



Paulo Jorge Rocha da Palma

# Apexificação e Revascularização Pulpar em Dentes Permanentes Imaturos

Estudo experimental *in vivo*

Dissertação de Doutoramento em Ciências da Saúde,  
ramo de Medicina Dentária, especialidade de Dentisteria Operatória (Endodôncia),  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Junho de 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Dissertação de candidatura ao grau de doutor  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

A Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra não aceita qualquer responsabilidade em relação à doutrina e a forma desta dissertação (Regimento da Faculdade de Medicina de Coimbra, 1931, Art. 108, & único).



**Orientadores:**

Professor Doutor João Miguel Marques dos Santos

Professora Doutora Maria Helena Figueiredo

Professor Doutor João Carlos Tomás Ramos



À Catarina, Manuel e Maria Rita



Aos meus Pais, António e Maria  
e ao meu irmão Filipe



## **AGRADECIMENTOS**

Esta dissertação é o culminar de um longo e profícuo percurso, onde as dificuldades e as exultações caminharam lado a lado, ora enredando o seu percurso, ora coagindo o intuito de desenvolver um contributo para a ciência, onde o resultado final, patente nas páginas que se seguem, reflete a contribuição de várias pessoas a quem gostaria de exprimir aqui o mais profundo reconhecimento, pela dedicação, generosidade e tempo despendido.

Ao Professor Doutor João Miguel dos Santos, agradeço os importantes ensinamentos que me deu ao longo de todo este percurso, desde a sua conceção até à concretização final. Agradeço ainda o privilégio da sua amizade e da honra que me concedeu ao aceitar ser orientador da presente dissertação. Reconheço com gratidão o valor dos seus preciosos conhecimentos científicos, bem como o incentivo na realização desta tese.

À Professora Doutora Maria Helena Figueiredo, pela sua disponibilidade permanente e conhecimentos, empenho total no desenvolvimento desta tese revelando-se crucial, sendo também incansável o apoio e a amizade que me dedicou, fazendo-me acreditar que a realização deste trabalho era possível. Agradeço também os enormes contributos que me deu ao longo da realização deste trabalho, fomentando sempre o rigor e o raciocínio científico. Agradeço-lhe a disponibilidade para discutir, partilhar ideias e o cuidado depositado em todas as correções e sugestões para que o produto final tivesse a qualidade desejada.

Ao Professor Doutor João Carlos Ramos, pela disponibilidade, sabedoria e amizade que foram uma constante ajuda e exemplo ao longo da minha, ainda curta carreira académica. Agradeço igualmente todo o incentivo e orientação científica, que só me fez crescer ao longo desta trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Guerra, expresso os mais sinceros agradecimentos pelo contributo ao longo da minha vida académica e profissional. Reconheço a sua dedicação às causas que abraça e a sua capacidade de liderança, bem como a amizade inestimável que me tem dispensado. Agradeço também a forma como, nos momentos chave, me motivou, de forma entusiasmada e genuína, perante cada obstáculo ou sucesso alcançado.

Ao Professor Doutor João Luís Maló de Abreu, com quem tenho tido o grato privilégio de privar e que me apoiou com vigor para a frequência deste doutoramento. Espero continuar a merecer a sua confiança.

À Professora Doutora Margarida Figueiredo, pela disponibilização dos materiais de experiência, pelos conhecimentos científicos destes materiais e pela disponibilização de bibliografia de suporte.

À Professora Doutora Paula Ferreira, agradeço o desenvolvimento das matrizes e o seu entusiasmo sempre presente, assim como à sua equipa de colaboradores.

Ao Professor Doutor Ilídio Correia, pelos teste de biocompatibilidade.

Ao Professor Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas e sua equipa pelo profissionalismo e empenho no desenvolvimento em todos os procedimentos da fase experimental relacionados com o modelo animal realizado no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real.

Ao Professor Doutor Miguel Patrício e Professor Doutor Francisco Caramelo, pela disponibilidade e apoio incondicional na realização e compreensão da análise estatística.

À Dr.<sup>a</sup> Catarina Chaves, pela análise microbiológica e controlo de esterilidade dos materiais utilizados, bem como pela atenta revisão que efetuou.

À D.<sup>a</sup> Cláudia Brites, inquestionavelmente uma mais valia, imprimindo rigor e primor nas tarefas de acompanhamento das cirurgias, na recolha e organização dos respetivos dados e no processamento dos tecidos.

Ao Dr. Rui Isidro Falacho, pelo seu incansável empenho em todas fases de desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, entusiasmo e incentivo com que sempre me presenteou.

Ao Dr. Jan Berghmans, pela amabilidade e prontidão com que me disponibilizou o caso clínico de revascularização pulpar.

Ao Dr. Frederic Barnett, pela disponibilidade em ajudar na pesquisa bibliográfica.

Ao Dr. Umberto Abreu, que me auxiliou na fase de procedimento experimental deste trabalho.

Aos demais elementos que constituem o corpo docente de disciplina de Endodôncia, Professor Doutor Manuel Marques Ferreira, Dr.<sup>a</sup> Diana Sequeira, Dr.<sup>a</sup> Siri Paulo e Dr.<sup>a</sup> Patrícia Diogo.

À Engenheira Gabriela Martins pelos dados científicos disponibilizados.

Ao Dr. João Martins e Dr.<sup>a</sup> Inês Martins a colaboração na compilação dos artigos.

A todos os colegas e funcionários que trabalham ou trabalharam no Departamento de Medicina e da Faculdade de Medicina, pelo entusiasmo e incentivo ao meu trabalho.

As últimas palavras são para aqueles que contribuíram para o meu trabalho, não diretamente mas de forma indireta, ao estarem presentes e apoiarem a sua realização: a minha família e os meus amigos. Realizar esta tese não teria o mesmo sentido sem eles.

Aos meus Avós (*in memoriam*), pelos ensinamentos e histórias da escola da vida.

Aos meus Pais António e Maria e irmão Filipe por todo o apoio, pelos valores que me transmitiram e por me terem ajudado a ser o que sou hoje e ao estímulo constante na concretização deste e de outros objetivos.

Ao Daniel e à Marta pela incansável disponibilidade e apoio logístico.

À Catarina e aos meus filhos Manuel e Maria Rita, agradeço a infindável paciência pelo tempo que arrebatei aos meus para poder concretizar este trabalho. Agradeço ainda pelo inabalável apoio, pelo conforto e incentivo, pela generosidade dos sorrisos com que sempre me presentearam e por serem uma fonte firme de inspiração.



# Sumário

---

## Agradecimentos

### I – Introdução

1. Justificação do tema
2. Problemática do ápice imaturo
3. Odontogénese
4. Engenharia de tecidos em endodontia regenerativa

### II – Estudo experimental em modelo animal

1. Objetivos
2. Materiais e Métodos
3. Resultados
4. Discussão
5. Considerações finais e perspetivas futuras
6. Conclusões

### III – Resumo

### IV – Summary

### V – Bibliografia

### VI – Anexos

### VIII – Índice



## **I. Introdução**

---



## I. Justificação do tema

A interrupção do desenvolvimento radicular causada por trauma ou doença pulpar representa um desafio tanto endodôntico como restaurador. A necrose pulpar de um dente permanente com desenvolvimento radicular incompleto leva à paragem da formação de dentina radicular, condicionando uma parede canalar pouco espessa e funcionalmente comprometida<sup>1</sup>. Além disso, a presença de um ápice aberto dificulta as técnicas de preparação e obturação canalar, bem como impossibilita a obtenção de um receptáculo apical capaz de conter os materiais obturadores no interior do canal radicular, sem extravasamento para os tecidos periapicais<sup>2</sup>.

Nestas circunstâncias clínicas, é geralmente recomendado um procedimento de apexificação com indução de uma barreira apical capaz reter os materiais obturadores e impedir o seu contacto com os tecidos periapicais<sup>3-7</sup>.

Apesar desta técnica apresentar uma considerável eficácia na preservação do dente, mostra algumas limitações nomeadamente no facto de restringir ou mesmo impedir o posterior crescimento e maturação radicular. Com efeito, apesar de possibilitar a formação de uma barreira apical dura, mantém, no entanto, as paredes dentinárias muito finas e frágeis o que torna o dente muito suscetível à fratura. Por este motivo, segundo alguns autores, deve passar a ser encarado como um tratamento de último recurso<sup>8</sup>.

Assim, e uma vez que os procedimentos de apexificação limitam o desenvolvimento da raiz, mantinha-se a expectativa de encontrar um mecanismo que possibilitasse o restabelecimento da vitalidade do espaço pulpar, bem como a continuação do processo de evolução radicular e encerramento apical.

Foi com este propósito que começaram a surgir novos procedimentos que demonstraram uma reparação tecidual efetiva no espaço canalar de dentes permanentes, com rizogénese incompleta e diagnóstico de necrose pulpar e periodontite apical, possibilitando o reforço das paredes radiculares e por vezes a continuação do desenvolvimento radicular, abrindo assim novas perspectivas terapêu-

ticas neste campo<sup>9-19</sup>. Estas metodologias são frequentemente denominadas por procedimentos de revascularização, revitalização ou regeneração pulpar<sup>20,21</sup>, estando o seu sucesso maioritariamente associado à presença de um ápice aberto e de uma raiz curta<sup>22</sup>. A formação e crescimento de novos tecidos e novos vasos sanguíneos no espaço canal teria, nesta situação, uma maior facilidade de acesso, permitindo o desenvolvimento de um novo suprimento vascular e celular<sup>23</sup>. Para além disso, está também demonstrado que os dentes com ápice imaturo possuem uma fonte de células estaminais, localizadas na papila apical, que lhes confere uma grande probabilidade de recuperação e regeneração<sup>24,25</sup>.

Não serão alheios a estes resultados encorajadores os recentes e substanciais avanços verificados no campo da antissepsia canal, na prevenção da microinfiltração coronária e na área da engenharia de tecidos, tornando atualmente possível a criação de microambientes favoráveis a uma regeneração do tecido pulpar<sup>20,21</sup>.

As estratégias subjacentes ao aparecimento de novos tecidos no espaço pulpar são referidas como procedimentos de endodontia regenerativa<sup>26-29</sup>. A endodontia regenerativa constitui, pois, uma forma ideal de terapia visando substituir tecidos pulpares afetados e/ou necróticos<sup>30-32</sup>. Estas estratégias terapêuticas assentam tradicionalmente nos mesmos princípios da engenharia de tecidos, que incluem entre outros, a utilização de matrizes<sup>33</sup>. Na verdade, as matrizes ao constituírem uma estrutura tridimensional de suporte são frequentemente aplicadas de forma a proporcionar condições biológicas e físico-químicas apropriadas para apoiar e guiar os mecanismos de crescimento e diferenciação celular<sup>34,35</sup>. De facto, a aplicação de matrizes com o objetivo de auxiliar a regeneração endógena do tecido pulpar e/ou facilitar a formação de dentina reparadora apresenta-se hoje em dia como um elemento de primordial importância<sup>27,36,37</sup>.

É neste contexto que se situa o trabalho experimental aqui apresentado. Com efeito, o objetivo principal deste estudo consiste numa avaliação *in vivo* do desempenho biológico e potencial regenerativo de diferentes matrizes (ácido hialurónico/quitosano e pectina/quitosano) colocadas no espaço canal de dentes imaturos com necrose pulpar e periodontite apical, tendo por base análises radiográficas, histológicas, imunocitoquímicas e histomorfométricas.

## **1.2. Planificação e apresentação do trabalho**

Esta dissertação encontra-se organizada em três partes distintas. Na primeira parte, constituindo um capítulo de introdução, após *justificação do tema* escolhido e apresentado o objetivo geral do trabalho, procede-se a uma breve exposição sobre a *problemática do ápice imaturo* visando contextualizar as estratégias terapêuticas possíveis em dentes permanentes com rizogénese incompleta.

Considerando que o conhecimento dos princípios da embriogénese dentária, bem como os elementos básicos subjacentes aos mecanismos da engenharia de tecidos são fundamentais para a compreensão e desenvolvimento dos métodos de reconstrução e regeneração do complexo-pulpo

dentinário, pareceu-nos pertinente desenvolver algumas considerações básicas sobre certos aspetos morfofuncionais da *odontogénese*, assim como sobre a *engenharia de tecidos em endodontia regenerativa*.

A segunda parte que constitui a essência desta tese compreende um estudo experimental, em modelo animal, de diferentes procedimentos, que englobam um processo de apexificação com MTA e um mecanismo de revascularização pulpar. Depois de enunciados os *objetivos* específicos do trabalho, procede-se a uma descrição pormenorizada dos *materiais e métodos*, que inclui os materiais utilizados e as metodologias aplicadas, bem como apresentação dos *resultados*. Por se tratar de um trabalho essencialmente de índole histológica e como a microscopia é uma ciência de imagens, não quisemos deixar de documentar este estudo com numerosas imagens microfotográficas do material em análise. Finalmente, apresenta-se uma *discussão* e interpretação global dos resultados. Neste capítulo, e dada a especificidade e variedade dos tecidos encontrados no espaço canal, optámos por apresentar algumas considerações acerca de cada um deles individualmente, bem como algumas tentativas de interpretação da sua presença ectópica. Por último, são apresentadas algumas *considerações finais e perspectivas futuras* de trabalho alicerçadas em questões que ficaram em aberto e enunciadas as principais *conclusões*.

A última parte engloba um *resumo* de todo o trabalho apresentado bem como toda a *bibliografia* consultada e ainda um conjunto de anotações, que incluem diversas tabelas apresentadas no final sob a forma de *anexos*.

Todo o registo iconográfico apresentado neste estudo foi por nós efetuado, sendo da nossa inteira responsabilidade, estando as exceções devidamente assinaladas.

## **2. Problemática do ápice imaturo - algumas considerações**

Durante o processo de desenvolvimento dos dentes permanentes é bastante comum a ocorrência de situações de cárie ou de traumatismos, que podem alterar ou mesmo danificar o tecido pulpar e prejudicar a fisiologia do complexo pulpodentinário e o normal desenvolvimento radicular. Se por um lado, considerarmos que os dentes permanentes completamente desenvolvidos podem sobreviver toda a vida sem o suporte de uma polpa vital, já no caso de dentes permanentes imaturos, o prognóstico desta situação apresenta-se bastante mais reservado.

De qualquer modo, a vitalidade da polpa é de extrema importância em qualquer dente, uma vez que exerce funções nutritivas, sensitivas, defensivas e reparadoras. Deste modo, para além de responsável pela formação, manutenção e suporte da matriz dentinária, a polpa dentária constitui ao mesmo tempo um importante sensor biológico permitindo detectar e responder com eficácia a estímulos agressores. Na verdade, um dente vital apresenta sempre, quando comparado com dentes com situações de necrose pulpar, uma maior eficiência nos seus mecanismos de defesa e resistência a agressões e a fraturas<sup>38</sup>. Todos estes aspetos são ainda mais relevantes em dentes imaturos.

A perda prematura de uma polpa funcional em dentes imaturos resultará numa acentuada fragilidade decorrente de uma relação coroa/raiz desfavorável, paredes dentinárias finas, amplo

espaço canalar e um ápice radicular aberto. Esta situação anatômica e funcional apresenta uma grande predisposição para fraturas, representando ainda um enorme desafio na aplicação e eficácia dos tratamentos endodônticos, quando estes se revelam necessários<sup>39</sup>. Neste cenário, um dos principais objetivos do clínico será a máxima preservação e sobrevivência do tecido pulpar, de modo a assegurar o completo e correto desenvolvimento e maturação do dente. Assim, de acordo com as novas *guidelines* da *International Association of Dental Traumatology (IADT)*, para o tratamento de lesões dentárias traumáticas, todo o esforço deve ser feito para preservar a vitalidade dos dentes imaturos até que a sua maturação radicular ocorra. Esta preocupação é perfeitamente justificável, não só pelo impacto estético, funcional e psicossocial que a perda precoce de um dente possa implicar, como ainda pelas dificuldades técnicas associadas a possíveis tratamentos endodônticos<sup>40</sup>.

Com a ocorrência de traumatismos, incidência de cáries e procedimentos restauradores, tanto a polpa como os tecidos periapicais poderão ser afetados, sabendo-se que as agressões pulpares podem originar o aparecimento de uma polpa inflamada, infetada e até mesmo parcial ou totalmente necrosada.

Perante uma situação clínica de um dente imaturo lesado mas vital, contendo algum tecido pulpar saudável na sua porção apical, a apexogénese constitui o tratamento mais vezes recomendado, visando estimular a continuação da formação fisiológica da raiz, até ao seu completo desenvolvimento. De facto, a manutenção de uma polpa vital permitirá o crescimento e maturação radicular. No caso de um dente não vital, com polpa necrosada, o tratamento realizado tem como objetivo a criação/ indução de uma barreira apical, ou seja, um procedimento de apexificação<sup>7,41,42</sup>.

Em todos estes casos, é de fundamental importância a obtenção de uma correta e completa história clínica, bem como o recurso a testes de sensibilidade/vitalidade pulpar, para que o diagnóstico seja o mais preciso possível, de modo a sustentar e orientar a opção terapêutica mais adequada. Compreende-se pois, como o diagnóstico é de importância primordial antes de prosseguir com qualquer tratamento<sup>43</sup>.

Todavia, o aparecimento de novas alternativas terapêuticas para dentes permanentes jovens, com rizogénese incompleta, tem despertado grande interesse e atenção, considerando os resultados encorajadores resultantes da aplicação de mecanismos que podem ser incluídos na área da endodontia regenerativa. Com efeito, começam a surgir cada vez mais estudos de índole clínica que apontam para um melhor prognóstico destas novas abordagens terapêuticas, aplicadas em casos de dentes imaturos com polpa não vital sendo, desta forma, possível estimular o seu crescimento e maturação radicular<sup>9,11-13,16,17,44,45</sup>. Estas metodologias são frequentemente denominadas por procedimentos de revascularização, revitalização ou regeneração pulpar.

A figura 1 pretende resumir esquematicamente as várias estratégias terapêuticas possíveis em casos de dentes permanentes com desenvolvimento incompleto e ápice aberto, com base no diagnóstico do seu estado pulpar.

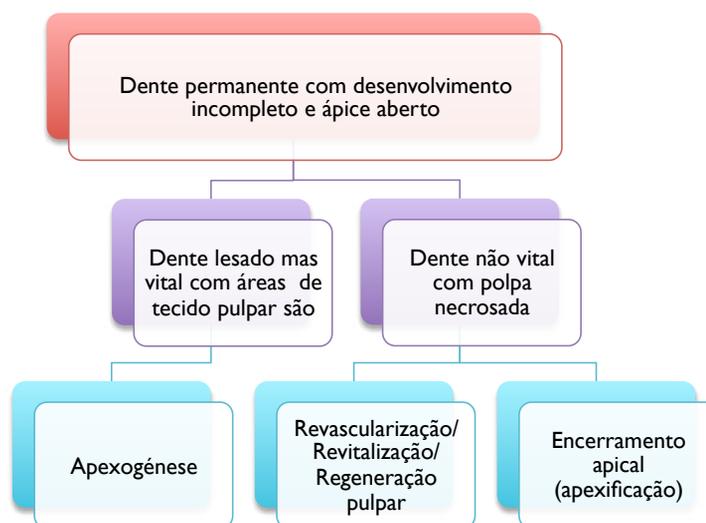


Figura 1. Esquema representativo dos tratamentos mais indicados para um dente com desenvolvimento radicular incompleto, com base no diagnóstico do estado pulpar.

A cárie dentária (mais frequente nos dentes posteriores) e as situações traumáticas (mais frequentes nos dentes anteriores) constituem os principais fatores etiológicos associados ao dano pulpar de uma raiz em desenvolvimento<sup>46-49</sup>. Em 2003, segundo Almeida *et al.*<sup>50</sup> as situações de cárie afectavam 46,9% das crianças portuguesas com 6 anos, aumentando para 52,9% aos 12 anos.

O traumatismo dentário está a tornar-se cada vez mais prevalente relativamente à cárie dentária em muitos países europeus, facto este que parece verificar-se também para a realidade portuguesa<sup>47,48</sup>. Infelizmente as lesões traumáticas em dentes permanentes jovens são mais comuns do que se pensa, afetando 20% das crianças em idade escolar<sup>47,48</sup>.

O pico de incidência das lesões traumáticas situa-se entre os 8 e os 11 anos de idade, afetando mais os rapazes, numa proporção quase duas vezes superior, em relação às raparigas<sup>46,48,51</sup>. Por sua vez, os dentes imaturos traumatizados parecem mais sujeitos a um segundo traumatismo, o que pode agravar o aparecimento de situações de inflamação pulpar ou necrose. Quando uma criança sofre uma lesão dentária traumática, numa idade inferior aos 9 anos, existe um risco de recorrência de um novo traumatismo oito vezes superior, comparativamente a uma criança que o sofra com 12 anos de idade, verificando-se ainda que o risco é maior para o mesmo dente<sup>47,48</sup>. Com efeito, segundo Glendor *et al.*<sup>47-49</sup>, 22% das crianças em estudo sofreram mais do que um trauma dentário, referindo ainda que 70% destas situações incidiram nos incisivos centrais superiores. Para esta situação, parecem existir alguns fatores predisponentes como sejam o aumento do *overjet*, a protrusão dos incisivos superiores e o insuficiente encerramento labial. A presença de protrusão incisiva predispõe a criança para um risco traumático duas vezes superior às que possuem uma oclusão correta<sup>47-49</sup>.

Ainda em traumatismo dentários, importa referir que a erupção da dentição permanente na espécie humana, tem o seu início por volta dos 6 anos de idade continuando, aproximadamente, até aos doze anos, sabendo-se que o desenvolvimento radicular continua por mais um período de um ano e meio a dois anos e meio. Com efeito, parecem ser necessários aproximadamente cerca de três anos após a erupção dentária para que se complete a formação radicular e o encerramento apical<sup>52</sup>. Assim, a ocorrência de traumatismos na cavidade oral ou presença de cáries, em pacientes com idades variando entre os seis e os catorze anos e meio, constituem um grande risco de interrupção e/ou alteração da formação completa da raiz, necessitando de medidas terapêuticas eficazes, e por vezes bastante complexas, com a finalidade de promover o crescimento radicular e o encerramento da região apical<sup>53</sup>.

Considerando que, e como já foi referido, muitas das opções terapêuticas para qualquer tratamento endodôntico são baseadas no diagnóstico do estado pulpar, a avaliação clínica da polpa apresenta-se de crucial importância, requerendo uma descrição concisa dos sintomas subjetivos, exame clínico e radiográfico cuidadoso, bem como a realização de outras provas complementares de diagnóstico. Porém, e mesmo assim, o diagnóstico do estado pulpar num dente com ápice incompleto é bastante mais difícil do que pode parecer à primeira vista<sup>43</sup>.

Num dente imaturo de ápice aberto é aconselhável, sempre que possível, a realização de testes de vitalidade/sensibilidade, sendo ideal a utilização de fluxometria de laser-*Dopler* ou oximetria pulsátil, ainda que estas tecnologias sejam muito pouco acessíveis aos clínicos<sup>54</sup>. Os testes de sensibilidade pulpar térmicos (nomeadamente ao frio) demonstram ser mais fiáveis do que os testes pulpares eléctricos, uma vez que durante a formação radicular os plexos neurosensoriais de fibras Aδ na região subodontoblástica não estão ainda bem desenvolvidos<sup>55-57</sup>. Assim, a utilização do teste pulpar eléctrico pode levar a resultados erróneos (grande número de falsos negativos), pelo que não é recomendado como método de avaliação<sup>54</sup>. Mas, por outro lado, num dente com uma história de traumatismo que esteja a desenvolver uma calcificação distrófica, o teste eléctrico torna-se crucial<sup>54,58</sup>. Nesta mesma situação, englobamos os dentes sujeitos a procedimentos de revascularização.

