de células e a suspensão de célula única obtida é dividida entre 6 placas (4). Para o método do explante (B), os fragmentos de tecido também são divididos entre 6 placas. Após 48–72 h, fragmentos de tecido ficam aderidos à superfície plástica e as células-tronco são capazes de crescer<sup>23</sup>.

Independentemente do método utilizado todas as culturas celulares são mantidas a 37 ° C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura é trocado a cada 2-3 dias e as culturas celulares são monitoradas regularmente. Ao atingir 70% a 80% de confluência, as células são colhidas usando Trypsin / EDTA (Sigma) a 0,05%<sup>24</sup>.

Tendo cada célula marcadores específicos, recorre-se depois da digestão enzimática a técnicas de separação de células por citometria de fluxo associada ao uso de biomarcadores específicos, que permitem isolar células estaminais da polpa em regeneração tecidual dentária por ativação fluorescente (FACS)<sup>23</sup>, ou por activação magnética (MACS)<sup>24</sup>. A citometria de fluxo por activação fluorescente permite separar misturas heterogéneas de células em dois ou mais recipientes, uma célula de cada vez, através da dispersão de luz fluorescente e específica de cada célula, num processo rápido e objectivo que permite não só separar fisicamente as células estaminais como quantificá-las<sup>24</sup>.

### **5.1.6 Engenharia tecidual**

Como primeira etapa temos o isolamento, cujo objetivo é quebrar as ligações das células estaminais à matriz extracelular através de proteases como a colagenase<sup>23</sup>, procedendo-se depois à colocação destas células em placas de cultura para se aderirem a este substrato, dando assim origem à formação de colónias de fibroblastos (CFU)<sup>23</sup>.

As DPSCs formam CFU com tamanhos, densidades e morfologia diferentes, o que sugere que cada célula pode ter um potencial de proliferação e diferenciação distinto. Alguns marcadores específicos das células estaminais não são expressos de forma uniforme em todas as culturas de DPSC, sugerindo que esta população celular é heterogénea<sup>23</sup>.

Recorre-se à citometria de fluxo associada ao uso de biomarcadores específicos que permite isolar e quantificar as células estaminais<sup>23</sup>.

A caracterização das células estaminais mesenquimatosas é feita através dos biomarcadores específicos e da capacidade de diferenciação em linhagens mesodérmicas no qual são confirmadas sob condições específicas de diferenciação osteogénica, condrogénica e adipogénica<sup>23-25</sup>. Sendo assim estes os principais critérios para o uso clínico de DPSCs.

A cultura celular permite que um único tipo de células de uma população homogénea possa crescer em condições controladas que permitem o processo de clonagem. As células estaminais dentárias (DSC) necessitam de nutrientes específicos, de placas com coberturas especiais e de estar a uma temperatura de 37°C, fazendo com que a cultura se pareça o mais possível ao ambiente natural, para que o processo de cultivo seja bem-sucedido. Para reduzir uma possível contaminação bacteriana ou fungicida, acrescentam-se também antibióticos ao meio de cultura<sup>25</sup>.

As DPSCs devem ser cultivadas e manipuladas *in vitro* para se ter a quantidade suficiente para a transplantação para um modelo vivo<sup>25</sup>.

Uma única célula estaminal pode originar colónias celulares, um conjunto de 29 milhares de células idênticas até 14 dias, de acordo com a sua taxa de crescimento<sup>25</sup>.

Os fatores de crescimento são necessários para a proliferação celular e diferenciação. Na maioria dos estudos para a regeneração pulpar foram utilizados como fator de crescimento/fator migratório G-CSF (fator estimulador de colónias e granulócitos), tendo efeitos anti-inflamatórios, anti-apoptóticos nas DPSCs transplantadas, e faz com que as células transplantadas fiquem no canal radicular evitando a sua dispersão para os tecidos circundantes como os tecidos periodontais apicais e osso alveolar.

A transplantação de MDPSCs associados a G-CSF produziram um volume significativamente maior de tecido pulpar regenerado em comparação com o transplante de G-CSF sozinho ou MDPSCs sozinho<sup>8,22</sup>.

Em muitos dos estudos analisados os fatores de crescimentos foram associados a matrizes. As matrizes ou *scaffolds* tem como principal função suportar a estrutura biomecânica das células estaminais nele inseridas, juntamente com proteínas bioativas

estimuladoras da proliferação, migração e diferenciação celulares, tentam recriar um microambiente tridimensional semelhante ao dos tecidos naturais<sup>26</sup>.