Convém recordar, no entanto, que o resultado de quaisquer destes testes apresenta sempre uma certa subjetividade tanto da parte do doente (sobretudo se se tratar de uma criança), como do operador<sup>54</sup>. A presença de dor aguda ou crónica, sensibilidade à percussão vertical, mobilidade, palpação do rebordo alveolar, alteração de cor coronária ou presença de um trajeto fistuloso, podem constituir também guias úteis para o diagnóstico<sup>43</sup>.

A interpretação radiográfica pode apresentar-se também bastante complexa pois a presença da área radiotransparente, que normalmente envolve o ápice de um dente imaturo com uma polpa saudável, pode dificultar o diagnóstico diferencial com uma zona radiotransparente de natureza patológica, resultante de uma polpa em necrose. Perante esta dificuldade a comparação das áreas do periápice do dente afetado com a dos dentes contralaterais pode ser muito vantajosa<sup>43,54</sup>.

Se continuarem a subsistir dúvidas no diagnóstico, será sempre mais conveniente a adoção de uma abordagem de acompanhamento, antes de avançar para um tratamento endodôntico. Em casos

traumáticos com dentina exposta, esta deverá ser temporariamente recoberta para reduzir o risco de contaminação microbiana da polpa, potencialmente comprometida. Apenas quando houver uma forte evidência do colapso pulpar é que o dente deve ser aberto<sup>43,54</sup>.

Muitas das opções terapêuticas são também tomadas com base no grau de desenvolvimento da raiz. Com efeito, a decisão de realizar um tratamento conservador, que permita uma formação radicular completa ou um tratamento mais radical, depende do correto diagnóstico do estágio de desenvolvimento da raiz<sup>43</sup>.

Histologicamente, são considerados dentes permanentes jovens com rizogênese incompleta, aqueles que para além de um comprimento radicular reduzido, de uma pequena espessura de dentina e de uma abertura apical ampla, não mostram no ápice radicular a presença de dentina revestida por cimento<sup>52</sup>. Também sob um ponto de vista radiográfico, para além do tamanho radicular e espessura das paredes, é possível detectar a ausência de encerramento radicular ou seja, avaliar se o desenvolvimento radicular não atingiu ainda a classe 5 da classificação de Patterson <sup>cit in 59</sup> ou a etapa Rc/Ac (comprimento da raiz completo e ápice radicular encerrado) da classificação de Moorrees <sup>60</sup> ou a etapa I0 da classificação de Nolla <sup>cit in 61</sup> (ver Tabelas A, B e C inseridas em anexos).

Dependendo do grau de desenvolvimento radicular o dente pode apresentar as paredes canulares de dois modos distintos, a saber: a) com paredes radiculares divergentes para apical, com um canal mais amplo no 1/3 apical do que no cervical tendo, deste modo, um ápice mais amplo que o lúmen do canal e b) com paredes paralelas ou ligeiramente convergentes para apical, mas com um ápice amplo <sup>59,62</sup>. A primeira situação descrita ocorre numa fase mais inicial do desenvolvimento radicular, e a segunda aparece mais próxima do seu *terminus* <sup>62</sup>.

De referir ainda, e como nota final, que Huang<sup>8,63</sup> é de opinião que os fatores de decisão terapêutica terão de ser revistos, uma vez que nem os testes de sensibilidade negativos, nem a visualização de tecido necrótico, nem a presença de radiotransparência apical, representam sinais seguros de total ausência de tecido pulpar vital.

Apesar da dificuldade em estabelecer uma estreita correlação entre os resultados dos testes de vitalidade/sensibilidade e o diagnóstico histopatológico, é desejável que através da combinação dos resultados da história e do exame clínico, associados aos testes de diagnóstico e exames radiológicos possa ser feito, na maioria dos casos, um diagnóstico clínico preciso do real estado de vitalidade pulpar.

## 2.1. Apexificação

A apexificação é um procedimento frequentemente utilizado para o tratamento e preservação de dentes permanentes imaturos que perderam a sua vitalidade pulpar, compreendendo-se por apexificação, a indução de uma barreira calcificada no ápice dum dente permanente necrosado<sup>42</sup>. Esta barreira constitui uma matriz contra a qual é posteriormente compactado o material de obturação canalar ou restaurador com controlo de comprimento de trabalho<sup>7</sup>.

Este procedimento, ao contrário dos processos de apexogênese, não permite o posterior crescimento e maturação radicular ou limita-o significativamente. Assim, a apexificação em dentes imaturos deve ser atualmente encarada como um tratamento de recurso<sup>8</sup>.

A apexificação tem sido uma prática rotineira por muitas décadas e, apesar de muitas discussões científicas, não se têm verificado grandes avanços de carácter técnico neste tipo de abordagem terapêutica, à exceção do significativo progresso alcançado com o aparecimento do MTA no final da década de 90<sup>8</sup>.

A técnica clássica de apexificação, consiste na limpeza e preenchimento canalar com uma pasta de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), que é substituída várias vezes ao longo de meses, visando estimular a formação de uma barreira apical calcificada<sup>4,64-70</sup>.

Ao longo dos tempos, foram propostos e utilizados como materiais de apexificação diversos produtos. O uso da pasta de hidróxido de cálcio foi proposto por Kaiser, em 1964<sup>cit in 71</sup>, tornando-se mais popularizada a partir de 1966, com o trabalho de Frank<sup>72</sup>. Desde então, e até ao aparecimento do MTA, a utilização do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , isolado ou em combinação com outros medicamentos tornou-se o material mais bem sucedido para promover a apexificação<sup>4,64-70</sup>.

Foram também aplicados, com o mesmo fim, outros produtos como o fosfato tricálcico, fosfato de cálcio, proteína-I osteogénica, fator de crescimento ósseo e também tecido ósseo desmineralizado que, no entanto, nunca atingiram grandes níveis de eficácia<sup>71,73</sup>.

Os fatores mais importantes para o sucesso da apexificação parecem residir no desbridamento completo do canal radicular (visando a remoção de todo o tecido necrótico e da infeção microbiana) e o selamento apical do dente para impedir a recontaminação por microrganismos ou nutrientes. Das<sup>74</sup> atribui mesmo o êxito da apexificação apenas ao controlo da infeção, conseguida através da combinação de um desbridamento e aplicação de uma pasta antibiótica.

De notar ainda que para que a apexificação seja bem sucedida o ápice do dente deve estar completamente dentro dos limites das corticais ósseas. Quando tal não sucede, como é o caso das situações de fenestração radicular, em que o ápice perfura a cortical óssea, o sucesso deste procedimento fica comprometido<sup>58</sup>.

Embora a técnica de apexificação tenha apresentado uma considerável eficácia na preservação do dente, mostra no entanto algumas limitações, nomeadamente a duração do tempo de tratamento (que se estende normalmente por 9 a 24 meses), a imprevisibilidade na formação de uma barreira apical (geralmente de natureza porosa e irregular), as dificuldades no seguimento dos pacientes (necessidade de grande colaboração dos doentes e dos progenitores) e o atraso na execução da restauração final. Todos estes fatores parecem aumentar o risco de reinfeções<sup>7</sup>. Para além disto, Cvek *et al.*<sup>22</sup> observaram um acréscimo significativo de fraturas radiculares cervicais, em dentes imaturos tratados com a técnica de apexificação com hidróxido de cálcio, quando comparados com dentes com raízes fisiologicamente desenvolvidas. Esta observação, de que a utilização do hidróxido de cálcio durante longos períodos de tempo pode fragilizar as raízes, tornando-as mais

suscetíveis a fraturas, foi também corroborada por diversos investigadores<sup>75-78</sup>. Este facto parece dever-se ao elevado pH do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , que pode ser responsável por uma desnaturação da matriz orgânica da dentina, particularmente do componente colagénico, provocando uma redução nas suas propriedades mecânicas e, conseqüentemente, induzindo uma maior fragilidade<sup>79</sup>. Por outro lado, é importante referir que a prevalência de fraturas nos dentes imaturos está também dependente da fase de desenvolvimento radicular, variando desde 77% em dentes com raízes menos desenvolvidas a 28% nos estádios mais avançados<sup>22</sup>.

As várias desvantagens inerentes ao processo de apexificação com o  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e particularmente o facto de ser um procedimento que se arrasta no tempo, justificaram a procura de outras alternativas, que diminuíssem o tempo de tratamento. Foi com este propósito que surgiram as primeiras aplicações do MTA, possibilitando a antecipação do final do tratamento, abrindo o caminho para a mudança de paradigma para a apexificação numa única sessão<sup>58</sup>.

Shabahang *et al.*<sup>73</sup> foram dos primeiros investigadores a utilizar o MTA demonstrando, num modelo animal e em dentes com ápices abertos, a formação de uma barreira apical consistente com grande potencial de encerramento e capacidade de prevenção da microinfiltração bacteriana. A partir daí, foram vários os estudos que confirmaram a eficácia clínica da sua aplicação, inclusive na resolução de lesões periapicais existentes, na maioria dos dentes imaturos, que foram tratados pela técnica de apexificação com MTA<sup>80-92</sup>.

Por sua vez, os tratamentos de apexificação com MTA, podem realizar-se numa só sessão, o que representa desde logo uma grande vantagem (sendo normalmente necessárias apenas 3 consultas até ao final do tratamento), para além de uma grande previsibilidade e eficiência na formação da barreira apical<sup>7,41</sup>. Por outro lado, as desvantagens desta técnica englobam um certo risco de descoloração do dente e sobretudo, de forma semelhante ao tratamento com hidróxido de cálcio, uma forte limitação do processo de desenvolvimento radicular fisiológico<sup>7,41</sup>.

Uma nota apenas para sublinhar mais uma vez que um passo crítico no tratamento endodôntico de dentes com ápices imaturos consiste, independentemente do material utilizado para promover a apexificação, num adequado desbridamento e antissepsia do espaço canal<sup>41</sup>. Este assunto será novamente abordado e descrito com mais pormenor na alínea de materiais e métodos.

As figuras 2 e 3 representam algumas etapas de processos de apexificação com MTA em sessão única, num incisivo central superior (Figura 2) e num molar inferior (Figura 3).

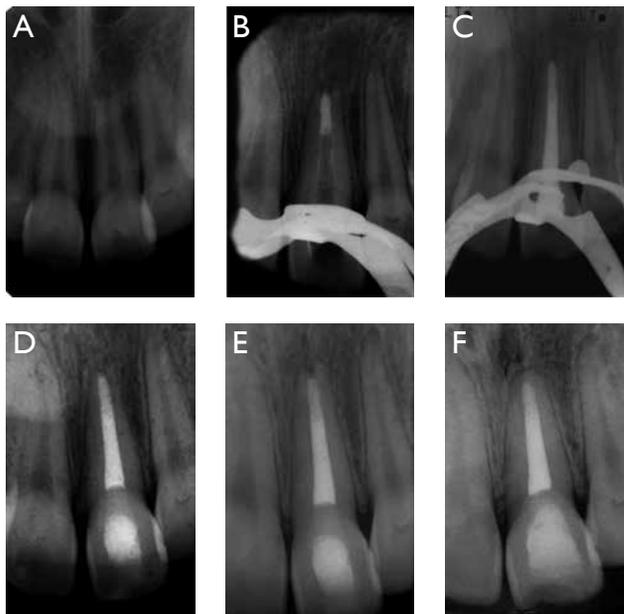


Figura 2. Aspectos radiológicos do procedimento de apexificação com MTA, numa única sessão, efetuado num incisivo central superior (21) com necrose pulpar e periodontite apical crônica. A) Aspecto do dente antes da intervenção. B) Presença de MTA (ProRootMTA®, Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça) nos 4 mm apicais do canal. C) Obturação do restante espaço canal com gutapercha. D) Aspecto do mesmo dente após 1 ano, apresentando remissão da lesão periapical. E) Imagem radiológica ao fim de 4 anos. F) Imagem obtida após dez anos do procedimento de apexificação com MTA, sendo possível observar o encerramento completo do ápice e a presença de lâmina dura em toda a sua extensão.

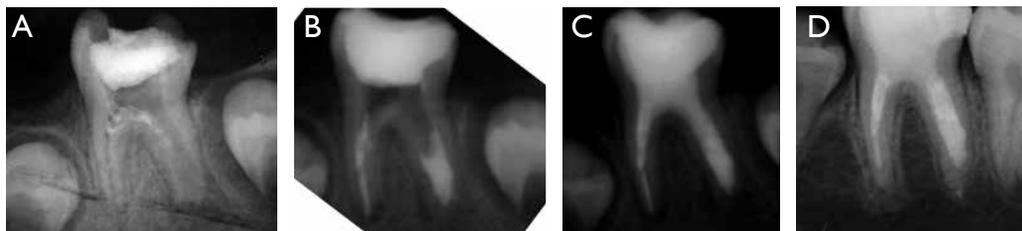


Figura 3. Alguns aspectos radiológicos do procedimento de apexificação com MTA, numa única sessão, efetuado num dente molar (36) com necrose pulpar e periodontite apical crônica. A) Aspecto inicial do dente que estava ser sujeito a tratamento de apexificação com hidróxido de cálcio sem sucesso. B) Presença de MTA (ProRootMTA®, Dentisply Maillefer, Ballaigues, Suíça) nos 4 mm apicais do canal distal e nos canais mesiais. C) Preenchimento da restante porção do canal com resina composta de dupla polimerização. D) Aspecto do mesmo dente após 5 anos, apresentando remissão da lesão periapical, encerramento completo do ápice e a presença de lâmina dura em toda a sua extensão.

Para finalizar, interessa referir que até ao momento, as técnicas de encerramento apical, quer as que envolvem a indução de uma barreira calcificada de natureza biológica, quer as que efetuam o encerramento apical com uma barreira artificial, com materiais como o MTA, continuam a ocupar na prática clínica um lugar de destaque. Porém, a recente possibilidade de uma regeneração pulpar em dentes imaturos infetados, com base em procedimentos endodônticos e de acordo com as ideias de Huang, no seu artigo intitulado “Apexification: the beginning of its end”<sup>8</sup> podem relegar este tipo de abordagem para os arquivos da história.

## 2.2 Revascularização/revitalização/ regeneração pulpar

Uma vez que os procedimentos de apexificação restringem a progressão e a maturação radicular, mantinha-se a necessidade de encontrar um mecanismo que possibilitasse o restabelecimento da vitalidade do espaço pulpar e um aumento da espessura da matriz dentinária, bem como o crescimento radicular e encerramento apical, ou seja, a continuação do desenvolvimento e maturação da raiz.

Em 1961, Nygaard-Østby e Hjortdal demonstraram, pela primeira vez, a presença de tecidos vitais no terço apical do espaço canal de dentes permanentes submetidos a pulpectomia prévia ou com polpa necrótica e lesões periapicais, após indução de um coágulo sanguíneo por disrupção dos tecidos periapicais com uma lima <sup>cit in</sup><sup>93</sup>. Os bons resultados demonstrados com o aparecimento, crescimento e vascularização de novos tecidos no espaço pulpar (embora histologicamente não se observasse neoformação de dentina), pôs em evidência o papel essencial da indução e formação do coágulo sanguíneo, como matriz de suporte para a cicatrização e reparação de tecidos de natureza conjuntiva da região apical de dentes imaturos. Este investigador foi por este motivo considerado como um dos pioneiros da endodontia regenerativa<sup>32</sup>.

Mais tarde, Cvek *et al.*<sup>22</sup> descreveram vários casos de revascularização do espaço pulpar em dentes imaturos que sofreram avulsão, atribuindo este sucesso à presença de um ápice aberto, raiz curta e tecido pulpar que, embora se encontrasse desvascularizado, funcionava como uma matriz. Estes fatores parecem ser cruciais para o sucesso do processo de revascularização. Com efeito, a formação e crescimento de novos tecidos e vasos sanguíneos teria um fácil acesso ao sistema canal (quanto maior for o *foramen*, maior será a possibilidade de desenvolvimento de um novo suprimento vascular e celular) e uma distância relativamente curta a percorrer até à porção mais coronal<sup>23</sup>. De facto, o replante de um dente imaturo avulsionado apresenta um conjunto de circunstâncias únicas que permitem que a revascularização ocorra rapidamente. A polpa pode apresentar-se necrótica mas geralmente não está infectada de modo que, como já foi referido, pode atuar como uma matriz capaz de apoiar e conduzir o crescimento de novos tecidos a partir das regiões apicais e/ou periapicais. Já Skoglund *et al.*<sup>94</sup> em 1978 haviam demonstrado experimentalmente que a região apical da polpa podia permanecer vital e após a reimplantação do dente proliferar em direção coronária, substituindo as porções anteriormente necrosadas. De facto está hoje demonstrado, que os dentes com ápice imaturo contêm uma fonte de células estaminais geralmente localizadas na papila apical,

das raízes em desenvolvimento, o que lhes confere uma grande probabilidade de recuperação<sup>24,95-98</sup>. Além disso, na maioria das vezes, a coroa do dente encontra-se intacta e livre de cárie, impedindo ou diminuindo bastante a possibilidade de ocorrer uma microinfiltração bacteriana para o espaço pulpar<sup>99</sup>. Assim, o rácio entre formação de um novo tecido e a presença bacteriana no espaço pulpar desloca-se em favor da formação tecidual. Skoglund<sup>23</sup> mostrou ainda que a revascularização pulpar era possível em dentes imaturos, levando aproximadamente 45 dias, permitindo o desenvolvimento radicular adicional e deste modo aumentando a resistência à fratura.

O processo de revascularização do espaço pulpar num dente imaturo com tecido pulpar necrótico e infetado com ou sem periodontite apical era considerado impossível até há bem pouco tempo atrás. Na verdade, apesar de mais algumas tentativas no sentido de se efetuarem tratamentos regenerativos tendo por base a formação de um coágulo sanguíneo ou a utilização de matrizes de colagénio, continuavam a verificar-se taxas de sucesso muito baixas<sup>93,100,101</sup>. Com efeito, nesta altura, os materiais disponíveis, não estavam ainda suficientemente otimizados e desenvolvidos, justificando, em grande parte, as dificuldades e limitações em reproduzir um ambiente semelhante ao tecido pulpar de dentes avulsionados.

Todavia, desde a realização dos estudos de Nygaard-Østby<sup>93</sup>, verificaram-se avanços substanciais nos mecanismos de antissepsia canal, na prevenção da microinfiltração coronária e na área da engenharia de tecidos que tornaram possível a criação de microambientes favoráveis a uma regeneração pulpar. É neste âmbito, que Iwaya *et al.*<sup>9</sup> e posteriormente, Branchs e Trope<sup>102</sup>, descreveram novos procedimentos que possibilitaram uma reparação tecidual efetiva no espaço canal de dentes imaturos com diagnóstico de necrose pulpar e periodontite apical, possibilitando o reforço das paredes radiculares e, por vezes, a continuação do desenvolvimento radicular, abrindo assim novas perspetivas terapêuticas neste campo.

As estratégias subjacentes ao aparecimento de novos tecidos no espaço pulpar, visando recuperar uma polpa lesada ou ausente, são referidas como procedimentos de endodontia regenerativa.

A metodologia proposta por Branchs e Trope<sup>102</sup> assenta em três pressupostos fundamentais: 1) antissepsia canal efetiva, 2) criação de uma matriz que permita o crescimento de novos tecidos e 3) selamento coronário adequado de modo a prevenir uma reinfeção.

Ainda que os resultados destes trabalhos não sejam totalmente reprodutíveis e nem seja previsível a natureza histológica dos tecidos formados no espaço canal, o efeito da aplicação destes procedimentos representa um possível avanço em relação às anteriores terapêuticas endodônticas convencionais. De referir ainda que estas novas técnicas geralmente constituem procedimentos acessíveis, pouco onerosos e que facilmente se adaptam ao instrumental e medicação existente ao dispor do médico dentista<sup>30</sup>. Com efeito, os medicamentos recomendados para antissepsia canal podem ser facilmente obtidos no mercado farmacêutico, sendo também de fácil colocação no canal radicular. Também a aplicação adicional de certas matrizes isoladamente ou em conjugação com o coágulo sanguíneo, parecem não encarecer ou dificultar sobremaneira este processo.

Se ao fim de 12 semanas após o tratamento de revascularização, não se verificar uma evolução clínica e radiográfica favorável há sempre possibilidade de recorrer, como opção menos conservadora, ao tratamento convencional de apexificação<sup>10</sup>.

A partir dos trabalhos de Iwaya et al, Banchs e Trope<sup>9, 102</sup>, começaram a ser publicados vários artigos de índole clínica tendo por base o relato de casos e de séries de casos clínicos descrevendo a evolução de dentes permanentes imaturos com necrose pulpar, submetidos a diversos tratamentos de revascularização<sup>9, 11-13, 16, 17, 44, 45, 103-122</sup>. A tabela D (inserida nos anexos) mostra um sinopse destas publicações. Estes estudos, embora com algumas variantes, apresentam vários pontos em comum, nomeadamente: 1) pacientes com idade jovem (6-18 anos), 2) dentes permanentes imaturos (ápices abertos), 3) instrumentação canalar mínima ou não executada, 4) recurso a medicação intracanal e 5) prevenção da microinfiltração coronária com recurso a restauração definitiva.

Por outro lado, pode concluir-se que nestas situações clínicas a terapia endodôntica convencional com um protocolo de instrumentação e irrigação com recurso a limas e irrigantes está desaconselhada, por forma a evitar fragilizar ainda mais um dente que, já por si, apresenta paredes dentinária finas e frágeis<sup>32</sup>.

Uma vez que a presença de bactérias tem um impacto negativo no sucesso dos procedimentos de regeneração pulpar, será imprescindível uma eficaz antisepsia do sistema de canais radiculares, efetuada previamente à terapêutica endodôntica regenerativa. De notar ainda, que a duração do processo infeccioso, as espécies microbianas envolvidas e a imunidade do hospedeiro são também fatores importantes a ter em consideração<sup>32</sup>.

Finalmente, é de fundamental importância conseguir-se um bom selamento do canal com uma restauração coronária capaz de prevenir a microinfiltração<sup>32</sup>.

Ainda que, os procedimentos sintetizados na tabela D (ver anexos) apresentem idênticos fundamentos, existem no entanto algumas variações no protocolo operatório. Entre elas destacamos: 1) o tipo e a concentração dos irrigantes utilizados, 2) o tipo e a concentração da medicação intracanal, 3) o número e o intervalo entre consultas, 4) a indução e a formação de um coágulo sanguíneo ou a aplicação adicional de outro tipo de matriz, assim como 5) os diferentes materiais de barreira cervical e de restauração final.

De assinalar também, que quase todos os tratamentos acima mencionados se referem à resolução dos processos de patologia periapical, bem como a uma progressão do desenvolvimento radicular traduzida por um aumento em comprimento e em espessura das suas paredes. Na tabela E (ver anexos) apresenta-se uma síntese dos resultados e do prognóstico decorrente destes procedimentos de revascularização.

De notar que a maioria das evidências radiográficas que traduzem alterações na espessura e comprimento da raiz são habitualmente interpretadas como uma indicação de regeneração do complexo pulpo-dentinário. Porém, esta situação ideal não é frequentemente alcançada, sendo a cicatrização dos tecidos periapicais e o encerramento apical baseados apenas numa revitalização do

espaço pulpar, reconhecida também como uma alternativa de sucesso<sup>20</sup>. Com efeito, ainda que não se verifique o crescimento da raiz, este desfecho deve ser considerado como um resultado muito aceitável. A perda prematura de um dente permanente num indivíduo que ainda não tenha completado o desenvolvimento das estruturas dentárias e esqueléticas associadas, compromete e dificulta desde logo qualquer reabilitação protética. Assim, num indivíduo em crescimento, a manutenção do dente na arcada, ainda que não atinja um desenvolvimento radicular completo, deve constituir uma das principais preocupações do clínico<sup>20,21</sup>.

Neste âmbito, será de realçar a maior potencialidade de sucesso dos dentes permanente imaturos na área da regeneração pulpar. Para além de um ápice aberto (permitindo um maior suprimento vascular e uma boa comunicação entre o espaço pulpar e os tecidos periapicais), comprimento mais curto da sua raiz (possibilitando a formação de tecidos e preenchimento do espaço canal com maior rapidez), são por norma indivíduos jovens e por isso com maiores capacidades de cicatrização. Por último e de crucial importância interessa não esquecer o facto da papila apical (principal fonte de células estaminais responsáveis pela formação da dentina radicular) só existir em dentes imaturos, aliada também a uma maior capacidade de proliferação e diferenciação das células estaminais da polpa dentária nesta etapa do desenvolvimento<sup>20,21,24,25,123</sup>.

Uma nota mais para referir que, atualmente, não existem protocolos padronizados relativos aos métodos de tratamento regenerativo na área de endodontia, baseados na evidência científica ou clínica, que recomendem um procedimento reconhecido como sendo o mais correto e indicado para o tratamento de dentes imaturos infetados. Na verdade, é conhecido apenas um conjunto de recomendações elaborado pelo comité para a regeneração endododôntica que integra a *American Association Endodontis (AAE)*, intitulado por “*Considerations for regenerations procedures*”<sup>244</sup>. Este documento baseado na melhor evidência disponível até ao momento, relacionada com estudos pré-clínicos e relatos de casos clínicos, deverá ser apenas considerado como uma possível fonte de informação à disposição dos clínicos, para melhor poderem elaborar uma correta decisão e conduta terapêutica.

Dentro do panorama dos casos clínicos de revascularização apresentamos na figura 4 um representação esquemática de um procedimento de revascularização/ regeneração pulpar e nas figuras 5 e 6, uma sequência de imagens ilustrativas de um dos nossos casos clínicos submetido a um protocolo de revascularização.

A figura 7 apresenta uma série de imagens radiográficas do processo de evolução de um procedimento de revascularização pulpar efetuado e gentilmente cedido pelo *Dr. Jan Berghmans*.

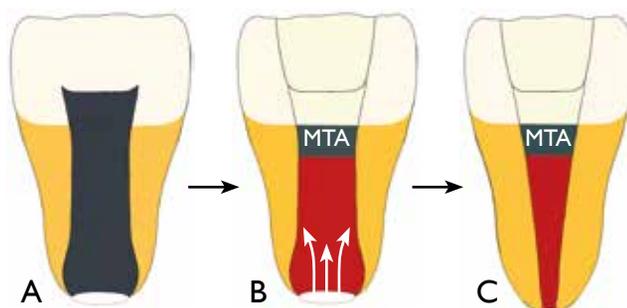


Figura 4. Esquema ilustrativo dos procedimentos de revascularização/ regeneração pulpar. A) Dente imaturo com polpa necrótica. B) Após um procedimento de antisepsia e medicação intracanal procede-se à sobreinstrumentação e indução de uma hemorragia, visando a formação de um coágulo no interior do canal radicular até à sua porção cervical. O coágulo sanguíneo é depois recoberto por MTA e por uma restauração. C) Nos casos de sucesso observa-se como resultado final uma revascularização acompanhada de uma revitalização do espaço canalar ou mesmo uma regeneração pulpar, traduzida pela continuação do desenvolvimento radicular e encerramento apical. Adaptado de Hargreaves et al<sup>32</sup>.

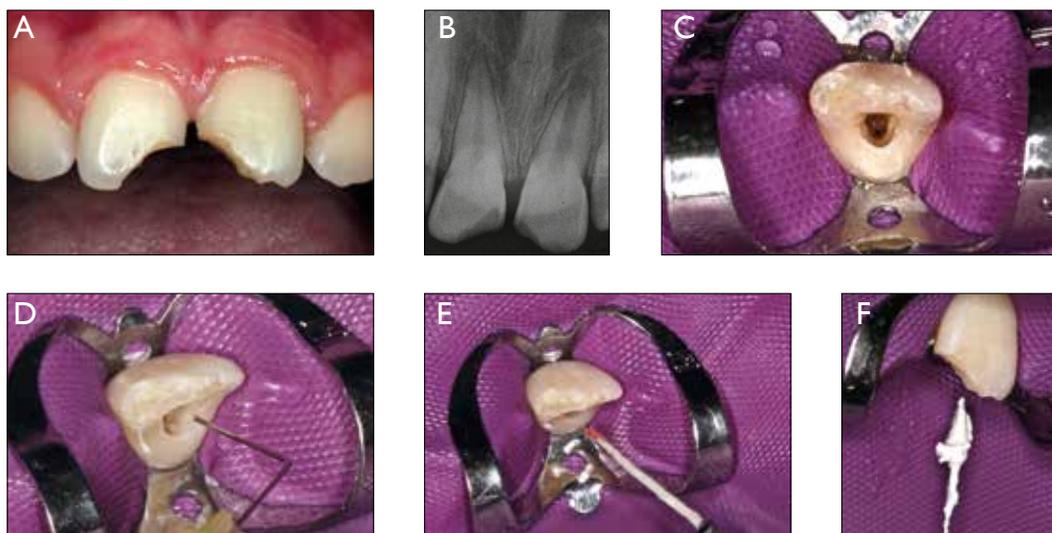


Figura 5. Exemplo de um protocolo de revascularização aplicado a um dente (21) de uma criança de 12 anos do sexo masculino com história de traumatismo aos 8 anos. O exame clínico (A) e radiográfico (B) realizado na primeira consulta revelou a presença de necrose pulpar. Após isolamento absoluto e acesso coronário (C), o sistema canalar foi lenta e suavemente irrigado com 10 mL de hipoclorito de sódio a 2,5% utilizando uma agulha de saída lateral inserida ao terço apical (D). Após secagem (E) foi introduzido no canal radicular uma pasta biantibiótica (numa proporção 1:1 de ciprofloxacina/metronidazol) até à junção amelocementária (JAC) usando um Lêntulo (F).

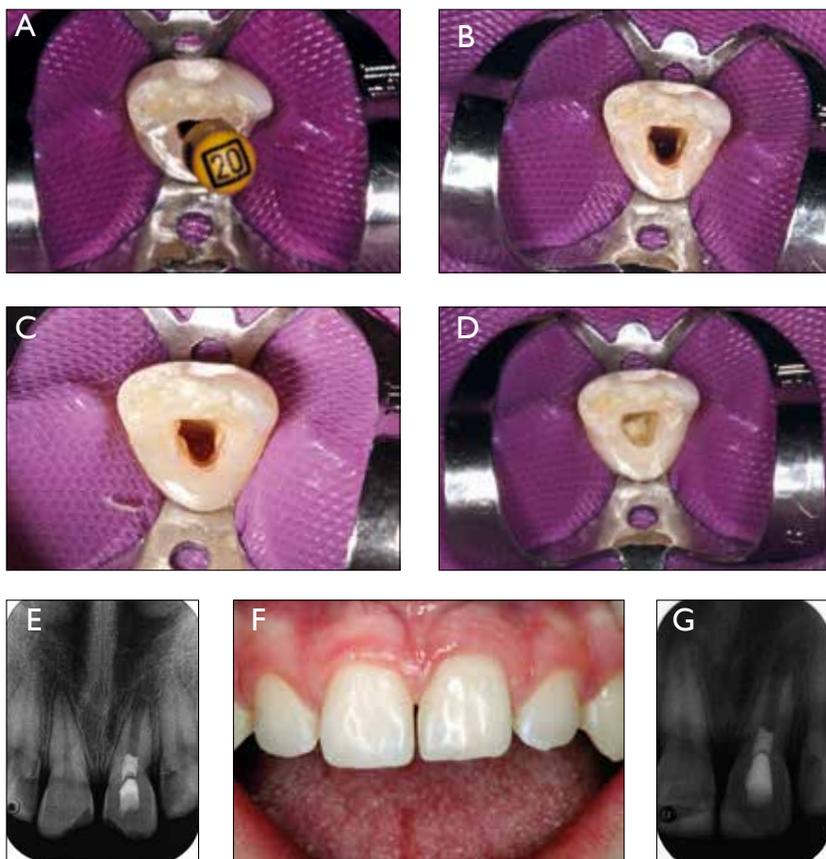


Figura 6. Após duas semanas, o dente representado na figura anterior, foi anestesiado com um anestésico sem vasoconstritor e isolado. A medicação foi removida através de uma irrigação lenta com soro fisiológico. Procedeu-se então à indução de uma hemorragia com uma lima K (A) por ruptura dos tecidos apicais e periapicais e estabilização do coágulo abaixo da JAC (B e C). Após a estabilização do coágulo colocou-se uma barreira cervical com MTA(D) e procedeu-se à restauração com o ionômero de vidro (E) e posteriormente com uma resina composta (F e G).

Com o conjunto de publicações relacionados com estas novas metodologias surgiram também várias designações, que trouxeram alguma controvérsia, a respeito da terminologia mais adequada para descrever a formação e o aparecimento de novos tecidos no espaço canal, que englobam os termos revascularização, revitalização e regeneração.

Acerca deste assunto tem-se verificado uma certa discussão no sentido de se encontrar a designação mais apropriada. O termo revascularização está essencialmente relacionado com o restabelecimento de uma rede vascular, sendo de certa forma redutor relativamente ao resultado final da aplicação destes processos de endodontia regenerativa. Esta denominação, está bastante associada aos trabalhos de Trope e Thibodeau *et al.*<sup>10, 18, 102</sup> que valorizaram o desenvolvimento de

uma rede vascular como uma característica sempre presente, independentemente da natureza do tecido formado na cavidade pulpar. A este respeito, Huang e Lin<sup>124</sup>, numa carta ao editor no *Journal of Endodontics*, referem que esta terminologia não estaria corretamente aplicada tendo mencionado varias razões que justificavam a inapropriada utilização deste termo. Por conseguinte, propuseram então a utilização do termo regeneração uma vez que o objetivo deste método terapêutico visa a reconstituição do complexo pulpo-dentinário. De referir, contudo, que as abordagens terapêuticas incluídas nos procedimentos de endodontia regenerativa constituem hoje uma meta ideal, ainda não totalmente alcançada.

É nesta filosofia que, mais recentemente, num artigo de Wang<sup>19</sup>, em co-autoria com Trope, Thibodeau, Lin e Huang, é recomendado o termo revitalização e ou mesmo revitalização/revascularização, uma vez que os tecidos predominantemente formados no espaço canal ar não são específicos da polpa.

A escolha do termo revascularização pulpar para intitular o presente trabalho, teve por base o facto desta designação ser a mais frequentemente encontrada na literatura para designar esta estratégia terapêutica.

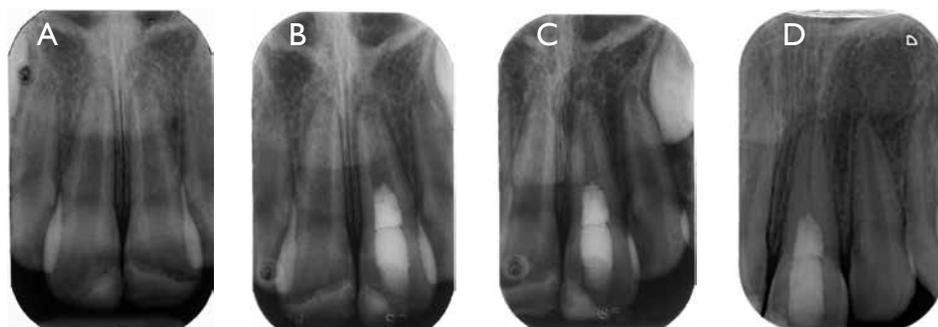


Figura 7. Procedimento de revascularização efetuado para tratamento do dente 21 numa criança do sexo feminino de 8 anos, com diagnóstico de necrose pulpar após um traumatismo dentário. Depois de isolamento absoluto e realização da uma cavidade de acesso coronário, o sistema canal ar foi sujeito a um procedimento de antissepsia através de uma irrigação com hipoclorito de sódio a 5,25% e colocação de uma pasta biantibiótica (mistura de ciprofloxacina e metronidazol). Após 3 semanas, o dente foi isolado e anestesiado (anestésico sem vasoconstritor), sendo removida a pasta de antibiótico por meio de irrigação. Procedeu-se então à indução de uma hemorragia com uma lima K por disrupção dos tecidos apicais e periapicais e estabilização do coágulo de modo a preencher o canal radicular. Foi então criada uma barreira cervical com MTA branco e restauração provisória com ionómero de vidro, sendo mais tarde restaurado uma resina composta. A) Imagem radiográfica pré-operatória. B) Imagem pós-operatória. C) Controlo após um ano e D) após 4 anos, mostrando um aumento da espessura das paredes radiculares e encerramento apical (Caso gentilmente cedido por Dr. Jan Berghmans).

As opções terapêuticas visando o tratamento endodôntico de um dente imaturo, são baseadas no diagnóstico do fase de desenvolvimento da raiz. Na verdade, para diagnosticar e tratar dentes permanentes jovens, é necessário ter um profundo conhecimento do mecanismo fisiológico de formação e maturação radicular, bem como das diferenças entre dentes em desenvolvimento e totalmente formados. Deste modo, o conhecimento dos princípios da embriogênese dentária e da evolução e a caracterização histológica dos tecidos que constituem o gérmen dentário são fundamentais para a compreensão e desenvolvimento dos métodos de reconstrução e regeneração das estruturas dentárias. Tendo em mente todos estes pressupostos, pareceu-nos pertinente e justificado desenvolver algumas considerações básicas sobre certos aspetos morfofuncionais da odontogênese.

Em muitas situações de dentes imaturos com ápice aberto, uma infecção prolongada pode levar à necrose completa da polpa e da papila apical, não existindo nestas circunstâncias grandes possibilidade de ocorrer um regeneração pulpar de um modo natural. Nestas situações será necessário recorrer a técnicas de transplantação de células estaminais, implantadas numa matriz, se possível enriquecida com fatores de crescimento<sup>30,98,107</sup>. Considerando que esta tecnologia tem grande potencial para vir a ser aplicada clinicamente no futuro, achámos conveniente traçar também uma panorâmica geral dos principais elementos de engenharia de tecidos em que assentam estes procedimentos de regeneração pulpar:

São pois estes assuntos que serão abordados nas próximas alíneas.

### **3. Odontogênese**

Odontogênese é a denominação usualmente atribuída ao conjunto de eventos relacionados com a origem e formação dos dentes. Esta designação da responsabilidade de Kollar<sup>125</sup> e Lumsden<sup>126</sup>, inclui a iniciação, morfogênese e diferenciação dos germes dentários, incidindo apenas no desenvolvimento do esmalte e do complexo pulpo-dentinário. Esta denominação foi mais tarde alargada de modo a abranger também o desenvolvimento do periodonto, ou seja, do cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, formações que inicialmente não eram consideradas como parte integrante do dente<sup>127</sup>.

A primeira fase do desenvolvimento odontogénico (iniciação) envolve um conjunto de mecanismos que determinam a área onde irão posicionar-se os dentes no seu conjunto (região oral) e mais tarde a posição e diferente morfologia de cada um dos componentes das famílias de incisivos, caninos, pré molares e molares. Muitos destes processos têm lugar muito antes das primeiras evidências histológicas que caracterizam as etapas iniciais da odontogênese e que também são comuns a vários órgãos de origem ectodérmica<sup>128, 129</sup>.

#### **3.1 Importância das células da crista neural**

No embrião humano a cavidade oral primitiva ou *stomodeum* é revestida por uma ectoderme (constituída por um epitélio de apenas uma ou duas camadas) que recobre um tecido de natureza

mesenquimatoso que vai sendo gradualmente invadido por uma população de células de origem ectodérmica provenientes da crista neural designando-se, no seu conjunto, por ectomesênquima<sup>129</sup>. Este facto confere a estes tecidos e aos seus derivados características muito próprias que podem justificar muito do seu comportamento.

As células da crista neural apresentam-se da maior importância para a formação das estruturas craniofaciais e para a iniciação e determinação topográfica e morfológica dos órgãos dentários<sup>128, 130</sup>. Com efeito, os odontoblastos “carregam” ainda muitas características do seu neuroepitélio de origem<sup>131</sup>. Dentro desta filosofia foi sugerido que os odontoblastos seriam originalmente recetores sensoriais respondendo a alterações químicas e térmicas do ambiente, especificidade que ainda hoje se mantém<sup>132</sup>. A este respeito Slavkin e Diekwisch<sup>133</sup> afirmaram, sublinhando a origem neural do órgão dentário, “teeth per se are essentially neurological structure that are suggested to have originated as exoskeletal chemosensory organ in early agnathan chordates”.

O início da migração das células da crista neural ainda não é totalmente conhecido; porém, sabe-se que a partir da sua posição e especificação na crista neural passa a ser ativado um conjunto de fatores de transcrição, preparando-as para um determinado trajeto migratório e destino final. Com efeito, o padrão de migração e diferenciação das células da crista neural não depende somente duma possível pré-programação intrínseca (resultante da sua localização topográfica de origem) mas vai sendo determinado por fatores moleculares “residentes” nos diferentes tecidos por onde vão passando<sup>134</sup>. Uma vez no seu destino final, as células da crista neural recebem sinalizações e mensagens extrínsecas para que assumam um fenótipo final e definitivo<sup>128</sup>.

De facto, durante o desenvolvimento dentário muitas são as “mensagens” que passam entre o epitélio e o mesênquima, conduzindo a mudanças de complexidade crescente dos órgãos dentários<sup>135</sup>. Deste modo, a ectoderme oral vai ativar e regular nas células do ectomesênquima uma série de fatores de transcrição, responsáveis pela sua diferenciação<sup>136, 137</sup>. Assim, pode afirmar-se que as células da crista neural vão formar órgãos dentários somente quando associadas com o epitélio oral. Na verdade, o epitélio oral/epitélio do órgão do esmalte constitui um importante agente “instrutor” sobre o ectomesênquima subjacente regulando (estimulando ou inibindo) a expressão de genes específicos (maioritariamente genes homeóticos) envolvidos no desenvolvimento inicial das células da linha odontoblástica<sup>138, 139</sup>. Foram vários os trabalhos que sugeriram que o epitélio oral exercia uma influência fundamental e crucial, como “motor de arranque” do processo de odontogénese, constituindo o fator indutor responsável pelo início do desenvolvimento do órgão dentário<sup>128, 137, 140, 141</sup>. Porém, rapidamente o ectomesênquima por ele induzido assumia um papel dominante na morfogénese e diferenciação do germen dentário<sup>128, 129, 137, 140, 141</sup>.

Está atualmente confirmada a existência de uma interação (sequencial, recíproca e temporária) que se exerce alternadamente, de parte a parte, tendo sido possível identificar vários fatores de crescimento, moléculas de sinalização, fatores de transcrição e componentes da matriz extracelular como elementos responsáveis pelo diálogo entre o epitélio oral e o ectomesênquima adjacente<sup>127, 128, 130</sup>.

Uma última nota para sublinhar que a expressão de diferentes genes homeóticos associada a certas vias de sinalização, manifesta-se não só nas fases iniciais de desenvolvimento dos germes dentários mas também durante os processos de morfogénese e histodiferenciação, ou seja, em estádios muito mais avançados. De facto, a evolução da odontogénese para além da fase de gomo ou broto é muitas vezes mediada pela repetição dos mesmos mecanismos de interação epitélio mesênquima observados nas fases mais precoces<sup>142</sup>. Estes mecanismos particularmente estudados durante a formação da coroa, continuam a verificar-se nos processos de formação radicular e nos mecanismos de reparação e regeneração dentária, justificando deste modo a sua abordagem.

### 3.2 Alguns aspetos morfofuncionais da odontogénese

Os germes dentários, com origem na lâmina dentária apresentam no seu processo de evolução uma série de etapas ou fases, comuns a várias espécies de vertebrados, que devido à diferente morfologia apresentada pelo seu componente epitelial (órgão do esmalte) são denominadas tradicionalmente por fase de gomo ou de botão, fase de capuz, fase de campânula, fase de coroa e fase de raiz<sup>139, 143, 144</sup>.

Após uma fase de proliferação uniforme, a lâmina dentária passa a apresentar, em alguns locais, atividades mitóticas diferenciais. Como resultado deste mecanismo começam a aparecer, em cada arco, pequenas condensações esféricas, ou globulares, que fazem protusão para o mesênquima, representando o início da fase de gomo ou de botão. Estas estruturas constituem os primórdios do órgão do esmalte<sup>129</sup>.

Por sua vez, o ectomesênquima subjacente apresenta-se nesta fase como uma discreta, mas visível, condensação de células, localizada na parte mais profunda da formação epitelial. Este ectomesênquima é constituído tanto por células mesenquimatosas residentes (características do tecido onde se está a desenvolver o dente) como por células oriundas da mesoderme para-axial e por células derivadas das cristas neurais<sup>138</sup>.

A transição da fase de botão para a fase de capuz (Figura 8) decorre duma intensa mas desigual proliferação celular das células epiteliais, adoptando progressivamente o órgão do esmalte uma forma que se assemelha a um barrete frígido, razão pela qual esta etapa de desenvolvimento do órgão dentário é chamada de fase de capuz<sup>138, 139</sup>.

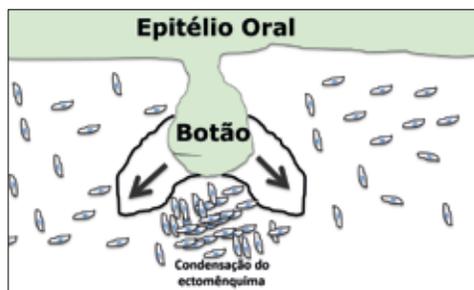


Figura 8. Progressão da fase de gomo ou botão para a fase de capuz. É também assinalada a condensação de células de ectomesênquima subjacente ao órgão do esmalte.

Na porção mais central da formação epitelial vai-se tornando cada vez mais nítida a presença de uma concavidade ocupada por uma condensação de células do ectomesênquima. Esta concentração celular é bastante maior do que a observada na fase de botão, designando-se no seu conjunto por *papila dentária*, devendo atuar como um fator mecânico, que pode contribuir, em grande parte, para o desenvolvimento da concavidade evidenciada no órgão do esmalte<sup>127, 128, 138, 145</sup>.

Neste estágio de desenvolvimento têm lugar, importantes processos de indução odontogénica levados a cabo através de moléculas bioativas<sup>127, 129, 138, 140, 141</sup>.

Ainda nesta fase, o ectomesênquima que rodeia tanto o órgão do esmalte quanto a papila dentária organiza-se, formando uma “cápsula” em torno do gérmen dentário em desenvolvimento, separando-o do restante mesênquima do maxilar. Esta condensação periférica é denominada por *saco ou folículo dentário*, sendo responsável pela formação do periodonto de inserção (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar)<sup>128, 129</sup>.