Dando destaque às matrizes mais utilizadas nos estudos analisados, vemos que as esponjas de colagénio reabsorvíveis têm um papel relevante na regeneração periodontal. As matrizes de colágeno suportam a proliferação e diferenciação de células estaminais nas primeiras semanas e estimulam a formação de tecidos calcificados<sup>27</sup>. Além das propriedades já referidas, as matrizes de colagénio fornecem uma estabilidade que é um fator chave para a diferenciação celular tendo uma importância ainda maior em tecidos mineralizados como o osso alveolar sendo também este biomaterial biologicamente inerte, radiolúcido, inativo em termos de regeneração periodontal e com uma alta taxa de reabsorção<sup>27</sup>.

Como já referido, o colagénio pode ser combinado com fatores de crescimento como TGF- $\beta$ 1, BMP4, FGF2. Evidências sugerem que os fatores locais modulam as células estaminais mesenquimatosas para promover regeneração tecidual<sup>27</sup>.

## 5.2 ANÁLISE DE ESTUDOS

Começando pela análise dos estudos que abordam a regeneração pulpar usando DPSCs foi possível observar que em todos os 6 estudos analisados para a regeneração pulpar verificou-se uma regeneração parcial ou total de tecido pulpar em pacientes com dentes com necrose pulpar, pulpites irreversíveis e testes em cães com resultados satisfatórios comprovando assim a sua eficácia e segurança na transplantação de DPSCs sendo que 3 estudos foram realizados na espécie humana e 3 em animais que serviram para posterior uso em humanos depois de estabelecida segurança e eficácia em humanos. As hDPSCs já foram usadas com sucesso na regeneração pulpar em estudos animais<sup>8-10</sup>. Os resultados dos estudos em humanos não mostraram complicações relacionadas à transplantação de DPSCs acabando por ter os mesmos resultados de estudos pré-clínicos realizados em animais.

A tríade de células estaminais, fatores de crescimento e *scaffolds* são essenciais para uma ótima regeneração endodôntica<sup>26</sup>. Na maioria dos casos dos estudos analisados foram utilizadas como fatores de crescimento G-CSF (Fator estimulador de colónias de granulócitos) em que estudos prévios demonstraram que as G-CSF reduzem a apoptose

das DPSCs transplantadas e impedia a sua dispersão para tecidos circundantes do canal radicular. As transplantações de DPSCs associadas com G-CSF produziram um volume maior de tecido pulpar regenerado e um aumento de neuroregeneração comparada com a transplantação de G-CSF sozinhas ou de DPSCs sem nenhuma associação<sup>8-10,14</sup>. Na grande maioria dos estudos as DPSCs mostraram uma alta viabilidade celular com tendência para expressar marcadores de células mesenquimatosas como o CD29, CD44, CD73 CD105 e CD31<sup>8-19</sup> com alto poder regenerativo sendo que os tecidos da polpa dentária possuíam um volume maior e menor tendência para se mineralizar depois da transplantação autóloga de células com marcadores CD31 e CD105 em canais de dentes sem polpa de cães<sup>8-10</sup>.

Como limitação dos estudos analisados, foi possível observar que possuíam no geral uma amostra de indivíduos reduzida, tendo em todos os estudos havido regeneração pulpar.

Em contrapartida, dos 6 estudos que envolviam a regeneração de tecidos periodontais, um estudo que continha uma amostra de 30 indivíduos foi incapaz de mostrar que a aplicação autóloga de DPSCs provocasse a redução da reabsorção óssea após extração<sup>16</sup>, sendo que nos restantes 5 estudos a aplicação de DPSCs melhorou significativamente os parâmetros de regeneração periodontal. Na maioria dos estudos analisados para a regeneração periodontal observou-se que foram associadas DPSCs em matrizes de colágenos que segundo outro estudo tem a capacidade de reparar com sucesso defeitos ósseos<sup>27</sup>.

Um aspeto importante a ter em conta aquando da interpretação dos resultados é a verificação da vitalidade e a integridade do dente visto que há uma evidencia preliminar em que os dentes comprometidos em uma periodontite agressiva poderão conter células estaminais com poucas propriedades regenerativas<sup>28</sup>, contudo houve um estudo em que células estaminais derivadas da polpa dentária inflamada [DPSCs-IPs] foram capazes de ter o efeito regenerador de novo osso para reparar defeitos periodontais<sup>16</sup>, tendo este estudo uma limitação pois continha uma amostra de apenas 2 indivíduos. Embora estudos prévios mostrem que as células estaminais derivadas de polpas dentárias inflamadas possuem menos propriedades regenerativas<sup>28</sup>, ainda retêm algum potencial para a regeneração tecidual podendo ser uma limitação na aplicabilidade deste procedimento.