Pode pois afirmar-se que, da fase de botão para a fase de capuz, se verifica uma organização do ectomesênquima (Figura 9) em duas linhas diferentes: uma condensação central, envolvida pelo órgão de esmalte, que forma a papila dentária (que vai mais tarde originar a polpa, as células odontoblásticas e a dentina) e uma camada periférica, que rodeia todo o gérmen dentário (que vai dar origem aos tecidos periodontais)<sup>128, 129, 139</sup>.

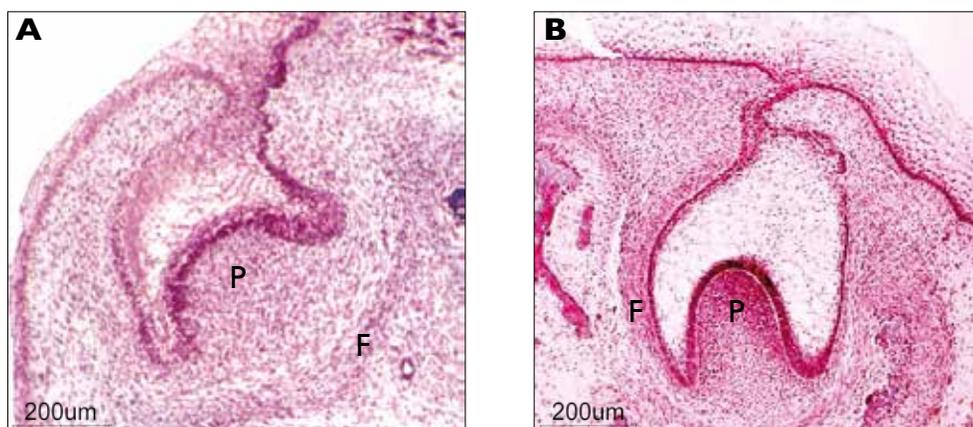


Figura 9. Aspeto histológico do gérmen dentário em fase de capuz (A) e campânula (B), sendo possível observar o desenvolvimento e localização da papila dentária (P) e do folículo dentário (F). Imagens gentilmente cedidas pelo Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Estas duas regiões parecem desempenhar uma importância fundamental nos mecanismos de formação, reparação e regeneração dentária constituindo as principais regiões anatómicas onde estão localizados os nichos de células estaminais com maior atividade e potencialidade nestes processos.

### 3.3 Desenvolvimento do complexo pulpo-dentinário

Nas fases iniciais da formação do dente, a papila dentária (que dará origem à polpa), ocupa a quase totalidade do espaço pulpar)<sup>127, 129, 139</sup>.

O mecanismo de maturação e evolução da papila dentária em polpa começa a verificar-se na fase de campânula, quando as células ectomesenquimatosas mais periféricas iniciam o seu processo de diferenciação em odontoblastos, formação de uma matriz dentinária e aparecimento do complexo pulpo-dentinário. Este fenómeno resulta da influência dos pré-ameloblastos sobre as células adjacentes da papila dentária, que param de se dividir, aumentam de tamanho e começam a sintetizar a primeira camada de matriz dentinária, a dentina do manto<sup>138, 139</sup>. Diversos elementos como fatores de crescimento, fatores de transcrição, moléculas de adesão, integrinas e componentes da matriz extracelular participam nas várias interações epitélio mesênquima que, como já foi, constituem o mecanismo de indução recíproca, que caracteriza a dentinogénese e amelogénese<sup>127, 138</sup>. Durante a dentinogénese podem ser consideradas duas diferentes etapas: a formação da dentina coronária e a formação da dentina radicular<sup>138</sup>.

A restante papila é constituída maioritariamente por células indiferenciadas, fusiformes ou estreladas, com numerosos prolongamentos citoplasmáticos. Estas células com origem mesenquimatosas e ectodérmica (crista neural) constituem uma população de reserva pulpar com capacidade para se diferenciar em novos odontoblastos (produtores de dentina) ou em fibroblastos, produtores de matriz pulpar. É esta elevada concentração celular e a reduzida proporção de fibras (que se inverte progressivamente com o desenvolvimento dentário) que proporciona à polpa dos dentes jovens uma grande eficácia nos processos de proteção, reparação e regeneração pulpo-dentinária<sup>127, 146</sup>.

A transformação da papila em polpa completa-se gradualmente, durante os estádios mais avançados de erupção dentária, aquando do aparecimento do dente na cavidade oral. A polpa, apresentará assim a forma mais madura da papila dentária<sup>128, 139</sup>.

#### 3.3.1 Zona Odontoblástica

Os odontoblastos (as células mais características do órgão pulpo-dentinário) são células com origem no ectomesênquima da papila dentária, responsáveis pela formação e mineralização da matriz dentinária. Os odontoblastos maduros são células altamente diferenciadas que perderam a sua capacidade de divisão. Quer durante a dentinogénese quer no dente já formado, os odontoblastos apresentam-se como células altamente polarizadas, intimamente justapostas, dispendo-se em paliçada e constituindo uma só camada de células adjacentes à pré-dentina, contornando a periferia da polpa dentária<sup>128</sup>. Os odontoblastos após formarem a dentina mantêm com esta matriz uma estreita relação pois os seus prolongamentos ficam contidos nos túbulos dentinários. Assim, os odontoblastos possuem duas partes nitidamente diferentes: um corpo celular e um prolongamento ou processo odontoblástico. Na coroa (Figura 10A), os odontoblastos apresentam-se com uma forma cilíndrica

alta (com cerca de 50-60 micrómetros de comprimento). A altura destas células vai diminuindo no sentido radicular (Figura 10B), tornando-se células cúbicas no terço apical da raiz<sup>139</sup>.

Por outro lado, os odontoblastos são mais numerosos (por unidade de área) na coroa do que na raiz. Como consequência a camada odontoblástica apresenta um aspeto de pseudo-estratificação na porção coronária (Figuras 10A e 11) enquanto que na raiz (Figura 10B) permanece com a aparência de uma única camada de células<sup>127, 128, 139</sup>.

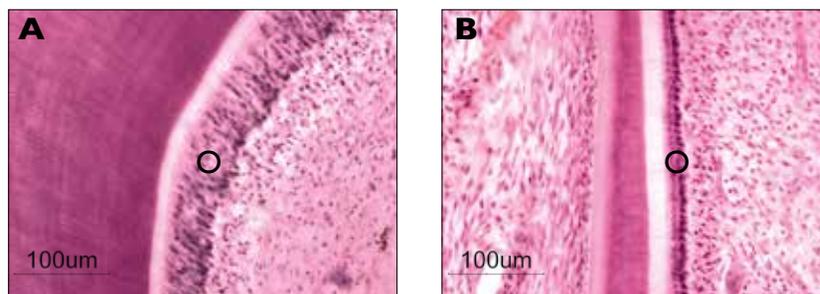


Figura 10. Aspeto da diferença em altura e número de células odontoblásticas (O) verificado entre a porção coronária (A) e a porção radicular (B). Corte histológico efetuado em material descalcificado, HE.

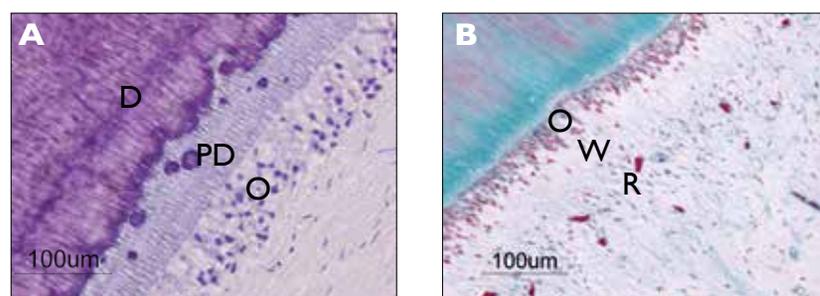


Figura 11. **A)** Aspeto histológico da camada de odontoblastos (O) adjacentes à pré-dentina (PD) e à dentina coronária (D) observado em material não descalcificado, Azul de toluidina. **B)** Imagem de uma zona odontoblástica (O), de uma zona oligocelular de Weil (W) e de uma zona rica em células (R) observada numa região periférica do complexo pulpo-dentinário. É também visível parte da área central da polpa. Corte histológico efetuado em material descalcificado, TM.

De referir também que os corpos celulares dos odontoblastos, apresentam, à semelhança de células epiteliais, uma típica rede terminal de microfilamentos (*terminal web*), estabelecendo ainda íntimos contactos entre si através de numerosas junções intercelulares. Estes complexos juncionais observados na camada de odontoblastos compartimentalizam parcialmente a dentina e pré-dentina em relação à polpa<sup>138</sup>. Estas junções funcionam também como importantes barreiras que controlam o fluxo de iões e outras moléculas para dentro e para fora da matriz dentinária<sup>127, 147</sup>.

### 3.3.2 Composição da matriz dentinária

A matriz dentinária madura é composta aproximadamente por 70% de material inorgânico, 20% de material orgânico e 10% de água. O principal componente inorgânico da dentina é formado por cristais de hidroxiapatite. Os cristais de hidroxiapatite são diferentes dos “megacristais” observados no esmalte, sendo mais pequenos, delgados e semelhantes a agulhas, ou seja mais parecidos com os encontrados na matriz óssea<sup>148</sup>. Tal como na matriz óssea, os cristais de hidroxiapatite presentes na matriz dentinária apresentam uma orientação paralela as fibras de colagénio, ocupando os espaços entre as moléculas de tropocolagénio<sup>127, 139, 147</sup>.

Os componentes orgânicos consistem fundamentalmente em proteínas, sendo a que mais se destaca o colagénio tipo I. Dentro das proteínas não colagénicas temos a considerar a fosfoproteína dentinária (DPP), a proteína da matriz dentinária I (DMP I), as sialoproteínas dentinárias (DSP), a osteopontina (OPN), a osteonectina, a osteocalcina, a proteína Gla da dentina (semelhante a osteocalcina) e as sialoproteínas óssea (BSP). Para além disso, a matriz dentinária contém ainda alguns proteoglicanos e pequenas quantidades de fosfolípidos e proteínas do soro como a albumina<sup>127, 139, 149-151</sup>.

Na matriz dentinária estão também incorporados numerosos fatores de crescimento desempenhando um papel determinante, senão mesmo fundamental, na diferenciação das células estaminais em células odontoblasticas e pulpares aquando dos processos de reparação/ regeneração do complexo pulpo-dentinário<sup>127</sup>. Este assunto, devido à sua importância será novamente abordado em parágrafos posteriores.

### 3.3.3 Zona central da polpa

Sem considerar a sua porção periférica (camada de odontoblastos e região sub-odontoblastica que compreende a região oligocelular de Weil e a zona rica em células), a polpa dentária é formada maioritariamente por um tecido conjuntivo laxo<sup>127, 139</sup>.

A sua população celular está representada essencialmente por fibroblastos, mas também por macrófagos, células dendríticas e linfócitos (células típicas do sistema imunológico) e por células estaminais mesenquimatosas indiferenciadas<sup>149, 150</sup>, para além de fibras nervosa mielínicas, amielínicas e capilares sanguíneos e linfáticos. Toda esta população celular desempenha no seu conjunto, uma atividade indutora (particularmente manifesta durante o processo de amelogénese), formativa (capacidade dentinogénica que se mantém durante toda a vida do dente), nutritiva (a polpa nutre a dentina através de uma rede vascular pulpar), sensitiva (a polpa, através de nervos sensitivos, responde aos diferentes estímulos agressores da dentina) e defensiva ou reparadora. De notar também, que o tecido pulpar é muito innervado e vascularizado, desempenhando estas características um papel crítico na sua homeostase<sup>150, 152-154</sup>. A respeito do seu sistema microcirculatório convém referir que a polpa não possui um sistema colateral verdadeiro sendo relativamente dependente de algumas

poucas arteríolas que atravessam o *foramen* apical. Do mesmo modo, a sua inervação exerce um papel significativo na biologia pulpar<sup>53</sup>.

A função primária da polpa será sem dúvida a síntese de dentina, que inclui a dentina primária (formada durante o desenvolvimento do órgão dentário até à fase de erupção), secundária (durante toda a vida do dente) e terciária (em resposta a estímulos agressores)<sup>53</sup>.

Quando os odontoblastos primitivos são destruídos, as células estaminais /progenitoras presentes maioritariamente na zona central da polpa são capazes de se diferenciar em odontoblastos (secundários), se induzidos por estímulos apropriados. É nestas situações que os fatores de crescimento e moléculas bioativas são libertados da matriz dentinária podendo induzir as células estaminais da polpa dentária no sentido de odontoblastos e desencadear a síntese de dentina reparadora<sup>150-155</sup>.

A capacidade de resposta do complexo pulpo-dentinário a estímulos externos e a fatores libertados pela matriz dentinária, é facilmente reconhecida pela sua capacidade de síntese de dentina terciária. O termo dentina terciária tem, no entanto, de ser subdividido em dentina reacional (formada pelos odontoblastos primários/originais) ou reparadora (que envolve uma sequência biológica mais complexa que inclui a migração, proliferação e diferenciação de células indiferenciadas no sentido odontoblástico)<sup>128, 149, 150, 152, 154, 156</sup>.

A dentina terciária reacional constitui uma resposta a estímulos ligeiros, não letais para estas células, podendo considerar-se, pelo menos parcialmente, como uma extensão da dentinogénese fisiológica, em que os odontoblastos primários são estimulados para uma maior atividade sintética e secretora, bem acima do estado basal em que habitualmente se encontram<sup>127, 128, 152, 154, 157</sup>. Após estimulação destes odontoblastos inicia-se uma deposição de dentina a um ritmo semelhante ao da dentina primária, nas zonas subjacentes aos locais de agressão, representando uma barreira de proteção para a polpa<sup>128, 157</sup>. Apesar desta continuidade, a dentina terciária reacional encontra-se separada da dentina secundária fisiológica por uma linha de demarcação, denominada linha cálcio-traumática<sup>158</sup>.

A dentina terciária reparadora observa-se em resposta a agressões mais severas e depende da capacidade da polpa em formar novas células semelhantes a odontoblastos/ *odontoblast-like* que se assumem como odontoblastos secundários, diferenciados a partir de células mesenquimatosas indiferenciadas. Estes novos odontoblastos podem formar-se por dois mecanismos distintos: a) a partir de células odontoblásticas latentes e pré-determinadas (existentes geralmente na zona rica em células constituinte da região sub-odontoblástica) que não necessitam de qualquer replicação de ADN para se diferenciarem em odontoblastos funcionais e b) a partir de células mesenquimatosas muito indiferenciadas, presentes geralmente nos nichos de células estaminais da polpa<sup>127, 138, 154, 159-161</sup>.

A perda da camada contínua de odontoblastos expõe a camada de pré-dentina não calcificada que, contém as formas solúvel e insolúvel de TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  I, BMP-II, IGF-I, TGF- $\beta$ , IGF-2 e VEGF bem como outros fatores de crescimento que atraem e promovem a proliferação e a diferenciação de células estaminais e a formação de novos vasos sanguíneos. Também, durante a progressão dos

processos de cárie, os ácidos bacterianos solubilizam a matriz da dentina calcificada libertando muitos dos fatores de crescimento aí presentes (TGF- $\beta$ 1,3, FGFb, BMP-2, 4, 7, IGF-I, TGF- $\beta$ , IGF-I IGF-II, e VEGF) para se difundirem para a polpa, estimulando assim e do mesmo modo a síntese de dentina reparadora<sup>127, 151, 152, 154, 159, 162, 163</sup>.

De facto, está hoje bem demonstrado que os sinais quimiotáticos responsáveis pelo recrutamento e diferenciação odontoblástica resultam maioritariamente da libertação de fatores de crescimento sequestrados na matriz dentinária, aquando da sua desmineralização<sup>127, 152, 154</sup>. Todos estes elementos influenciam e regulam os mecanismos de dentinogénese reacionária e reparadora, associados ao aparecimento de dentina terciária. A este respeito, importa salientar também, entre o *cocktail* de fatores de crescimento presentes na matriz dentinária madura, a existência de vários fatores angiogénicos. A libertação destes elementos representa um importante estímulo ao desenvolvimento dos processos de angiogénese nos locais de agressão influenciando também, ainda que indiretamente, o *pool* de células progenitoras perivasculares<sup>147, 152, 154, 163, 164</sup>.

De notar, contudo, que a substituição dos odontoblastos primários perdidos se efetua geralmente por um número substancialmente menor (cerca de 50 %) de odontoblastos secundários e bastante mais espaçados entre si<sup>165</sup>. Esta dentina reparadora apresenta frequentemente uma estrutura tubular irregular, ou mesmo atubular, inconstante e descontínua com a estrutura da dentina primária e secundária adjacente<sup>127, 149</sup>.

### 3.3.4 Composição da matriz extracelular da polpa

A polpa dentária, tal como os restantes tecidos conjuntivos do organismo, é formado por células e por matriz extracelular (MEC). A matriz extracelular faz a ligação das células entre si, influenciando também a sua sobrevivência, desenvolvimento, forma e comportamento. Na verdade, a maioria das células necessita de uma MEC para crescer, proliferar e, em muitos casos, sobreviver<sup>139, 148</sup>.

Na constituição desta MEC estão presentes vários grupos de moléculas. Um primeiro grupo compreende os componentes fibrilares que incluem diferentes variedades de colagénios que fornecem resistência à matriz onde se encontram inseridos, a elastina, que confere aos tecidos a propriedade de distensão e retração e a fibronectina e laminina, que exercem prioritariamente funções de adesão celular. Um segundo grupo engloba os componentes não fibrilares como as glicoproteínas não colagénicas e os proteoglicanos que no seu conjunto constituem o que habitualmente se designa por substância fundamental<sup>127, 128</sup>. A substância fundamental é geralmente caracterizada como sendo amorfa, de aspeto transparente ou translúcido, com a consistência de um gel<sup>166</sup>. As células que elaboram as fibras do tecido conjuntivo sintetizam também a maioria dos componentes da substância fundamental<sup>139, 148</sup>.

A fibronectina constitui o componente major do grupo das glicoproteínas. Pelas suas características químicas interage com a família das integrinas e, deste modo, está envolvida na adesão,

migração, diferenciação e crescimento celular desempenhando um papel preponderante no desenvolvimento embrionário e nos processos de reparação tecidual<sup>127, 167</sup>. Esta glicoproteína tem uma grande capacidade de adesão pelo facto de possuir uma sequência de aminoácidos específica, arginina, glicina e ácido aspártico (*Arg-Gly-Asp*), vulgarmente conhecida por RGD. Esta sequência atua como um recetor celular tendo grandes responsabilidades quimiotáticas e de adesão. Com efeito as células mesenquimatosas indiferenciadas aderem facilmente à fibronectina, bem como à vitronectina e à laminina, todas proteínas contendo RGDs<sup>168-170</sup>.

Ainda dentro deste segundo grupo, podemos considerar, os glicosaminoglicanos e os proteoglicanos, moléculas polianiónicas cuja presença nos tecidos, ao permitir a retenção de água, lhes confere um aspeto gelatinoso. Os glicosaminoglicanos (GAG) são um grupo heterogéneo de cadeias polissacarídeas ligadas a um núcleo proteico. A função primária destes GAGs é agir como moléculas adesivas que aderem à superfície celular ou a outras moléculas da matriz<sup>127, 128</sup>. Este assunto devido à sua importância será novamente abordado em parágrafos posteriores.

A consistência do tecido conjuntivo pulpar é determinada pelos componentes proteoglicanos da substância fundamental. As longas cadeias de GAGs das moléculas de proteoglicanos são muito hidrofílicas e deste modo, têm a capacidade de reter grande quantidade de água, formando assim um gel característico<sup>166</sup>. O conteúdo aquoso da polpa jovem é muito alto (aproximadamente 90%), de modo que a substância fundamental forma uma almofada capaz de proteger as células e os componentes vasculares<sup>127</sup>.

A renovação das macromoléculas da MEC é crucial para uma grande variedade de processos biológicos. Este mecanismo é essencial para o normal desenvolvimento embrionário, durante os processos de morfogénese dos tecidos e sua remodelação. Os componentes da matriz são degradados por enzimas proteolíticas designados maioritariamente por metaloproteinases da matriz. Algumas proteases como as colagenases, hialuronidasas e condroitino-sulfatases são exemplos de enzimas hidrolíticas que podem degradar os componentes da substância fundamental<sup>53, 139</sup>.

A degradação da substância fundamental pode ocorrer também, em certas lesões infecciosas e inflamatórias devido a uma alta concentração de macrófagos e respetivas enzimas lisossómicos, para além das proteases de origem bacteriana. Nestas situações as propriedades físicas do tecido pulpar podem estar bastante alteradas. Com efeito, o desenvolvimento e progressão dos processos inflamatórios e infecciosos é fortemente influenciado pelo estado de polimerização da substância fundamental<sup>53, 139</sup>.

### **3.4 Desenvolvimento radicular**

Uma vez completa a forma da coroa inicia-se a formação e desenvolvimento da raiz. Os tecidos que compõem o periodonto de inserção são também formados nesta fase, acompanhando de perto o crescimento da raiz do dente.

Considerando que a porção radicular do dente é também constituída por dentina, a presença de células de natureza epitelial e os mecanismos de interação epitélio mesênquima, continuam a ser necessários para se poder processar a diferenciação odontoblástica. Com este objetivo, dá-se o aparecimento e desenvolvimento da bainha radicular epitelial de Hertwig (HERS - *Hertwig epithelial root sheath*), considerada como uma especialização da ansa cervical (resultante da fusão do epitélio interno e externo do órgão de esmalte)<sup>52, 127</sup>.

A fase de raiz decorre durante a erupção do dente, ou seja, o crescimento radicular ocorre porque o dente começa o seu processo de erupção e conseqüentemente o seu deslocamento em sentido oclusal. Como acabámos de referir, a presença da HERS vai induzir a diferenciação das células mesenquimatosas adjacentes (localizadas na região mais periférica da papila dentária) em células odontoblásticas e a síntese e mineralização da dentina radicular, desempenhando um papel fundamental como indutor e modulador da raiz do dente<sup>127, 139</sup>.

Por outro lado a desintegração gradual por fragmentação desta bainha, forma uma rede fenestrada em redor do dente, dando origem aos restos epiteliais de Malassez (ERMs - *epithelial rests of Malassez*) que permite o estabelecimento de zonas de contacto das células do folículo dentário com a dentina radicular em formação. Após contactar com a dentina recém formada e sob influência da HERS/ERMs as células do ectomesênquima constituintes do folículo dentário diferenciam-se em cementoblastos, células responsáveis pela formação da matriz do cimento. Por sua vez as células mais periféricas do folículo dão origem a osteoblastos, formando o osso alveolar propriamente dito, enquanto as da região central se diferenciam maioritariamente em fibroblastos, responsáveis pela síntese dos diferentes feixes de fibras de colagénio do ligamento periodontal<sup>127, 139, 171</sup>.

Uma vez que todas estas estruturas (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) se formam ao mesmo tempo, as fibras de colagénio do ligamento periodontal ficam inseridas tanto no cimento como no tecido ósseo<sup>52, 138</sup>.

O cimento, ligamento periodontal e osso alveolar propriamente dito, estruturas todas derivadas do saco ou folículo dentário são, no seu conjunto, responsáveis pela ancoragem do dente ao alvéolo dentário, evoluindo de maneira integrada e coordenada com a formação da dentina radicular<sup>52, 127, 138</sup>.

Quando os dentes permanentes começam a aparecer na cavidade oral, somente dois terços do comprimento radicular das suas raízes estão formados. Com efeito, Torneck *et al.*<sup>172</sup> salientam que, quando um dente erupciona na cavidade bucal, a formação radicular não está completa, mostrando uma região apical ainda em desenvolvimento, com um *foramen* apical amplamente aberto, circundado por uma estreita banda de dentina. Serão necessários aproximadamente cerca de mais três anos para que se complete a formação radicular e o encerramento apical<sup>52</sup>.

Neste fase de desenvolvimento do órgão dentário, Tziafas e Kodonas<sup>24</sup> consideram na área do ápice radicular imaturo quatro zonas anatómicas diferentes, todas elas constituídas por células com origem no ectomesênquima: I) o saco dentário, que rodeia externamente a HERS e que é responsável

pelo desenvolvimento do periodonto, 2) a polpa radicular propriamente dita, envolvida pela camada de odontoblastos, pré-dentina e dentina circumpulpar, 3) uma área de papila dentária, adjacente e em continuidade com a polpa radicular, rodeada pela HERS, formando uma zona intermédia entre a polpa e a papila apical, muitas vezes reconhecida como fazendo parte da polpa radicular e, por último, 4) uma região que constitui a porção mais apical do gérmen dentário, formando uma zona distinta, designada por papila apical, encontrando-se localizada para apical do diafragma epitelial e rodeada pelo folículo dentário.

#### 3.4.1 Papila Apical

Durante o processo de formação da raiz, o remanescente dos tecidos mesenquimatosos constituintes da papila dentária, adquirem uma localização apical em relação ao tecido pulpar propriamente dito, constituindo uma região com uma importância fundamental nos processos de formação da dentina radicular<sup>98</sup>. As características morfológicas e funcionais da papila apical e da junção polpa/papila apical não são habitualmente referidas, nos livros de texto, apresentando, no entanto, segundo Sonoyama *et al.*<sup>95</sup> particularidades muito interessantes e de extrema importância, que só recentemente foram valorizadas.

De facto, estes autores foram os primeiros investigadores que apresentaram uma análise detalhada desta região, diferenciando esta zona da restante região pulpar, tendo identificado nesta área a existência de uma população de células estaminais mesenquimatosas com um grande potencial regenerativo do complexo pulpo-dentinário, que designaram por células estaminais da papila apical (SCAPs)<sup>95</sup>. Com efeito, a eficácia dos processos de revascularização, incluídos nos recentes mecanismos de regeneração endodôntica, assentam numa estimulação e migração das células estaminais da papila apical para o espaço canal<sup>98</sup>.

A papila apical apresenta características físicas e morfofuncionais muito próprias. Esta estrutura (Figura 12) localizada, como já foi referido, para apical do diafragma epitelial está fracamente unida ao ápice radicular em desenvolvimento sendo, por este motivo, facilmente destacável<sup>95</sup>. Mas por outro lado, devido à sua localização anatómica e ao facto de estar rodeada pelo ligamento periodontal, esta formação parece beneficiar, entre outras razões, de uma circulação colateral que lhe permitirá eventualmente sobreviver numa situação de pulpíte irreversível e necrose pulpar, o que lhe confere uma maior resistência aos processos infecciosos e inflamatórios locais<sup>24</sup>.

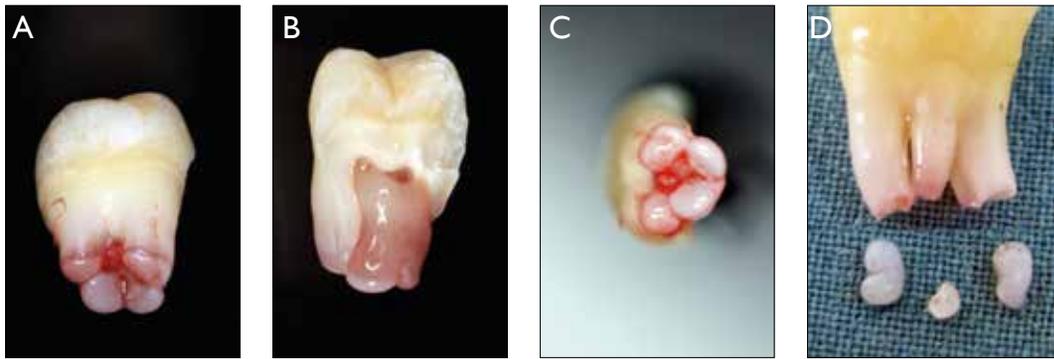


Figura 12. Aspectos macroscópicos da localização topográfica e conformação das papilas apicais de um dente humano permanente imaturo plurirradicular A), B) e C). D) Imagem de várias papilas apicais destacadas dos respectivos ápices radiculares.

Sob um ponto de vista histológico, Somoyama *et al.*<sup>95</sup> descrevem entre a polpa radicular propriamente dita e a papila apical a presença de uma zona constituída por uma densa camada de células (*apical cell rich zone*), separando estas duas regiões. Por sua vez a região da papila apical distingue-se da zona apical rica em células por conter uma menor densidade celular e um menor número de elementos vasculares (Figura 13).

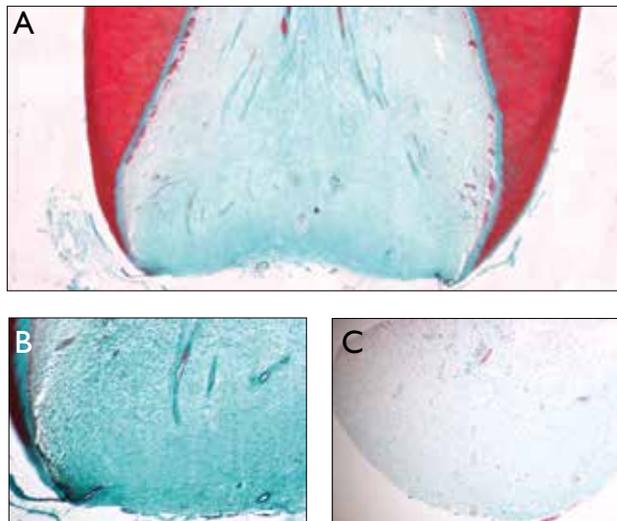


Figura 13. Aspetto da constituição histológica e localização da polpa dentária envolvida por dentina circumpulpar A) e B) maior ampliação de uma região representada em A), mostrando uma zona rica em células que caracteriza uma área de transição entre a polpa e a papila apical, localizada ao nível do diafragma epitelial. C) Papila apical mostrando, em relação às zonas anteriores, uma menor densidade de células e menor número de elementos vasculares.

A papila apical tem assumido recentemente, uma importância crescente enquanto fonte de células estaminais mesenquimatosas, com potencialidades imensas na formação e crescimento da polpa radicular, diferenciação dos odontoblastos responsáveis pela síntese e mineralização de dentina da raiz, bem como pelos processos de reparação e regeneração radicular do complexo pulpo-dentinário<sup>95, 98, 173</sup>. Este assunto pela sua crucial importância para uma correta interpretação dos resultados obtidos no estudo experimental desenvolvido neste trabalho será novamente e várias vezes abordado em parágrafos posteriores.

#### 3.4.2 Bainha radicular epitelial de Hertwig/restos epiteliais de Malassez

Como já foi referido, a formação da dentina e do cimento da raiz de um dente em desenvolvimento depende da presença da bainha radicular epitelial de Hertwig (HERS). Esta estrutura, tem origem na proliferação das células do epitélio interno e externo do órgão do esmalte ao nível da ansa cervical, uma vez terminada a síntese do esmalte. De facto, o desenvolvimento radicular começa quando a formação de esmalte e de dentina atingem a futura junção amelocementária. Nesta altura, o epitélio interno e externo do órgão do esmalte, não estão mais separados pelo estrato intermediário e pelo retículo estrelado, proliferando para apical e desenvolvendo uma dupla camada de células, ligeiramente achatadas, chamada bainha radicular epitelial de Hertwig. Muito precocemente a bainha epitelial resultante da proliferação das duas camadas da ansa cervical sofre uma dobra (Figura 14), constituindo o diafragma radicular epitelial<sup>52, 138</sup>. Com efeito, o diafragma epitelial vai rodear e reduzir a abertura apical da polpa. Durante o desenvolvimento radicular, o crescimento da HERS e do diafragma epitelial fecha a papila apical, com exceção de um pequena abertura na sua base, o *foramen* apical primário<sup>52, 128, 129</sup>.

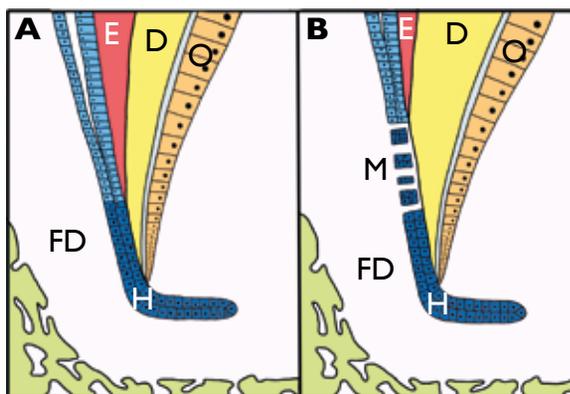


Figura 14: Esquema representativo do início do desenvolvimento (A) e fragmentação (B) da bainha radicular epitelial de Hertwig, bem como da formação do diafragma epitelial. Esmalte(E), Dentina(D), Odontoblastos(O), Folículo dentário (FD), Bainha Radicular de Hertwig Epitelial (H), Restos Epiteliais de Malassez(M). Adaptado de Katchburian e Arana, 2004<sup>138</sup>.

A HERS cumpre duas funções principais, sendo indutora e moduladora da raiz. A função indutora é exercida sobre as células da papila dentária, provocando a diferenciação dos odontoblastos responsáveis pela síntese da dentina radicular. Com efeito a camada interna da HERS parece desempenhar na raiz as mesmas funções indutoras exercidas pelo epitélio interno do órgão de esmalte durante o desenvolvimento coronário<sup>52, 95, 174</sup>.

A função moduladora, por sua vez, é responsável pelo delinear da forma da raiz(es), através da formação do diafragma epitelial, que pode adoptar diferentes conformações radiculares (uni, bi ou trirradicular)<sup>52</sup>.

Um dos eventos observados no início da cementogénese é uma rutura na continuidade da HERS e um certo afastamento da dentina radicular, formando então uma rede fenestrada. Através da malha desta rede as células do ectomesênquima do folículo dentário entram em contacto com a superfície da dentina radicular e diferenciam-se em cementoblastos<sup>175</sup>. Com base na extraordinária coleção de lâminas histológicas de Gottlieb <sup>cit in</sup><sup>176</sup> e de acordo com este investigador acreditava-se que uma vez estabelecida a rutura da HERS, esta estrutura não iria desempenhar mais nenhum papel importante na diferenciação dos cementoblastos. No entanto, estudos mais recente verificaram que a diferenciação dos cementoblastos necessita também da interação entre a HERS e as células do ectomesênquima do folículo dentário. Com efeito, o cimento parece ser formado por cementoblastos diferenciados a partir de células ectomesenquimatosas do folículo dentário sob influência da HERS <sup>177, 178</sup>. Existem a este respeito, como foi referido várias teorias, sendo hoje aceite que as células constituintes da HERS podem mesmo transformar-se em cementoblastos através de um processo de transdiferenciação epitélio-mesênquima<sup>179</sup>. Este processo é bastante mais frequente do que se julga, sobretudo nos mecanismos de embriogénese e tumorigénese, assumindo particular relevância no caso presente, uma vez que estas células são de natureza ectomesenquimatosas, sendo originárias das células epiteliais da crista neural e do mesênquima<sup>179</sup>.

Muitas das células provenientes da desintegração da HERS persistem no ligamento constituindo os restos epiteliais de Malassez (ERMs). Embora a função destes ERMs na homeostasia e organização dos tecidos periodontais esteja ainda longe de um completo esclarecimento, a sua presença parece desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento radicular, impedindo ao mesmo tempo o processo de reabsorção. Está também demonstrado o seu envolvimento em funções de reparação e regeneração tanto da polpa como dos tecidos periodontais, incluindo a sua influência nos mecanismos de apexogénese e cicatrização periodontal. Também nos processos de apexificação é atribuído aos ERMs uma participação importante na formação da barreira de cimento, sobretudo aquando da utilização do MTA<sup>174</sup>. Parece exercer também uma ação na manutenção da espessura do ligamento periodontal, impedindo a sua calcificação e deste modo prevenindo a anquilose dentoalveolar<sup>174</sup>.

No âmbito da histopatologia, parece estar comprovado que a HERS consegue sobreviver a periodontites apicais em dentes permanentes imaturos com polpa infetada. Deste modo, se a HERS sobreviver às lesões inflamatórias será capaz de induzir as células estaminais do ligamento periodontal para um processo de diferenciação em cementoblastos promovendo o desenvolvimento, reparação ou mesmo uma regeneração radicular, sobretudo à custa da formação de cimento. Do mesmo modo, nos casos em que a papila apical bem como a HERS resistiram a situações de periodontite apical, as

células estaminais da papila apical serão capazes (sobre a influência da HERS) de se diferenciarem em odontoblastos e produzir dentina radicular<sup>180</sup>.

Vários autores afirmam que após apexificação de dentes permanentes imaturos a HERS é mais resistente a situações de periodontite ou abscesso apical do que a própria papila apical<sup>70,181</sup>. Estes autores tais como Nanci<sup>127</sup> e David<sup>178</sup>, chegam mesmo a referir que o desenvolvimento radicular é regulado pela HERS e não pela papila apical. Com efeito, já Andreasen *et al.*<sup>182</sup> haviam demonstrado uma paragem parcial ou total na formação radicular após a extração parcial ou total da HERS. Por outro lado, e ainda neste mesmo estudo experimental, verificava-se um desenvolvimento radicular normal se a HERS não fosse traumatizada. Assim, a continuação do desenvolvimento radicular de um dente permanente imaturo com necrose pulpar, após revascularização parece estar bastante dependente da sobrevivência da HERS<sup>17</sup>.

Os restos epiteliais de Malassez podem sofrer uma intensa proliferação em condições patológicas e experimentais resultando na formação de quistos radiculares<sup>174</sup>. Segundo Nair *et al.*<sup>183</sup>, em aproximadamente 52% das lesões periapicais inflamatórias verifica-se uma proliferação dos ERMs, sendo considerada uma hiperplasia inflamatória. Esta proliferação celular parece ficar a dever-se a uma estimulação provocada pelas citocinas e quimioquinas produzidas durante a resposta imunoinflamatória periapical, maioritariamente associada aos processos de infeções radiculares. Tal como mostra a figura 15 durante os processos de periodontite apical as células do sistema imunitário (macrófagos ativados, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T e fibroblastos) presentes nos tecidos periapicais, produzem vários tipos de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, histaminas) citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF) e fatores de crescimento (PDGF, KGF, EGF, IGF, TGF- $\alpha$ ) capazes de estimularem a proliferação dos restos epiteliais de Malassez<sup>184</sup>.

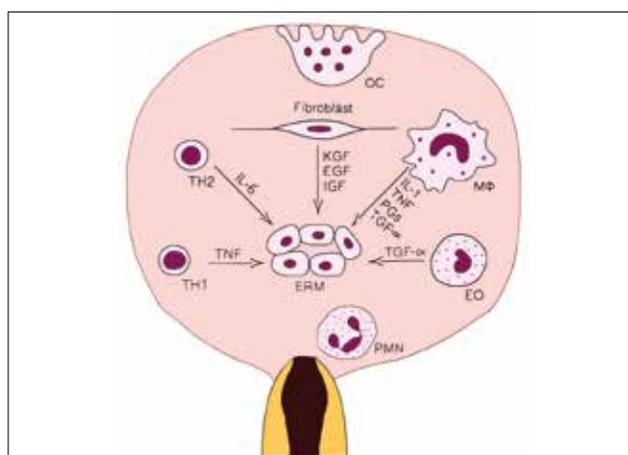


Figura 15. Ilustração esquemática dos principais mecanismos responsáveis pela ativação e proliferação dos restos epiteliais de Malassez (ERMs) numa situação de necrose pulpar com periodontite apical. Macrófagos ativados (MΦ), neutrófilos (PMN), eosinófilos (EO), linfócitos T (TH1 e TH2) e fibroblastos. Adaptado de Lin<sup>184</sup>.

Esta situação, observada na periodontite apical parece estar diretamente relacionada com a gravidade do processo inflamatório em questão, cessando na maioria das lesões periapicais quando é removido o estímulo causador, excepto no caso de quistos apicais verdadeiros<sup>184</sup>. De referir ainda que, a maioria dos mediadores inflamatórios relacionados com a proliferação dos ERM's medeiam também os mecanismos de reabsorção óssea que acompanham as periodontites apicais<sup>184</sup>.

### 3.5 Cimento e Cementogénese

Considerando que o cimento é talvez o tecido mineralizado mais frequentemente encontrado no espaço canal, durante os procedimentos experimentais efetuados e descritos no trabalho experimental entendemos proceder a uma pequena exposição acerca deste tecido, constituindo deste modo uma base de apoio morfofuncional aos estudos experimentais.

Como é de conhecimento geral, os órgãos dentários são constituídos por três variedades de tecidos mineralizados (esmalte, dentina e cimento) em íntima associação. Esta situação para além do cavidade oral, não é encontrada nos mamíferos em nenhum outro local<sup>139</sup>.

O cimento é um tecido conjuntivo mineralizado avascular e sem inervação, por vezes bastante heterogéneo, que reveste a dentina das paredes radiculares. A estrutura e composição do cimento é muito semelhante à do tecido ósseo, apresentando-se também constituído por uma fase mineral de hidroxiapatite, assente numa base colagénica<sup>128</sup>.

De facto, a matriz orgânica do cimento é composta essencialmente por colagénio tipo I, contendo, no entanto, colagénio do tipo III e do tipo XII. Relativamente ao colagénio tipo III, pode afirmar-se que esta variedade é encontrada em altas concentrações durante as fases iniciais de desenvolvimento e ainda durante os processos de regeneração e reparação<sup>127</sup>.

A matriz do cimento contém ainda uma grande variedade de proteínas não colagénicas que embora em muito pequenas quantidades, são essenciais para a ligação do colagénio aos cristais de hidroxiapatite durante processo de mineralização. Neste âmbito, temos a considerar entre outros a fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, sialoproteína dentinária, proteína da matriz dentinária I, osteocalcina, fibronectina, osteonectina, osteopontina e proteoglicanos<sup>127, 147</sup>.

As proteínas constituintes da matriz do esmalte (principalmente da família das amelogeninas), parecem também fazer parte da matriz do cimento, ainda que a sua presença não tivesse sido demonstrada de forma convincente nem por técnicas de imunohistoquímica nem por técnicas de hibridações moleculares<sup>127</sup>.

Em contraste com o esmalte e com a dentina que não levantam qualquer dúvida quanto à origem das suas células mãe, a formação do cimento permanece mais enigmática. A contribuição tanto das células mesenquimatosas do folículo dentário como das células epiteliais de bainha radicular de Hertwig, apresentam-se (ambas) como prováveis candidatas responsáveis pelos processos de cementogénese, sendo base de numerosos debates<sup>127, 128, 139, 147</sup>.

### 3.5.1 Variedades de Cimento

Sem pretender fazer uma descrição exaustiva das diferentes variedades de cimento existentes, baseadas nas suas características histológicas, origem, localização e função, descrevemos apenas as especificidades mais relevantes, das duas principais variedades de cimento.

Histologicamente, o cimento é classificado de acordo com a ausência ou presença de células (acelular ou celular) e quanto à origem e disposição das fibras colagénicas da sua matriz. Quando as fibras de colagénio que constituem o cimento são provenientes do ligamento periodontal são referidas como fibras extrínsecas. Estas fibras, habitualmente designadas por fibras de Sharpey, tem uma orientação perpendicular ou oblíqua à superfície radicular. Quando são produzidas pelos cementoblastos são referidas como fibras intrínsecas, correndo paralelamente à superfície radicular e perpendicularmente às fibras extrínsecas<sup>52, 185</sup>.

A formação do cimento pode também dividir-se em duas fases. Uma fase pré-funcional (primário) que ocorre durante o desenvolvimento da raiz, seguindo-se uma fase funcional (secundário) que começa quando o dente entra em oclusão. Estas duas formas de cimento apresentam também diferentes características estruturais e funcionais<sup>52, 127</sup>.

Sob um ponto de vista topográfico, estas variedades de cimento estão também distintamente localizadas. Com efeito, o cimento acelular ou primário relacionado com o início da cementogénese, observa-se numa posição mais cervical (terço cervical e médio da raiz) enquanto o cimento celular ou secundário se desenvolve mais tardiamente ocupando uma posição mais apical, estando normalmente situado no terço apical e nas zonas interradiculares/furca<sup>52, 128</sup>.

As variações histológicas e topográficas encontradas parecem estar também relacionadas com diferenças moleculares, celulares e funcionais próprias de cada uma destas variedades de cimento<sup>128, 185</sup>.

#### 3.5.1.1 Cimento acelular de fibras extrínsecas (cimento primário)

Esta variedade de cimento, apresenta-se geralmente como uma camada muito fina, composta por uma grande densidade de feixes de fibras colagénicas incorporadas numa matriz granular mineralizada<sup>128</sup>. Neste tipo de cimento, a maioria das fibras de colagénio é proveniente dos fibroblastos do ligamento periodontal constituindo as fibras de Sharpey, porém a substância fundamental parece ser produzida pelos cementoblastos<sup>185</sup>.

Durante o desenvolvimento da raiz do dente, a HERS depois de induzir a diferenciação dos odontoblastos começa a desintegrar-se, expondo o recém formado manto de dentina às células do folículo dentário. Este processo vai coincidir com a diferenciação dos primeiros cementoblastos que se vão alinhar ao longo do manto de dentina ainda não mineralizada. A mineralização da dentina do manto processa-se do interior para o exterior, mas não atinge a periferia dentinária até que as fibrilhas colagénicas da dentina e do cimento não estejam suficientemente integradas e misturadas

entre si. Este facto permite uma forte ligação entre estes dois tecidos, dentina e cimento. Na camada mais superficial, estas fibrilas formam uma pequena franja fibrosa (*short fiber fringe*) (Figuras 16 e 17A) que se estende perpendicularmente à superfície radicular<sup>128, 139</sup>.

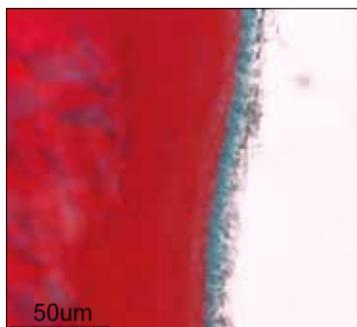


Figura 16. Aspeto histológico do cimento acelular de fibras extrínsecas situado no terço cervical da raiz de um dente humano, formando uma franja fibrosa. (Corte de material descalcificado, TM).

Este tipo de cimento encontra-se a partir da margem cervical recobrindo, como já foi descrito, os dois terços coronais da superfície radicular da dentina, apresentando pelas suas características estruturais uma função essencialmente de ancoragem<sup>127, 128</sup>.

### 3.5.1.2 Cimento celular de fibras intrínsecas (cimento secundário)

A formação de cimento celular de fibras intrínsecas (Figura 17B) é iniciada quando o dente entra em oclusão. A sua velocidade de síntese é maior que a do cimento acelular (Figura 17A), pelo que os cementoblastos ficam aprisionados na matriz designando-se por cementócitos e as linhas incrementais apresentam-se mais afastadas, espessas e irregulares.