O mecanismo no qual se rege a diferenciação e posterior regeneração de tecidos periodontais é que a maioria das DPSCs mostraram uma alta viabilidade celular com

tendência para expressar marcadores de células mesenquimatosas como o STRO-1, CD44 e o CD90<sup>11,15-19</sup> com capacidades de diferenciação em células tipo adipócitos, condrócitos e osteócitos *in vitro*<sup>21</sup>, também demonstraram que são altamente positivas para FLK1 e CD34, marcadores das células estaminais do estroma. As DPSCs possuem uma percentagem de células progenitoras de 77%, quantidade esta que permite realizar experiências *in vivo*<sup>21</sup>, razão pela qual a aplicação tanto autóloga como alógena de DPSCs melhorou significativamente os parâmetros de regeneração periodontal. Apenas um demonstrou incapacidade de encontrar diferenças significativas na extensão de reparação óssea e densidade após a incorporação de DPSCs em alvéolos após a extração de 3<sup>o</sup>s molares<sup>15</sup>, tendo os defeitos ósseos em todos os estudos capacidades de autorregeneração limitadas. Como estudo precedente que tinha como objetivo estabelecer a segurança e eficácia em humanos, foi analisado um estudo realizado em animais (porcos), que apresentou resultados positivos em termos de regeneração periodontal comprovados clinicamente, radiograficamente e histologicamente<sup>11</sup>.

Como limitações dos estudos que tinham como objetivo a regeneração de tecidos periodontais conseguimos observar que o tamanho da amostra da maioria dos estudos era pequena e não foram efetuadas avaliações histológicas em estudos com humanos, não podendo ser feita nenhuma afirmação definitiva em relação aos resultados, embora investigações prévias revelem que as análises radiográficas são adequadas para verificar as alterações ósseas no qual são parâmetros válidos para demonstrar clinicamente a eficácia regenerativa.

Para a regeneração pulpar em um estudo efetuado em cães que tinha como objetivo comparar as fontes alternativas de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) para a regeneração pulpar, tais como as células estaminais do osso (MBMSC) e as células estaminais do tecido adiposo (MADSC) derivadas do mesmo cão determinou que houve um maior volume de polpa regenerada e maior densidade de vascularização e inervação usando DPSCs comparadas com MBMSC e MADSC depois de transplantadas<sup>25</sup>.

Contudo, para a regeneração periodontal há estudos que indicam que existem outras células estaminais como as células estaminais do ligamento periodontal (PDLC) que obtiveram melhores resultados que as DPSCs<sup>29</sup>.

## 6. CONCLUSÃO

Esta revisão procurou obter respostas quanto à viabilidade e taxa de sucesso de dois tecidos (pulpar e periodontal) depois de implantadas as DPSCs.

Sendo assim:

-Vemos que nos estudos para a regeneração pulpar houve regeneração parcial ou total dos tecidos;

- Nos estudos para a regeneração periodontal houve um estudo que foi incapaz de mostrar resultados significativos na formação óssea;

-Existência de fontes celulares alternativas (PDLSCs) com igual ou melhor prognóstico do que as (DPSCs) quanto à regeneração periodontal;

Sendo assim é notória uma ligeira predisposição destas células para a regeneração pulpar em relação à regeneração periodontal olhando apenas para estes estudos, sendo que estudos com uma amostra maior de indivíduos são necessários para que estas técnicas de regeneração sejam uma realidade e com protocolos bem definidos apesar de se preverem dispendiosas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estrela C, Alencar, de Kitten G, Vencio F, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal* (2011); 22(2):91–98.
2. Morszeck C, Huang J, Shi S. Stem and Progenitor Cells of Dental and Gingival Tissue Origin. *Stem Cells in Craniofacial Development and Regeneration*.2013; 285–302.
3. Tran B, Doan N. Human dental pulp stem cells cultured onto dentin derived scaffold can regenerate dentin-like tissue in vivo. *Cell and Tissue Banking*. 2018; 16(4):559–568.
4. A. Bakopoulou, G. Leyhausen, J. Volk; A. Tsiftoglou, P. Garefis, P. Koidis, W. Geurtsen Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). 2011; 56(7): 709–721.
5. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y. Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Frontiers of medicine*. 2018