Quando comparado com o tecido ósseo esta variedade de cimento apresenta uma organização bastante mais desestruturada e uma matriz menos mineralizada. Os cementócitos têm uma rede de canálculos mais incompleta, que muitas vezes, não atinge a superfície. Assim, os cementócitos das camadas mais profundas, podem apresentar uma perda de organelos e, conseqüentemente, perda de função, podendo mesmo presumir-se que estas células entrem facilmente em apoptose. Isto pode refletir a fraca capacidade de preservação das camadas mais profundas do cimento celular de fibras intrínsecas<sup>127, 139</sup>.

Os feixes de fibras colagénicas são orientados paralelamente à superfície radicular dispondo-se de uma forma circular ou espiral em torno da dentina, sem que se forme uma conexão semelhante às fibras de Sharpey (perpendiculares). Por esta razão e pela sua celularidade esta variedade de cimento (cimento celular de fibras intrínsecas) não assume uma relevante função de ancoragem mais sim um importante papel de adaptação e reparação<sup>127</sup>. Com efeito, esta variedade de cimento encontra-se essencialmente na zona apical e nas furcas e tem como principal função a adaptação a

estímulos. De facto, o cimento celular formado durante um processo de cicatrização, é essencialmente sintetizado como uma resposta SOS, isto é, como uma resposta rápida formada com carácter de urgência num curto período de tempo. Este tipo de cimento pode igualmente ser identificado em lacunas de reabsorção radicular de cimento e dentina e em locais de fratura radicular, evidenciando assim também funções reparativas e regenerativas<sup>139, 185</sup>.

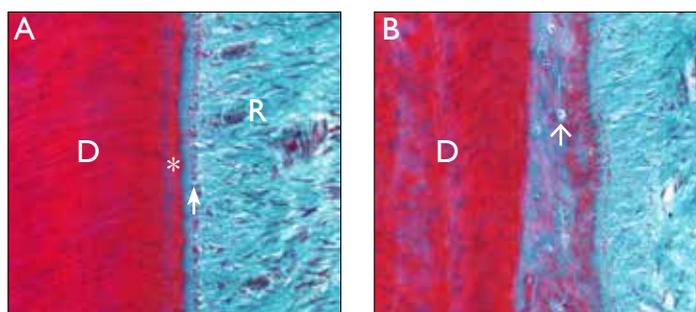


Figura 17. Imagens histológicas mostrando as características do cimento acelular (A) e do cimento celular (B), num 2º PM inferior de cão Beagle. Dentina (D), cimento acelular (\*), cementoblastos (↑), cementócitos (↑), ligamento periodontal, restos epiteliais de Malassez (R) (corte de material descalcificado 400X no original, TM).

Conforme já foi referido estas duas variedades de cimento podem ter origem em diferentes populações celulares: células mesenquimatosas do folículo dentário e células epiteliais de bainha radicular de Hertwig<sup>127, 139, 186</sup>. A tabela I apresenta uma sinopse das principais diferenças fenotípicas entre os cementoblastos do cimento celular e acelular.

Tabela I. Diferenças fenotípicas observadas entre os cementoblastos constituintes do cimento celular e acelular.

<b>Cementoblastos do cimento acelular</b>	<b>Cementoblastos do cimento celular</b>
Morfologia semelhante a fibroblasto	Morfologia semelhante a osteoblasto
Derivados da bainha epitelial	Derivados do ectomesênquima
Expressam citoqueratina	Não expressam citoqueratina
Não expressam osteocalcina	Expressam osteocalcina
Não expressam recetores para a paratormona	Expressam recetores para a paratormona
Não expressam TGF- $\beta$ e IGF	Expressam TGF- $\beta$ e IGF

Como nota final, convém recordar mais uma vez, que numa perspetiva biomecânica, estes dois tipos de cimento apresentam uma diferente união entre dentina e cimento. Assim, pode afirmar-se que o cimento acelular de fibras extrínsecas, tendo em conta as suas características estruturais, apresenta uma forte ligação entre dentina e cimento, tendo a ancoragem como principal função. Este facto tem por base um processo lento de mineralização do manto da dentina, que só se completa depois de uma forte interligação entre as fibras de colagénio constituintes destes diferentes tecidos, associado a uma disposição perpendicular das fibras de colagénio<sup>127, 128, 139</sup>.

A este respeito é interessante referir que nos roedores, o cimento acelular de fibras extrínsecas forma-se quando a dentina já esta mineralizada tornando muito mais frágil a ligação entre estas duas interfaces<sup>185</sup>. Na verdade os cortes histológicos efetuados em dentes de roedores mostram com muita frequência no terço cervical da raiz uma separação entre dentina e cimento<sup>127, 139</sup>.

Em relação ao cimento celular de fibras intrínsecas, a natureza e disposição das suas fibras de colagénio, velocidade de síntese da matriz e a presença de células confere-lhe um maior capacidade de adaptação e reparação do que propriamente de ancoragem<sup>128</sup>. De sublinhar porém que aquando dos processos de reparação numa zona de dentina previamente reabsorvida esta variedade de cimento celular apresenta uma forte adesão à superfície radicular em questão. Este facto, fica provavelmente a dever-se à atividade dos odontoclastos, que não só removem a fase mineral do tecido, como preparam a superfície reabsorvida para uma nova formação e deposição de matriz. Neste âmbito existe a possibilidade dos odontoclastos deixarem exposta no tecido reabsorvido a malha de fibras de colagénio, formando uma franja fibrosa que facilite a interligação e integração com a nova matriz de cimento reparador, recapitulando o processo de cementogénese. Deste modo desenvolve-se uma forte ligação entre o tecido reparado e o tecido reparador<sup>127, 128, 139</sup>.

Muitos destes aspetos serão novamente abordados, na discussão dos resultados. Engenharia de tecidos /Endodontia regenerativa

O desenvolvimento de estratégias terapêuticas em engenharia de tecidos assenta tradicionalmente numa tríade regenerativa<sup>187-189</sup> constituída por três elementos básicos que têm de interagir entre si: 1) matrizes de suporte capazes de guiar e apoiar a formação do tecido a regenerar, 2) moléculas de sinalização com capacidade para estimular as células no sentido pretendido e 3) células competentes capazes de uma resposta eficaz. A aplicação clínica deste conjunto baseia-se geralmente numa estratégia *ex vivo* em que se efetua primeiro a confecção *in vitro* de um sistema matriz/moléculas de sinalização/células (cultivadas e expandidas previamente) e só depois a sua implantação *in vivo* para estimular o processo regenerativo.

Tendo em conta que os procedimentos envolvidos na endodontia regenerativa, visando a restauração morfofuncional do complexo pulpo-dentinário, para substituir uma polpa lesionada ou ausente, assentam na aplicação dos mesmos princípios de engenharia de tecidos, pareceu-nos vantajoso apresentar algumas considerações acerca de cada um destes três pilares, mas apresentados essencialmente numa perspetiva de regeneração pulpar.

Mais recentemente, tem vindo a enfatizar-se, para além da clássica tríade regenerativa, um quarto elemento (Figura 18) de reconhecida importância nos procedimentos regenerativos endodônticos, relacionado com a criação de um microambiente favorável para uma adequada regeneração funcional dos tecidos lesados<sup>26</sup>. Com efeito, a existência de um meio o mais estéril possível é considerado um dos pré-requisitos mais importantes nestes processos.

Num tratamento de polpa vital (proteção pulpar direta ou indireta) e nos procedimentos de regeneração dentinogénica, o selamento coronário realizado através de uma restauração bem

adaptada é fundamental para prevenir a microinfiltração bacteriana e consequente contaminação pulpar (ou local de exposição pulpar), procedimento crucial para uma reparação/regeneração do complexo pulpo-dentinário<sup>27,32</sup>.

Do mesmo modo, o passo mais crítico nos mecanismos de revascularização dos canais radiculares consiste na antissepsia dos sistemas canulares, conseguida através da aplicação de irrigantes (NaOCl) e/ou medicação intracanal (hidróxido de cálcio ou pasta de antibióticos, como por exemplo uma mistura de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) durante várias semanas<sup>30</sup>.

Neste âmbito, e segundo Malhotra *et al.*<sup>26</sup> apresentamos na figura 18 uma representação esquemática dos elementos chave a ter em consideração nos mecanismos de endodontia regenerativa.

Por outro lado, há que ter em conta que a engenharia de tecidos mesmo quando alicerçada nos seus pilares básicos, requer o rápido desenvolvimento de uma rede vascular sem a qual qualquer estratégia regenerativa não pode ser bem sucedida. De facto, os processos de angiogénese constituem um pré-requisito essencial em todos os mecanismos de regeneração tecidual<sup>35, 190</sup>. Todavia, os processos de regeneração do espaço pulpar, apesar do seu pequeno volume constituem sempre um grande desafio devido não só à sua complexa organização, mas também ao facto das suas características anatómicas não serem favoráveis ao rápido desenvolvimento de uma vascularização eficaz. Deste modo a otimização de mecanismos pró-angiogénicos adquirem uma importância crucial no campo da regeneração pulpar, pelo que serão também alvo de uma pequena referência<sup>191</sup>.

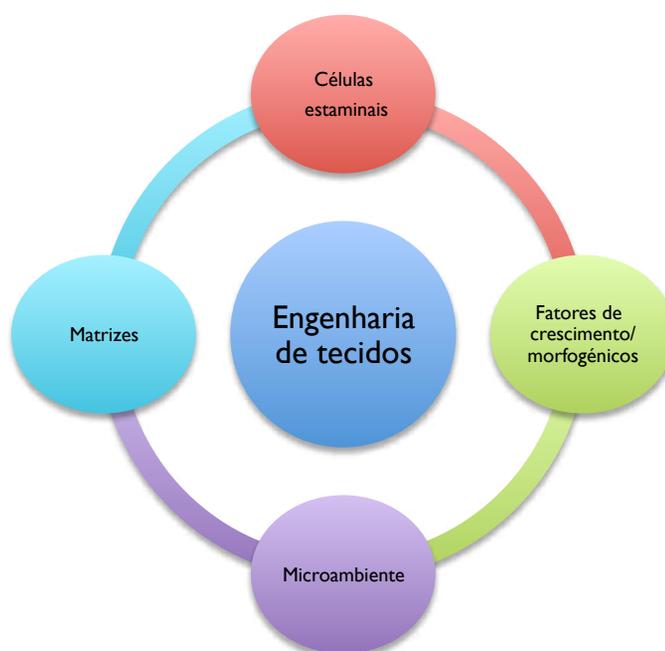


Figura 18. Esquema representativo dos elementos básicos subjacentes às estratégias de engenharia de tecidos. Para além da clássica tríade regenerativa (células estaminais, fatores de crescimento e matrizes) é também reconhecida a importância da criação de um microambiente favorável para uma adequada regeneração tecidual. Adaptado de Malhotra *et al.*<sup>26</sup>

#### 4.1 Matrizes

A endodontia regenerativa constitui uma forma ideal de terapia visando substituir tecidos pulpares afetados e/ou necróticos por tecidos pulpares sãos, justificando deste modo a utilização de matrizes. Na verdade as matrizes ao constituírem uma estrutura tridimensional de suporte são frequentemente aplicadas de forma a proporcionar condições biológicas e físico-químicas apropriadas para apoiar e guiar o crescimento e diferenciação celular, promovendo ao mesmo tempo, processos de adesão e migração celular<sup>35</sup>. No desenvolvimento de estratégias terapêuticas visando processos de reconstrução de tecidos, para substituição de tecidos/órgãos perdidos ou danificados a aplicação de matrizes de suporte constitui talvez o pilar de sustentação, mais frequentemente utilizado, considerando a sua facilidade de obtenção, o seu fácil manuseamento e relativamente baixo custo<sup>27, 36, 37</sup>. Muitas vezes, a simples aplicação de matrizes, tentando aproveitar os restantes recursos existentes no local em questão, nomeadamente o recrutamento de células estaminais e fatores de crescimento/morfogénicos endógenos estimula o processo regenerativo sem necessidade de recorrer a técnicas mais complexas, onerosas e muito mais difíceis de executar<sup>33, 192</sup>.

Apesar da medicina dentária ser uma das áreas com uma longa história na aplicação de biomateriais, a maioria das matrizes utilizadas servia apenas para substituir tecidos perdidos, sem restaurar a sua função. A utilização de matrizes com o objetivo de auxiliar a regeneração endógena do tecido pulpar e/ou facilitar a formação de dentina reparadora apresenta-se hoje em dia como um elemento de primordial importância<sup>27, 36, 37</sup>. De facto, as matrizes, para além de serem aplicada prioritariamente para transporte e manutenção de diferentes células, são atualmente muito mais do que um simples meio de acomodação das células<sup>193</sup>.

Com efeito, após uma primeira geração de biomateriais que tinha por objetivo desempenhar, essencialmente, um papel estrutural, seguindo o conceito de materiais bioinertes, assistiu-se ao desenvolvimento de uma segunda geração de materiais biocompatíveis mas com um alto grau de bioatividade capazes de auxiliar e estimular o processo de cicatrização e regeneração tecidual<sup>193, 194</sup>.

Para alcançar o objetivo de uma reconstrução de tecido pulpar, as matrizes devem possuir vários requisitos específicos, geralmente relacionados com a sua área de superfície (as matrizes devem apresentar uma grande área de superfície em relação ao volume), porosidade (uma alta porosidade vai permitir uma mais fácil interação célula-substrato e uma cinética apropriada de libertação de fatores de crescimento/fármacos nela contidos), bem como uma biodegradação em sintonia com a diferenciação fenotípica dos tecidos a regenerar, para além de uma adequada biocompatibilidade (as matrizes não devem desencadear respostas de natureza alérgicas, citotóxicas ou inflamatórias quando em contacto com tecidos vivos ou fluidos orgânicos)<sup>28, 192, 193</sup>.

Para além de funções de suporte, as matrizes devem permitir também o acondicionamento e libertação adequada de fatores de crescimento/morfogénicos, que possibilitem o recrutamento, adesão, proliferação e diferenciação de células estaminais ou outras, de modo a conduzir a um melhor e mais rápido desenvolvimento tecidual. A matriz poderá ainda conter nutrientes que promovam

a sobrevivência e crescimento das células ou mesmo a incorporação de antibióticos para prevenir o crescimento bacteriano<sup>195, 196</sup>.

Como já foi referido, a porosidade é desde logo uma condição necessária a ter em conta. A alta porosidade, adequado tamanho dos poros e sua interconetividade, tem grande impacto na adesão e colonização celular, assim como na difusão de nutrientes e metabólitos através da estrutura matricial, facilitando a formação e crescimento tecidual, bem como o desenvolvimento de uma rede vascular. A porosidade é também determinante nos mecanismos de libertação controlada de moléculas previamente incorporadas na matriz<sup>193, 195</sup>.

Também a biodegradabilidade da matriz se revela essencial, de modo a eliminar a necessidade da sua remoção cirúrgica e sobretudo a regulação e controle do tipo e velocidade de difusão de moléculas bioativas a ela associadas<sup>193</sup>. A velocidade de degradação da matriz deve acompanhar o ritmo de formação tecidual. Isto significa que a matriz de apoio será apenas necessária para providenciar integridade estrutural, até ao aparecimento de um novo tecido com uma nova matriz<sup>36, 196</sup>. Por outras palavras, é desejável que o material introduzido no organismo “desapareça” depois de cumprida a sua função. Uma degradação demasiado rápida da matriz implantada resulta geralmente num decréscimo da viabilidade e suporte celular, conduzindo geralmente a uma baixa do número de populações celulares e dos níveis de angiogénese<sup>195, 197</sup>.

Em meio biológico, as formas mais comuns de biodegradação são a hidrólise e a degradação enzimática, originando produtos não tóxicos e biocompatíveis capazes de serem metabolizados e excretados pelas vias fisiológicas normais. Enquanto os polímeros naturais são normalmente degradados enzimaticamente, os polímeros sintéticos são geralmente sujeitos a uma hidrólise<sup>198</sup>. Neste âmbito convém recordar que, quando são usados polímeros sintéticos a libertação de produtos ácidos durante a sua degradação deve ser tida em consideração, pois além de resultar numa diminuição do pH no microambiente, pode afectar também a resposta imune nos tecidos circundantes<sup>199</sup>. Finalmente, as matrizes devem apresentar uma manipulação clínica fácil, providenciar uma boa estabilidade do local em questão e servir como é natural como mantenedores de espaço<sup>37</sup>.

Vários materiais têm sido utilizados na regeneração do complexo pulpo dentinário, quer em estudos *in vitro* quer em estudos *in vivo*, com resultados encorajadores, embora bastante heterogêneos e por vezes contraditórios<sup>28, 34, 98, 200-215</sup>.

Tendo por base a sua origem, as matrizes podem ser classificadas como naturais ou sintéticas. Considerando que os constituintes da matriz extracelular controlam muitas vezes a diferenciação das células estaminais, não será de excluir a utilização frequente de matrizes com uma constituição o mais próxima possível às matrizes extracelulares dos tecidos em questão. Assim, facilmente se compreende que os polímeros naturais, mais frequentemente utilizados nos processos de regeneração pulpar sejam geralmente constituídos por componentes da matriz extracelular como o colagénio<sup>18, 101, 201, 211, 216-225</sup>, a gelatina<sup>226-231</sup>, a fibronectina<sup>232</sup>, a fibrina<sup>233</sup>, o plasma rico em plaquetas<sup>116, 211, 233-235</sup> e os glicosaminoglicanos (como o ácido hialurónico e seus derivados)<sup>215, 230, 231, 236</sup>. O colagénio é de longe a proteína mais comumente utilizada na síntese de hidrogéis para aplicação na área biomédica.

A dentina nativa ou mesmo desmineralizada<sup>217, 237-239</sup> tem também sido utilizada com êxito, considerando a sua constituição estrutural de base colagénica e a sua composição bioquímica, particularmente no que se refere à sua riqueza em fatores de crescimento e citoquinas com reconhecidas capacidades para induzir a migração e diferenciação das células estaminais em células odontoblásticas.

O alginato<sup>240-242</sup>, o quitosano<sup>215, 219, 232, 243-249</sup> e a pectina<sup>247, 250-252</sup> têm sido utilizados em regeneração tecidual isoladamente ou combinados formando complexos polielectrolíticos, com indicações favoráveis para a sua aplicação em endodontia regenerativa.

Dentro das matrizes sintéticas, temos a considerar as estruturas confeccionadas com base no ácido poliláctico (PLA)<sup>253, 254</sup>, ácido poliglicólico (PGA)<sup>242, 255</sup>, ácido poliláctico-glicólico (PLGA)<sup>15, 248, 252, 256-258</sup> e no ácido poli-capro-lactona<sup>226, 259, 260</sup>. As matrizes sintéticas permitem um controlo mais preciso das suas características físico-químicas, como sejam a sua taxa de degradação, porosidade e certas propriedades mecânicas.

Também tem sido descrita a aplicação de materiais como a hidroxiapatite, o fosfato tricálcico<sup>261, 262</sup> e o biocoral<sup>263</sup>. Os hidrogéis sintéticos<sup>264</sup> e as nano-fibras enriquecida com sequência RGD<sup>265, 266</sup> tem recentemente vindo a ser muito utilizados para este fim.

Para a regeneração pulpar não é requisito crucial a estabilidade mecânica da matriz podendo ser utilizado uma matriz tridimensional maleável, tal como um hidrogel<sup>198, 264</sup>. Os hidrogéis possuem propriedades físicas semelhantes com os do tecido vivo, o que é devido ao seu alto teor de água, consistência suave e elástica e baixa tensão superficial com a água ou fluidos biológicos<sup>198</sup>. Deste modo o hidrogel pode ser injetado no local desejado ou mesmo colocados no local sob a forma liofilizada<sup>215, 247</sup>.

Finalmente uma referência para sublinhar que todos estes compostos apresentam como características essenciais o facto de serem considerados biocompatíveis e biodegradáveis.

Esta grande diversidade e disparidade de matrizes utilizadas reflete bem a variedade de escolha possível mas ao mesmo tempo demonstra a inexistência de um critério uniforme para a sua eficiente aplicação. De facto, ainda que se tenha verificado um número cada vez maior de matrizes aplicadas nos processos de regeneração pulpar a escolha da matriz mais adequada e eficaz para este fim apresenta-se bastante crítica e constitui uma questão em aberto. Neste âmbito, importa colocar algumas perguntas ainda sem resposta, como seja o facto de se poder verificar algum tipo de especificidade de certas matrizes em relação a certas células estaminais ou se uma mesma matriz pode acomodar diferentes tipos de células estaminais com resultados semelhantes. Continuamos ainda sem saber quais as vantagens e desvantagens da utilização de certas matrizes relativamente a outras e quais os requisitos necessários quanto às características intrínsecas da estrutura matricial para uma eficaz regeneração tecidual do complexo pulpo-dentinário, sempre tão difícil de atingir<sup>28</sup>.

Uma nota final, para voltar referir que em determinadas situações traumáticas (dentes avulsionados imaturos), o tecido pulpar necrótico (ou parcialmente necrótico) quando não infetado, pode funcionar como uma matriz para as células estaminais vitais remanescentes, podendo ser sede de uma posterior revascularização<sup>94,267-269</sup>. De igual modo, em dentes permanentes imaturos necrosados e infetados, o coágulo sanguíneo, intencionalmente formado, durante a tentativa de revascularização do espaço canalar é também considerado como uma matriz, enriquecida com diversos fatores de crescimento<sup>102, 208, 269-271</sup>.

Considerando que um dos objetivos do presente trabalho reside na avaliação do potencial regenerativo de diferentes matrizes na cavidade pulpar, pareceu-nos importante proceder a uma descrição alargada sobre cada uma das matrizes utilizadas neste estudo experimental.

#### 4.1.1 Coágulo sanguíneo

A formação do coágulo sanguíneo ocorre habitualmente devido à lesão de vasos sanguíneos e constitui um mecanismo de defesa local contra a hemorragia, contrariando assim um ambiente que favorece em grande parte um estado anticoagulante. A formação deste coágulo resulta de diversas reações químicas complexas e ordenadas, numa sequência regulada pela ativação proteolítica de uma série de zimogénios, de modo a atingir a hemostase adequada à coagulação sanguínea. Assim, o coágulo sanguíneo, resulta da própria fisiologia do organismo, constituindo o único “material” utilizado neste estudo cuja formação ocorre *in situ* através de mecanismos naturais<sup>166, 272-274</sup>.

O processo de coagulação é tipicamente iniciado cerca de 20 segundos após a lesão de um vaso sanguíneo, em resposta aos danos causados às células endoteliais e à exposição do colagénio da parede vascular. As plaquetas são as primeiras a chegarem ao local, formando imediatamente um tampão plaquetário. Esta resposta de “emergência” é chamada hemostase primária. De seguida, o tampão plaquetário é gradual e rapidamente (alguns minutos) reforçado por estruturas filiformes insolúveis de fibrina, bem como pela absorção e adesão de proteínas plasmáticas. Este processo, designado por hemostase secundária, resulta da resposta de componentes específicos do plasma - os fatores de coagulação - que, numa cascata de reações, induzem a conversão de fibrinogénio em fibrina e a sua reticulação, estabilizando e fortalecendo o coágulo sanguíneo. A rede de fibrina reticulada favorece não só a ligação de determinadas células, mas também o aprisionamento de fatores de coagulação ativadas<sup>166, 272-274</sup>.

Em suma, pode afirmar-se que o coágulo é constituído pelos elementos celulares sanguíneos (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) aprisionados numa rede de fibrina, juntamente com fibronectina plasmática, vitronectina e trombospondina, apresentando várias funções importantes: a) serve de proteção temporária aos tecidos expostos; b) funciona como uma matriz para a migração celular; e c) constitui um reservatório de citoquinas e fatores de crescimento libertados principalmente pela desgranulação das plaquetas ativadas. Estas moléculas bioativas funcionam como sinalizadores iniciais para o recrutamento das células inflamatórias e para o início da reparação dos tecidos<sup>166, 272-274</sup>.

Deste modo, a retenção, organização e riqueza do coágulo é considerada como um pré-requisito essencial para a migração das células proporcionando os componentes estruturais e bioquímicos responsáveis pelo início, desenvolvimento e controlo do processo de cicatrização/regeneração, sendo de crucial importância nos mecanismos de revascularização, de dentes imaturos permanentes com pulpite irreversível ou necrosados<sup>9, 102, 103, 105, 275</sup>.

#### 4.1.2 Ácido hialurónico

O ácido hialurónico (HA) é um componente bastante abundante da matriz extracelular, presente em todas as variedades de tecido conjuntivo. Trata-se de um composto natural da família dos polissacarídeos que possui normalmente um elevado peso molecular (> 1 a 2 milhões de Dalton). Estruturalmente, o HA é constituído por unidades dissacarídeas de ácido D-glucurónico e D-N-acetilglicosamina, formando um polímero linear e não ramificado<sup>276, 277</sup>.

Este polissacarídeo apresenta importantes e interessantes propriedades viscoelásticas devido às suas características estruturais e polielectrolíticas, sendo um atraente biomaterial com várias aplicações biomédicas devido às suas propriedades físico-químicas, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa imunogenicidade<sup>277-281</sup>.

As suas cadeias podem formar géis hidratados que podem ser aplicados sob uma forma injetável no espaço pulpar. Por outro lado, quando liofilizados, formam estruturas sólidas mas porosas. Sob a forma de gel, o HA pode preencher grande parte do volume vazio existente no espaço pulpar, permitindo ao mesmo tempo uma rápida difusão de pequenas moléculas como água, electrólitos e nutrientes<sup>276, 282</sup>. Sob a forma liofilizada, os poros estruturais permitem a invasão e proliferação de células indispensáveis aos processos de reparação e regeneração.

Com efeito, o HA está envolvido em importantes processos biológicos sobretudo relacionados com fenómenos de motilidade e proliferação celular. As interações celulares com o HA ocorrem através de recetores de membrana ou de superfície (CD44, RHAMM, TLR4 e ICAM-1), influenciando processos de morfogénese, cicatrização e regeneração de tecidos, e ainda fenómenos inflamatórios e metastáticos<sup>276, 280, 282-285</sup>.

A atividade biológica do HA varia na dependência do seu peso molecular, apresentando as cadeias de mais baixo peso molecular uma maior atividade osteogénica e angiogénica, do que as formas de maior peso molecular<sup>169, 286, 287</sup>. De facto, os seus efeitos terapêuticos dependem do tamanho da molécula, podendo apresentar propriedades diferentes (ou mesmo opostas) consoante o peso molecular<sup>277, 280, 287</sup>.

O HA desempenha também um papel importante na sinalização química entre as células. Ao ligar-se a moléculas biologicamente ativas pode criar um microambiente em redor das células capaz de modular o seu comportamento<sup>280, 284</sup>.

Quando aplicado após a indução de um coágulo sanguíneo, o ácido hialurónico penetra nos poros da rede de fibrina substituindo-a gradualmente, promovendo simultaneamente a migração celular, especialmente dos fibroblastos dos tecidos circundantes e nova produção de colagénio<sup>166</sup>.

Na polpa, o seu maior componente é o ácido hialurónico e tem forte afinidade pela água. O conteúdo de proteoglicanos do tecido pulpar decresce, aproximadamente, 50% com a erupção do dente. Nesta fase, observa-se uma maior síntese de ácido hialurónico e do sulfato de dermatano enquanto há um decréscimo na síntese do sulfato de condroitina, principal proteoglicano durante a dentinogénese. Em casos de lesão ao órgão pulpar o ácido hialurónico pode desempenhar um papel importante pois acredita-se que esteja envolvido nos processos da migração celular<sup>53, 166</sup>.

A literatura tem demonstrado também uma boa adesão das células da linha odontoblástica às matrizes constituídas por ácido hialurónico<sup>230, 231</sup>.

#### 4.1.3 Quitosano

O quitosano (CS) é um polissacarídeo natural composto por unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina, obtido a partir de desacetilação da quitina, habitualmente encontrada em crustáceos. Possui similaridades estruturais com os glicosaminoglicanos, ou seja, mimetiza o seu comportamento funcional.

Este polissacarídeo apresenta uma série de propriedades que o tornam um material ideal para aplicações biomédicas, como a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade (por lisossomas), potencial hemostático, anti-carcinogenicidade, exibindo ainda uma grande afinidade para certas proteínas, promovendo também a adesão, proliferação e diferenciação celular. Outras propriedades são-lhe também reconhecidas, nomeadamente a sua atividade antimicrobiana<sup>259</sup>. Este polímero tem sido amplamente utilizado com grande eficácia em vários campos da medicina e medicina dentária<sup>288, 289</sup>.

Em síntese, o quitosano exhibe um espectro de propriedades que o tornam uma alternativa interessante aos biomateriais tradicionalmente usados. Em particular, destaca-se a sua aplicação no desenvolvimento de suportes para engenharia de tecidos e, mais especificamente, nos processos de regeneração pulpar. Neste contexto, é necessário a obtenção de matrizes insolúveis, com propriedades biomecânicas adequadas, o que habitualmente se consegue através da reticulação deste polímero com outros. De facto, visto que o quitosano é um polímero catiónico abaixo de pH 6,5, pode ser reticulado com polímeros aniónicos como a gelatina<sup>227</sup>, colagénio<sup>290</sup> o ácido (poli)-(glutâmico)<sup>291</sup>, a pectina<sup>247</sup> e o hialuronato de sódio<sup>215</sup>.

A incorporação do quitosano como agente de *cross-linking*/reticulação não só aumenta a resistência da matriz e prolonga a sua degradação no tempo, como também mimetiza a matriz extracelular encontrada *in vivo*, levando a uma melhor e mais rápida adesão e proliferação celular<sup>292</sup>.

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que este polímero induz reações inflamatórias mínimas e promove a proliferação de fibroblastos pulpares e a indução de processo de mineralização pelas células odontoblásticas<sup>36, 215, 223, 244, 245, 247</sup>.

Matsunaga *et al.*<sup>244</sup> demonstraram a capacidade dos monómeros de quitosano para promover a regeneração de feridas de polpa dentária. Este facto levou-nos a considerar o quitosano como

uma matriz com grande potencial regenerativo para células de polpa dentária. O quitosano em combinação com o colagénio também tem sido utilizado para a regeneração do tecido periodontal, demonstrando a sua utilidade na engenharia de tecidos dentários<sup>223</sup>.

De referir ainda que, numa fase inicial o quitosano parece estimular a libertação de citocinas e quimioquinas pró-inflamatórias pelas células fibroblásticas, bem como a migração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos<sup>293</sup>. Este facto, poderá aparentemente ter uma repercussão negativa se atendermos às condições em que se encontra o tecido pulpar, ou seja numa cavidade de paredes rígidas e sem irrigação colateral<sup>244,288</sup>. Mas, por outro lado na fase final de cicatrização, apresenta uma grande atividade angiogénica e de reorganização da matriz extracelular e tecido de granulação<sup>293</sup>.

#### 4.1.4 Pectina

A pectina pertence à família dos polissacarídeos, sendo constituída principalmente por monómeros de ácido D-galacturónico ligados covalentemente. Encontra-se nas paredes celulares primárias das plantas<sup>294</sup>, sendo obtida principalmente a partir da polpa de maçã e da casca de citrinos por meio de um processo de extração aquosa ácida. Os extratos de pectina são amplamente utilizados na indústria de processamento de alimentos devido à sua capacidade de espessamento e propriedades de gelificação.

Os extratos de pectina comerciais são predominantemente formados por cadeias lineares de ácido, com capacidade de espessamento e de propriedades de gelificação, as pectinas podem ser classificadas como pectinas de baixo ou elevado grau de esterificação<sup>247</sup>. A pectina tem sido indicada em diversos campos da medicina, nomeadamente como matrizes para regeneração óssea<sup>247</sup>. Recentemente demonstrou-se que a pectina tem também atividade anti-inflamatória e anticarcinogénica<sup>295-297</sup>.

## 4.2 Fatores morfogénicos e fatores de crescimento

Os fatores morfogénicos incluídos nas moléculas de sinalização celular, são proteínas que se ligam a recetores específicos geralmente presentes nas membranas celulares (das células alvo), influenciando funções críticas, como a proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e comportamento celular. Estas proteínas são ativas em concentrações muito baixas, têm geralmente uma semivida reduzida e devem atuar localmente, isto é terem uma difusão restrita<sup>27, 166, 298</sup>. Por sua vez, apresentam com frequência uma especificidade limitada no tempo e no espaço, ou seja, a capacidade de resposta aos sinais pode ser temporária (manifestando-se apenas em certas fases do desenvolvimento) e a localização espacial das células competentes em relação à fonte de libertação do sinal pode ser determinante<sup>166</sup>.

Os fatores morfogênicos podem ser classificados de acordo com a sua atividade. Enquanto certas citocinas (como o TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) estão associadas a reações imunoinflamatórias, os fatores de crescimento (como TGFs e BMPs) atuam como estimuladores ou inibidores do crescimento<sup>27,298</sup>. Muitos destes fatores de crescimento interagem de um modo bastante versátil, estimulando a atividade celular em numerosos tipos de células, enquanto outros são mais específicos. A designação da maioria dos fatores de crescimento, não está muitas vezes associado à sua função mais importante, mas às circunstâncias históricas em que surgiram<sup>196</sup>.

Um dos pontos chave para o sucesso clínico da aplicação dos fatores de crescimento relaciona-se com os seus sistemas de transporte, nomeadamente matrizes, que como já atrás foi referido, devem apresentar diversas características específicas maioritariamente relacionadas com a sua área de superfície e uma cinética de libertação adequada.

Entre os principais fatores de regulação e mecanismos de sinalização celular, conservados ao longo da escala filogenética, relacionados com os mecanismos de morfogénéticos e de citodiferenciação, poderemos considerar a existência de diversas principais famílias de proteínas: dos fatores de crescimento transformador (TGF- $\beta$  *transforming growth factors*), a dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs - *fibroblastic growth factors*); a das proteínas *Hedgehog* (Shh); a das proteínas *Wingless* (Wnts), a dos fatores de necrose tumoral (TNFs - *tumor necrotic factor*), os fatores de crescimento aparentados com a insulina (IGF - *insulin growth factor*) e os fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF - *platelet derived growth factor*)<sup>27, 166, 196, 298-301</sup>.

Também são muitos os fatores de crescimento que controlam a atividade das células estaminais, quer regulando a sua velocidade de proliferação, quer induzindo a sua diferenciação noutras linhas celulares, ou estimulando a síntese de matriz extracelular<sup>27</sup>. De facto, estas moléculas têm um papel fundamental na formação, reparação e regeneração da dentina e da polpa. Neste âmbito, importa referir que a formação de tecidos mineralizado na sequência de proteções pulpares diretas (com a utilização do hidróxido de cálcio e do MTA) são exemplos do envolvimento destes fatores e da sua interação com as células estaminais. Com efeito, está já demonstrado que a regeneração da polpa induzida pelo hidróxido de cálcio é mediada por fatores de crescimento, que controlam o destino das células estaminais nos processos de regeneração<sup>196, 302, 303</sup>.

Uma das famílias mais importantes de fatores de crescimento que desempenham um papel vital nos processo de desenvolvimento/regeneração dentários são as TGF- $\beta$  ( $\beta 1$  e  $\beta 3$ ) e as BMPs (BMP-2, 4 e 7), nela incluídas.

As BMPs fazem parte da superfamília dos TGF- $\beta$  sendo inicialmente associadas ao desenvolvimento, formação da cartilagem e tecido ósseo, ativando múltiplas vias de sinalização relacionadas com processos de biomineralização. Porém, desempenham também um papel fundamental na morfogénese dentária, estando envolvidas nas interações entre o epitélio dentário e o mesênquima durante o desenvolvimento do órgão dentário e estruturas craniofaciais<sup>304</sup>. Estas proteínas são expressas na fase de capuz e de campânula e estão associadas com a diferenciação dos ameloblastos e

odontoblastos<sup>35</sup>. As BMPs 2, 4 e 7 têm também uma importância reconhecida na biologia das células pulpares. Está já confirmado que a BMP-2, 4 e 7 estimulam a diferenciação de células estaminais adultas em odontoblastos e subsequente formação de dentina, demonstrando assim, que a família das BMPs representa o candidato mais importante nos processos de regulação da dentinogênese<sup>198, 305</sup>.

Os TGF- $\beta$ 1 e  $\beta$ 3 são importantes na ativação celular para diferenciação odontoblástica e estimulação da secreção de matriz dentinária. Estes fatores de crescimento são secretados por odontoblastos e são depositados dentro da matriz da dentina, onde permanecem protegidos numa forma ativa através da interação com outros componentes da matriz dentinária<sup>306</sup>. A adição de frações proteicas de dentina purificada estimula um aumento de secreção de dentina terciária na matriz, sugerindo que o TGF- $\beta$ 1 está envolvido na sinalização do dano causado e na reação de cicatrização dentária<sup>164</sup>. Além disso, a aplicação de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), ácido cítrico, hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio, MTA e Biodentine, promovem a libertação da TGF- $\beta$ 1 sequestrada em dentina humana, exercendo uma ação dentinogénica<sup>162, 307-313</sup>.

Os FGFs são uma família de fatores de crescimento, entre os quais se destacam o FGF-1 (ácido) e o FGF-2 (básico). São mitogénicos para as células endoteliais, fibroblastos, condroblastos, e osteoblastos<sup>314</sup>. Além disso, o FGF-2 é um fator com um potente efeito angiogénico, sendo também mitogénico e quimiotático para as células estaminais pulpares<sup>301</sup>. Entre outras origens, é sintetizado por células inflamatórias e adere às matrizes extracelulares através da ligação aos proteoglicanos sulfatados da heparina.

O PDGF encontra-se em elevadas concentrações nas plaquetas e nas células vasculares endoteliais, apesar de estar também presente em múltiplos tipos celulares. A sua síntese está, geralmente, associada a estímulos externos como uma baixa tensão de oxigénio, trombina ou estimulação através de outros fatores de crescimento. É libertado pelas plaquetas e monócitos em locais de traumatismo, tendo como função principal a indução da proliferação de células mesenquimatosas indiferenciadas, recrutando desta forma populações celulares regenerativas<sup>315</sup>. Exercem vários efeitos biológicos, incluindo a mitogénese e quimiotaxia de osteoblastos, de fibroblastos e de cementoblastos<sup>316, 317</sup>.

A evidência derivada de modelos pré-clínicos indica que doses transitórias e isoladas de PDGF, ou combinadas com IGF-1, têm potencialidade para estimular o processo de regeneração periodontal<sup>318</sup>. Isto reforça a importância dos fenómenos iniciáticos no desenrolar da cicatrização. Foi demonstrada a regeneração de um novo aparelho de inserção periodontal após aplicação da combinação PDGF/IGF-1 no tratamento de defeito ósseos periodontais, tanto em modelos caninos com periodontite natural, como em primatas não humanos com indução experimental de lesões periodontais<sup>318-320</sup>.

A aplicação clínica destes fatores de crescimento também tem sido efectuada através do plasma enriquecido em plaquetas (PRP – *platelet-rich plasma*), que constitui uma fonte natural de fatores autólogos<sup>116, 121, 211</sup>. A técnica para obtenção do PRP envolve, basicamente, a sequestração e a concentração de plaquetas do plasma, para aplicação subsequente da preparação ao defeito

alvo. Esta é uma alternativa conveniente para a obtenção de uma concentração aumentada de PDGF, TGF- $\beta$  e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – *vascular endothelial growth factor*) autólogos. Estes fatores de crescimento estão presentes em concentrações de aproximadamente 50 ng/ml sequestrados nas plaquetas de todo o sangue recolhido. A técnica de PRP permite um incremento na concentração de plaquetas superior a 338%, aumentando teoricamente a PDGF e TGF- $\beta$  <sup>318</sup>. Ambos os fatores são potentes agentes quimiotáticos para as células osteoprogenitoras e a sua combinação parece ser complementar, uma vez que o TGF- $\beta$  atua essencialmente como um agente de diferenciação e o PDGF como um forte fator mitogénico e proliferativo, mas sem efeito na citodiferenciação <sup>317</sup>. Por sua vez, o VEGF é um dos principais agentes indutores da angiogénese.

Por fim, convém recordar, mais uma vez, que a matriz dentinária constitui só por si um reservatório de moléculas de sinalização que incluem fatores morfogénicos e de crescimento. Os fatores de crescimento, como os IGF- I, FGFs, EGF, BMP, TGF- $\beta$ , PDGF, HGF (*hepatocyte growth factor*) e VEGF, sintetizados pelos odontoblastos e sequestrados na matriz dentinária, são libertados aquando da desmineralização da matriz dentinária, provocada por cárie, aplicação de procedimentos ou materiais, são capazes de induzir a proliferação, migração, adesão e diferenciação de células estaminais, em células formadoras de dentina reacional ou reparadora <sup>197, 302, 303, 305, 307, 308, 321-325</sup>.

Contudo é importante manter em mente que a utilização das proteínas TGF- $\beta$ , incluindo as BMPs participam ativamente na progressão carcinogénica <sup>326</sup>.

### 4.3 Células estaminais

As células estaminais ou células tronco são células que apresentam uma grande capacidade de autorrenovação e proliferação, bem como um vasto potencial de diferenciação em diversos tipos de células, constituindo por este motivo a salvaguarda da homeostasia dos tecidos e o garante da sua reparação durante toda a vida do indivíduo <sup>196</sup>. Compreende-se, pois, que estejam na base de quase todos os processos de regeneração de tecidos. As descobertas recentes têm levado a uma percepção bastante otimista da versatilidade destas células e do modo como podemos pô-las ao nosso serviço <sup>153</sup>.

As células estaminais podem ser classificadas em dois grandes grupos, tendo em conta a sua origem e capacidades plásticas: a) células indiferenciadas existentes nos tecidos embrionários durante as fases mais precoces de desenvolvimento, designadas por células estaminais embrionárias, apresentando-se como praticamente totipotentes e b) células estaminais pós-natais (também designadas por células estaminais somáticas) residentes em tecidos já diferenciados, exibindo contudo um potencial de diferenciação muito mais reduzido <sup>191, 304, 327, 328</sup>.

A maior vantagem das células estaminais embrionárias reside na sua enorme capacidade de proliferação e diferenciação <sup>329</sup>. Porém, para além de importantes questões éticas, apresentam uma certa instabilidade genética, a obrigatoriedade de transplantação para hospedeiros imunocom-

prometidos, risco de formação de teratocarcinomas e fácil contaminação em cultura. Já as células estaminais pós-natais embora não incorrendo em limitações morais, encontram-se em número reduzido nos tecidos (agregadas em pequenos nichos celulares), apresentando maior dificuldade de isolamento e quando se diferenciam, conseguem gerar apenas um espectro bastante restrito de linhas celulares<sup>135</sup>.

Porém, parece cada vez mais evidente que as células estaminais pós-natais presentes nos tecidos adultos podem ser bem mais versáteis do que inicialmente se pensava. A descoberta recente de uma tecnologia fiável<sup>330</sup> capaz de reprogramar células somáticas em células estaminais pluripotentes, designadas por células estaminais induzidas conhecidas pela sigla iPS abre uma janela de oportunidade nos mecanismos de engenharia de tecidos. As iPS apresentam-se como substitutos ideais das células estaminais embrionárias, podendo constituir no futuro uma fonte de células bastante úteis para reparação de outros tecidos que não os de origem<sup>331, 332</sup>.

#### 4.3.1 Características das células estaminais

Quando se divide (por mitose) cada célula estaminal (Figura 19) dá origem a duas células, uma que permanece indiferenciada, conservando o *status* de célula estaminal (autorrenovação) e outra que passa por um ciclo de etapas de proliferação e diferenciação.

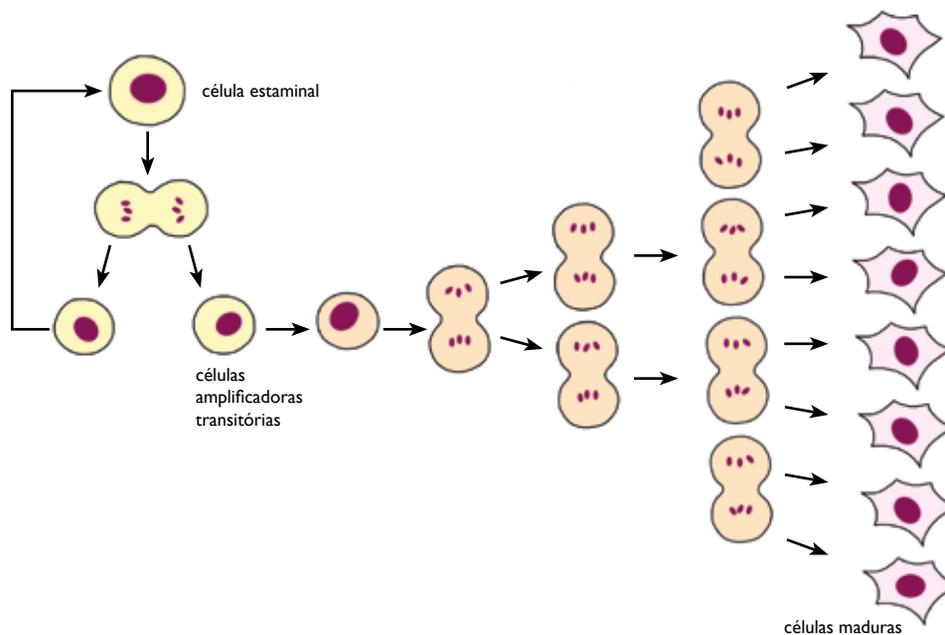


Figura 19. Esquema representativo do processo de formação de células amplificadoras transitórias com origem numa célula estaminal levando ao aparecimento de células maduras. Adaptada de Alberts *et al.*<sup>166</sup>.

As células “comprometidas” com o processo de diferenciação (que passam por uma série de divisões antes de chegar a células maduras) designam-se frequentemente por células amplificadoras transitórias. Ou seja, transitórias porque estão em trânsito, entre célula mãe e a célula diferenciada. Amplificadoras porque os ciclos de divisão pelos quais passam, têm o efeito de amplificar o número final de células diferenciadas que resultam de uma única divisão da célula estaminal<sup>166</sup>.

Convém referir aqui que a grande capacidade de divisão das células estaminais não significa que estas células se dividam muito rapidamente. Com efeito, um aspeto característico das células estaminais presentes nos vários tecidos é o facto de embora possuindo uma capacidade ilimitada de autorrenovação entrarem em divisão muito raramente<sup>135</sup>. Este baixo índice mitótico das células estaminais é considerado necessário para evitar a acumulação de possíveis mutações. O facto de normalmente se encontrarem num estado quiescente será pois uma estratégia de preservação e proteção destas células<sup>135</sup>.

Este aspeto é todavia compensado pelas divisões de amplificação das células progenitoras comprometidas, permitindo assim a redução do número de ciclos de divisão que as próprias células mãe têm de sofrer ao longo da sua vida e, desta forma, reduzir o risco de senescência replicativa e de mutações prejudiciais. Deste modo, as células estaminais pós-natais, em processo de diferenciação, antes de atingir o seu estágio final de maturação geram um grande número de células transitórias. Estas células intermédias são chamadas de células precursoras ou progenitoras e são células parcialmente diferenciadas que, por divisão celular, originam apenas células diferenciadas.