6. Demarco F, Conde M, Cavalcanti N, Casagrande L, Sakai T, Nör E. Dental pulp tissue engineering. *Brazilian Dental Journal*. 2011;22(1): 3–13.
7. Ashri N, Ajlan S, Aldahmash A. Dental pulp stem cells. *Biology and use for periodontal tissue engineering*. *Saudi Medical Journal*. 2015; 36(12): 1391–1399.
8. Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Nakashima M. A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2013; 2(7): 521–533
9. Murakami M, Hayashi Y, Iohara K, Osako Y, Hirose Y, Nakashima M. Trophic effects and regenerative potential of mobilized mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue as alternative cell sources for pulp/dentin regeneration. *Cell Transplant*. 2015; 24(9):1753–1765.
10. Nakashima M, Iohara K. Mobilized Dental Pulp Stem Cells for Pulp Regeneration: Initiation of Clinical Trial. *Journal of Endodontics*. 2014; 40(4): 26–32.
11. Cao Y, Liu Z, Xie Y, Hu J, Wang H, Fan Z, Wang S. Adenovirus-mediated transfer of hepatocyte growth factor gene to human dental pulp stem cells under good manufacturing practice improves their potential for periodontal regeneration in swine. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015; 6(1).
12. Xuan K, Li B, Guo H, Sun W, Kou X, He X, Jin Y. Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Science Translational Medicine*. 2018; 10(455).
13. Meza G, Urrejola D, Saint Jean N, Inostroza C, López V, Khoury M, Brizuela C. Personalized Cell Therapy for Pulpitis Using Autologous Dental Pulp Stem Cells and Leukocyte Platelet-rich Fibrin: A Case Report. *Journal of Endodontics*. 2019; 45(2): 144–149.
14. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato, Y, Arijji Y, Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017; 8(1).
15. Barbier L, Ramos E, Mendiola J, Rodriguez O, Santamaria G, Santamaria J, Arteagoitia I. Autologous dental pulp mesenchymal stem cells for inferior third molar post-extraction socket healing: A split-mouth randomised clinical trial. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2018; 0–0

16. Li Y, Zhao S, Nan X, Wei H, Shi J, Li A, Gou J. Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem Cell Research & Therapy*. 2016; 7(1).
17. Aimetti M, Ferrarotti F, Gamba M, Giraudi M, Romano F. Regenerative Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Autologous Dental Pulp Stem Cells: A 1-Year Follow-Up Case Series. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2018;38(1): 51–58.
18. Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, Quirico A, Giraudi M, Audagna M, Aimetti M. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45(7): 841–850.
19. Hernández-Monjaraz B, Santiago-Osorio E, Ledesma-Martínez E, Alcauter-Zavala A, Mendoza-Núñez VM. Retrieval of a periodontally compromised tooth by allogeneic grafting of mesenchymal stem cells from dental pulp: A case report. *Journal of International Medical Research*. 2018;46(7):2983–2993.
20. Kolios G, Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*. 2013; 85(1): 3–10.
21. Ranganathan K, Lakshminarayanan V. Stem cells of the dental pulp. *Indian Journal Dental Research*. 2012;23(4):558
22. Shuai Y, Ma Y, Guo T, Zhang L, Yang R, Qi M, Jin Y. Dental Stem Cells and Tooth Regeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2018.
23. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, Vanormelingen J, Martens W, Struys T, Bronckaers A. Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell and Tissue Research*. 2013; 353(1):65–78.
24. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, Laino L. Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*. 2014; 42(7):761–768.
25. Al-Habib M, Huang J, George T. Dental Mesenchymal Stem Cells: Dental Pulp Stem Cells, Periodontal Ligament Stem Cells, Apical Papilla Stem Cells, and Primary Teeth Stem Cells—Isolation, Characterization, and Expansion for Tissue Engineering. *Odontogenesis*. 2019; 59–76
26. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti B. N, Nör J. E. Tissue engineering: From research to dental clinics. *Dental Materials*, 2012; 28(4): 341–348.

27. Liu Z, Yin X, Ye Q, He W, Ge M, Zhou X, Zou S. Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold. *Journal of Biomaterials Applications*. 2016; 31(1):121–131
28. Sun HH, Chen B, Zhu QL, et al. Investigation of dental pulp stem cells isolated from discarded human teeth extracted due to aggressive periodontitis. *Biomaterials*. 2014; 35(35):9459–72.
29. Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés A. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2019;11(4):373-381.