O conjunto das células estaminais propriamente ditas e das células progenitoras amplificadoras transitórias constitui um sistema dinâmico de reparação de tecidos<sup>127</sup>, capaz de responder eficazmente a diversos e diferentes estímulos externos.

#### 4.3.1.1 Nichos de células estaminais

A decisão entre a escolha de uma via de autorrenovação e o início de um processo de diferenciação é muitas vezes determinado pelo microambiente que rodeia as células estaminais. De facto, as células estaminais encontram-se geralmente associadas a outras células diferenciadas e a estruturas constituintes da matriz extracelular formando, no seu todo, compartimentos especializados designados por nichos (*stem cells niches*). O microambiente criado nestes locais regula e condiciona o destino final das células estaminais<sup>333</sup>. Com efeito, o microambiente aí gerado forma, de certa maneira, uma barreira contra a diferenciação e proliferação destas células protegendo-as de estímulos que induzam a sua diferenciação e proliferação descontrolada, ou mesmo a sua apoptose.

Estes nichos constituem, assim, “entidades” anatómicas especializadas que abrigam as células estaminais, criando um ambiente altamente controlado que condiciona a sequestração destas células, num estado quiescente, inibindo a sua diferenciação, mas conservando a sua capacidade de auto renovação (mantendo assim as suas características e propriedades de células estaminais), permitindo manter um equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação<sup>334</sup>.

Este balanço é alcançado através de um constante diálogo (interação física e molecular) entre as células estaminais e as restantes células em seu redor. Moléculas solúveis como *Wnt*, FGF e proteínas *hedgehog* constituem importantes fatores de regulação autócrina e parácrina da função das células estaminais, com várias capacidades para induzir mecanismos de proliferação e diferenciação, quando necessários<sup>135</sup>.

Importa referir ainda que os nichos de células estaminais de natureza mesenquimatosas estão geralmente situados em áreas perivascularas, exercendo a matriz extracelular como já foi referido uma influência fundamental no estado de quiescência destas células<sup>334</sup>. Foi já possível confirmar que a matriz extracelular pode, só por si, condicionar e modular as células estaminais muito provavelmente através de integrinas que ligam a matriz às células do estroma.

Pode pois afirmar-se que os nichos de células estaminais, englobam todos os elementos que rodeiam as células estaminais, quer células (mais ou menos diferenciadas que possam estar em contacto com elas), quer moléculas sinalizadoras (como as citoquinas, fatores de crescimento e de diferenciação presentes no meio), quer mesmo e sobretudo, componentes da matriz extracelular.

Uma nota final apenas para recordar que na maioria das vezes, as células estaminais pós-natais são morfológicamente idênticas ou muito semelhante às células dos tecidos onde se encontram, o que torna a sua deteção bastante difícil<sup>298,304,335</sup>. Para contornar este problema, recorre-se à utilização de marcadores bioquímicos.

As células estaminais de natureza mesenquimatosas foram primariamente identificadas com base na utilização do STRO-1 (antígeno específico da superfície das células da medula óssea/estroma). Porém depressa se verificou que as células STRO-1 positivas representavam apenas uma pequena proporção das células estaminais. Atualmente são aceites como critérios mínimos, definidos pela *Internacional Society for Cellular Therapy* para identificação das células estaminais multipotentes, a positividade destas células para a expressão dos marcadores moleculares CD73, CD90 e CD 105<sup>336</sup>. Para além disso, estas células são definidas também como células aderentes e clonogénicas (quando mantidas em recipientes plásticos com condições de cultura *standard*) e por apresentar um potencial de diferenciação pelo menos em três diferentes linhas de populações celulares, osteogénica, condrogénica e adipogénica<sup>336</sup>.

Os nichos de células estaminais têm vindo a ser continuamente identificados em quase todos os tecidos do organismo, exercendo como já foi referido um papel fundamental nos mecanismos de cicatrização, reparação e regeneração tecidual.

A principal fonte de células estaminais de natureza mesenquimatosas nos organismos adultos é a medula óssea, constituindo geralmente uma referência em relação às quais as restantes células conjuntivas são comparadas.

### 4.3.2 Células estaminais dentárias

Já é grande o conjunto de estudos que demonstram a existência nos tecidos dentários de vários nichos de potenciais células estaminais e progenitoras, de extrema importância no processo de formação de dentina reparadora, mecanismos de apexogênese, bem como na regeneração dos tecidos periodontais<sup>96, 153, 191, 212, 298, 337-341</sup>.

Este conjunto de células indiferenciadas parece representar somente 1 a 4% da população celular total<sup>322</sup>. Porém como já foi descrito, pode originar uma multidão de células altamente diferenciadas como resposta a sinais específicos.

Até ao momento, foram isoladas, identificadas e caracterizadas vários tipos de células estaminais/progenitoras de origem dentária, designadas coletivamente como células estaminais dentárias, que incluem as células existentes na: a) polpa dentária de dentes adultos (DPSCs), b) polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (SHEDs), c) papila apical (SCAPs), d) ligamento periodontal (PDLSCs) e e) folículo dentário (DFSCs)<sup>14, 342</sup>. Todas são capazes de levar por diante um processo de autorrenovação, proliferação e diferenciação em várias linhagens celulares. Todas elas, excepto as SHEDs, foram extraídas de dentes permanentes. Estas células estaminais dentárias são consideradas células estaminais mesenquimatosas (MSCs) com grande capacidade proliferativa e grande versatilidade, o que aliada a sua fácil acessibilidade, faz delas uma importante fonte de células estaminais para aplicação em qualquer processo de engenharia de tecidos<sup>14</sup>.

Uma nota ainda para sublinhar mais uma vez a possibilidade de reprogramar células estaminais somáticas em células estaminais (pluripotentes) induzidas. Também, as células provenientes de dentes decíduos esfoliados, da papila apical ou da polpa dentária podem ser reprogramadas, com maior eficácia do que os fibroblastos da pele (as células mais frequentemente utilizadas nestes processos). Estas células, de natureza ectomesenquimatosa, podem originar células idênticas às células estaminais embrionárias, constituindo um marco importante para a engenharia de tecidos<sup>332, 343</sup>.

De referir ainda que a criopreservação de células estaminais dentárias (de dentes decíduos esfoliados e de dentes permanentes extraídos) parece não diminuir a sua capacidade de diferenciação e plasticidade<sup>344, 345</sup>. Assim a criação de bancos de células estaminais dentárias, pode constituir uma hipótese muito promissora para futuras aplicações no campo da medicina regenerativa<sup>30, 196, 346</sup>.

#### 4.3.2.1 Células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs)

No tecido pulpar dos dentes permanentes está presente uma população heterogênea de células com uma grande capacidade proliferativa e de diferenciação consideradas como células estaminais e designadas por *dental pulp stem cells* (DPSCs)<sup>261</sup>.

A partir do trabalho de Gronthos *et al.*<sup>261</sup>, são já vários os investigadores que isolaram e caracterizaram células estaminais a partir da polpa dentária, utilizando preferencialmente o terceiro molar para este fim<sup>14, 30, 191, 203, 225, 311, 328, 338, 341, 344, 345, 347-362</sup>. Foi já demonstrado também, que as DPSCs têm

uma grande capacidade de adesão e proliferação quando colocadas em matrizes apropriadas quer *in vitro* quer *in vivo*<sup>214, 263, 348, 363, 364</sup>.

As células estaminais da polpa dentária têm perfis de expressão gênica e capacidade proliferativa e de diferenciação semelhante às das células mesenquimatosas indiferenciadas da medula óssea, vulgarmente conhecidas por *bone marrow mesenchymal stem cells* (BMMSCs). Em condições apropriadas (meios de cultura adequados) podem diferenciar-se em células da linha osteogénica, condrogénica, adipogénica, miogénicas e neurogénicas, propriedades consideradas como essenciais na definição de células estaminais mesenquimatosas. Porém, a sua principal característica reside no seu potencial de diferenciação odontoblástico, quer *in vivo* quer *in vitro*. Com efeito, as DPSCs são capazes de formar um complexo pulpo-dentinário-like, composto por uma matriz mineralizada adjacente a uma camada de odontoblastos num arranjo semelhante ao do complexo pulpo-dentinário de dentes humanos normais<sup>15, 261, 365</sup>. O processo de diferenciação das DPSCs em odontoblastos funcionais tem grandes semelhanças com o mecanismos de diferenciação das BMMSCs em osteoblastos<sup>366</sup>. Por outro lado, as DPSCs são também capazes de regenerar um tecido semelhante à polpa dentária quando transplantadas para canais radiculares, o que abre inúmeras possibilidades de aplicação em endodontia regenerativa<sup>15</sup>.

Estas células têm sido também referenciadas por possuir uma suposta atividade imunossupressiva, o que pode ser considerado uma vantagem para situações de transplante alogénico de células estaminais<sup>367</sup>.

Quando comparadas com as BMMSCs, ambas as populações celulares expressam CD44, CD106, CD146, 3G5 e STRO-1, bem como fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. Todavia, as DPSCs apresentavam uma capacidade proliferativa superior (30%) e um maior potencial de crescimento. De facto, embora estas células sejam muito semelhantes às células mesenquimatosas da medula óssea (compartilhando muitos marcadores comuns) apresentam, no entanto, algumas diferenças na sua plasticidade, certamente resultantes da sua diferente natureza ectomesênquimatosas<sup>14</sup>.

A origem e localização das DPSCs ainda é objeto de grande controvérsia, todavia, parecem integrar diversos nichos perivascular<sup>34</sup>. Como já foi referido o desenvolvimento de marcadores específicos para as células estaminais reveste-se de extrema importância na sua localização, pois estas células podem residir em diferentes locais dentro do mesmo tecido<sup>366</sup>. Com efeito, Sloan *et al*,<sup>329</sup> tendo por base a utilização de diversos marcadores, demonstraram, numa polpa dentária madura, a existência de vários nichos distintos de células estaminais: a) células mesenquimatosas indiferenciadas, residentes na camada rica em células, b) uma população celular perivascular associada aos elementos vasculares da polpa e c) uma população situada no estroma da porção central polpa.

Como também já foi descrito, quando em condições fisiológicas as células estaminais /progenitoras presentes nos nichos mantem-se num estado quiescente. Porém, quando sujeitas a agressões, são estimuladas no sentido de aumentarem a sua atividade proliferativa e de diferenciação. Com efeito as DPSCs estão ativamente envolvidas na formação de dentina reparadora<sup>212</sup>.

O conhecimento dos mecanismos pelos quais estas células são capazes de responder às alterações do meio ambiente pode representar um avanço importante no desenvolvimento de processos de engenharia de tecidos e terapias endodônticas regenerativas<sup>368</sup>. Mais estudos de investigação serão necessários visando esclarecer o padrão de comportamento das DPSCs aos diferentes estímulos que possam alterar o seu estado de quiescência, bem como o potencial de proliferação e diferenciação.

As DPSC expressam, ainda, marcadores típicos de células da crista neural, características de uma fase muito precoce do desenvolvimento. Com efeito, expressam nestina, proteína glial fibrilar ácida, tubulina- $\beta$ III, descarboxilase do ácido glutâmico e neuroenolase, tudo marcadores típicos de precursores neurais e células glias<sup>14,348</sup>. A este respeito é interessante referir também que até os próprios odontoblastos “carregam” ainda muitas das características do seu neuroepitélio de origem<sup>131</sup>. Dentro desta filosofia, foi proposto que os odontoblastos seriam originalmente recetores sensoriais, respondendo a alterações químicas e térmicas do ambiente, especificidades que ainda hoje se mantêm. Estudos recentes demonstraram que os odontoblastos de mamíferos, para além de características mesenquimatosas, expressam uma série de recetores neuronais. Estão incluídos neste contexto o recetor de capsaicina, os canais de sódio e recetores sensíveis a tetrodotoxina<sup>131,369</sup>. Em cultura de células, os odontoblastos, mostraram-se também capazes de gerar potenciais de ação. Estas células são, por isso mesmo, responsáveis pela receção e transmissão de estímulos relacionados com os processos de dor<sup>132</sup>.

A recente confirmação relativamente à presença na polpa dentária (quer de dentes decíduos quer permanentes) de duas populações distintas de células estaminais/ progenitoras originárias separadamente da mesoderme e da crista neural indicia a existência de diferentes possibilidades regenerativas no conjunto das células que constituem os nichos localizados no tecido pulpar<sup>344,370,371</sup>.

A possibilidade da diferenciação das células estaminais da polpa em células neurais, demonstrada em estudos *in vitro* quer *in vivo* aumenta a sua potencial eficácia em processos de regeneração craniofacial e doenças degenerativas do foro neurológico<sup>351,362,371,372</sup>.

#### 4.3.2.2 Células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHEDs)

O tecido pulpar de dentes decíduos aparenta ser uma fonte excelente de células estaminais, considerando a sua fácil obtenção e o seu estado muito precoce de diferenciação<sup>373</sup>. De facto, as células estaminais isoladas de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) têm capacidade de se diferenciar num maior número de populações celulares do que a maioria das DPSCs, por serem consideradas “mais imaturas”<sup>374</sup>. Koyama et al<sup>354</sup> afirmam mesmo que um dente decíduo naturalmente exfoliado é semelhante a um cordão umbilical, contendo uma população de células estaminais com características e potencialidades únicas. Do mesmo modo, a sua capacidade de proliferação é também bastante superior e mais rápida do que as DPSCs ou mesmo as BMMSCs (SHEDs > DPSCs > BMMSCs)<sup>337,354</sup>.

Considerando também a sua proximidade temporal às células da crista neural, as SHEDs têm vindo a ser utilizadas a título experimental no tratamento de doenças neurodegenerativas e na reparação de neurónios motores<sup>356, 374</sup>.

Salienta-se ainda que Cordeiro *et al.*<sup>253</sup>, ao associarem as SHEDs com uma matriz que consideraram adequada, obtiveram um tecido semelhante ao da polpa. Desta forma, concluíram que as SHEDs constituem também uma fonte viável de células estaminais para a regeneração pulpar.

Em síntese, a grande versatilidade e alta plasticidade destas células, aliada à sua fácil acessibilidade, fazem das SHEDs uma importante e atrativa fonte de células estaminais para engenharia de tecidos. De facto, o uso destas células parece ser bem mais vantajoso do que as recolhidas de polpa adulta.

Como será abordado em parágrafos posteriores o rápido restabelecimento de uma rede vascular é determinante para o sucesso dos mecanismos de regeneração pulpar. Neste âmbito importa referir que tanto as DPSCs como as SHEDs apresentam capacidades para se diferenciar em células endoteliais, contribuindo ativamente em processos de natureza angiogénica. Está demonstrado que estas duas linhas celulares quando expostas a fatores pró angiogénicos como o VEGF, podem adquirir progressivamente um fenótipo endotelial, dando origem à formação de vasos sanguíneos, colaborando desta forma para a sua própria sobrevivência<sup>27, 191, 254</sup>. Este aspeto, deverá representar um papel bem mais importante do que à primeira vista se lhe atribui nos processos de revascularização pulpar.

#### 4.3.2.3 Células estaminais da papila apical (SCAPs)

Como já foi referido em parágrafos anteriores, durante o processo de formação da raiz, a papila dentária adquire uma localização apical em relação ao tecido pulpar.

Sonoyama *et al.*<sup>95</sup> fizeram uma análise histológica detalhada da papila apical diferenciando esta zona da restante região pulpar, tendo identificado nesta área a existência de uma população de células estaminais mesenquimatosas que designaram por células estaminais da papila apical (SCAPs). Os processos de caracterização histológica e funcional bem como de cultura de células confirmaram tratar-se de células estaminais pluripotenciais, tendo sido demonstrado o seu vasto potencial de diferenciação em condroblastos, osteoblastos e células adiposas, para além de odontoblastos. Em comparação com as DPSCs, as SCAPs apresentam maior número de células positivas para o STRO-1, maior velocidade de proliferação (3 vezes superior), maior número de *populations doubling* e maior capacidade de regeneração dentinária *in vivo*. Ao contrário das DPSCs e de outras MSCs, as SCAPs possuem atividade telomérica positiva (característica das células embrionárias), o que sugere tratar-se de uma fonte de células estaminais muito imatura<sup>95</sup>. Foi também sugerido que as SCAPs, constituem a principal fonte de odontoblastos primários envolvidos no desenvolvimento da dentina radicular, enquanto as DPSCs funcionam como uma fonte de odontoblastos secundários implicados em processos de formação de dentina reparadora<sup>24</sup>.

Também as SCAPs apresentam, tal como as DPSCs, capacidade de gerar um complexo pulpo-dentinário. Huang *et al.*,<sup>14</sup> publicaram um estudo que parece ter sido dos primeiros a levar a cabo um processo de regeneração pulpo-dentinário *in vivo*, com base na transplantação de células estaminais da polpa e da papila apical de dentes humanos, obtendo uma regeneração funcional do complexo pulpo-dentinário, bastante semelhante ao normal. Estes autores sublinham ainda que a presença da matriz dentinária é suficiente para induzir a migração e posterior diferenciação das células estaminais em células *odontoblast-like*, estendendo os seus prolongamentos para os túbulos dentinários. Mesmo a submissão da dentina a certos tratamentos químicos parece não afectar esta sua capacidade indutiva e quimiotática. Neste estudo experimental, as células estaminais cultivadas numa matriz de PLGA foram maioritariamente “atraídas” para a parede de dentina (em detrimento da matriz utilizada), onde se diferenciaram, sendo atribuído ao TGF- $\beta$  (armazenado e libertado da matriz dentinária) um papel primordial neste processo.

Em síntese, as SCAPs parecem constituir a principal fonte de odontoblastos primários, responsável pelo desenvolvimento da dentina radicular, em contraste com as DPSCs que parecem provavelmente mais envolvidas com a formação da dentina reparadora<sup>24, 95, 98, 337, 375</sup>.

Uma nota mais, para referir que alguns estudos de investigação<sup>24, 98</sup> parecem indicar que as SCAPs deverão dar origem as DPSCs acompanhando a transformação da papila em polpa. A este propósito Lei *et al.*<sup>359</sup> ao compararem o potencial dentinogénico das SCAPs durante o processo de crescimento e maturação radicular verificaram uma diminuição da sua capacidade dentinogénica em favor da osteogénica. Porém, outros autores como Sonoyama *et al.*<sup>95</sup>, sugerem que as SCAPs podem constituir uma população única, de células estaminais pós-natais, distinta das DPSCs. Devido à sua atividade telomérica e capacidade de migração podem representar uma população de células indiferenciadas de alta qualidade, com particular relevância e potencialidades imensas na regeneração do complexo pulpo-dentinário e desenvolvimento da raiz. Huang *et al.*<sup>98</sup>, chegam mesmo a afirmar que a papila apical representa um *hidden treasure* que pode apresentar uma importância crucial na eficácia dos mecanismos terapêuticos de apexificação/apexogénese.

#### 4.3.2.4 Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) e do folículo dentário (DFSC)

As células estaminais do ligamento periodontal têm uma maior longevidade e maior capacidade de duplicação e proliferação do que as da medula óssea<sup>376-378</sup>. O potencial das PDLSCs para se diferenciarem noutras linhagens celulares, visando a formação de um tecido semelhante ao periodonto, foi demonstrado pela capacidade das PDLSCs em cultura se diferenciarem em células com perfil de osteoblastos, cementoblastos, adipócitos e fibroblastos<sup>356</sup>. Com efeito, as PDLSCs parecem ser as células responsáveis pelos processos de regeneração do ligamento periodontal e demais estruturas do periodonto<sup>171, 379</sup>. Este tema, será novamente abordado aquando da discussão dos resultados.

Para finalizar, importa referir que, as PDLSCs, em relação às demais células estaminais dentárias, podem constituir uma população muito particular, expressando altos níveis de Scleraxis (fator de transcrição específico do tendão)<sup>380</sup>, que poderá representar um marcador específico para estas células. Este aspeto estará certamente relacionado com a capacidade de resistência mecânica das células do ligamento periodontal.<sup>380</sup>

O folículo dentário é uma região constituída maioritariamente por um tecido conjuntivo laxo que rodeia o órgão dentário em desenvolvimento<sup>381,382</sup>. O folículo dentário está ainda presente em dentes impactados, frequentemente extraídos e desperdiçados<sup>383</sup>. No entanto, o folículo dentário pode constituir uma fonte de células estaminais (células estaminais do folículo dentário - DFSCs) facilmente acessível, que podem ser criopreservadas por muitos anos e posteriormente cultivadas<sup>381,382,384</sup>.

A caracterização destas células mostrou o seu grande potencial nos processos de regeneração dentária, com particular expressão nos tecidos periodontais e regeneração óssea. Estas células mostraram-se capazes de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos, adipócitos e alguns tipos de células neurais. Porém, as células do folículo dentário parecem maioritariamente comprometidas na linha fibroblástica e cementoblástica<sup>382</sup>. É de salientar ainda que estas células apresentam *in vivo* características e comportamentos semelhantes às PDLSC<sup>382,385</sup>.

Uma nota final para evidenciar que as DPSCs, SHEDs, SCAPs, PDLSC e DFSCs parecem apresentar enormes capacidades de diferenciação específicas de células estaminais de natureza mesenquimatosas e de natureza neuronal, o que aliada a sua fácil acessibilidade e preservação lhe conferem um grande espectro de possibilidades em muitas áreas da engenharia de tecidos, não só no campo da medicina dentária como da medicina.

#### **4.4 Interação entre o sistema imunitário e a atividade das células estaminais no potencial regenerativo da polpa e dos tecidos periapicais**

A identificação e caracterização dos eventos celulares e moleculares, associados aos mecanismos de infeção e inflamação da polpa e dos tecidos periapicais apresenta-se como fundamental para o desenvolvimento de novas abordagens nos tratamentos a seguir visando uma verdadeira regeneração tecidual, bem como para a interpretação dos resultados obtidos neste trabalho. Considerando a influência dos processo infecciosos /inflamatórios na funcionalidade das células estaminais pareceu-nos pertinente proceder a uma pequena exposição sobre este temática.

##### *4.4.1 Lesões pulpares*

A resposta imunoinflamatória constitui uma interação dinâmica entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e as agressões microbianas. De facto, a inflamação é uma resposta biológica

e fisiológica dos tecidos vivos a uma agressão, que direcionam elementos celulares e humorais para o local onde se processou a agressão. Compreende-se, pois, que a ativação do sistema imune, seja essencial para a nossa própria defesa. Porém, a polpa dentária é uma estrutura que, de certa forma, se encontra comprometida na sua capacidade de responder a agressões, por estar confinada num ambiente não expansível e não possuir circulação colateral suficiente. Este último aspeto vai reduzir a capacidade do sistema imunológico no combate a infeções<sup>27</sup>. Assim, quanto mais intenso for o processo de infeção/inflamação do tecido pulpar menor será a sua capacidade de resposta<sup>154, 386</sup>.

O infiltrado inflamatório, formado como reação à presença bacteriana no canal radicular, é constituído por diferentes células imunitárias e por uma grande variedade de fatores que regulam a sua ação, representando um primeiro passo com o objetivo de rapidamente eliminar os agentes patogénicos e iniciar um processo de resolução/cicatrização. As respostas imunoinflamatórias são bastante diversas e podem envolver alterações na microcirculação, transmigração de células sanguíneas para o espaço tecidual e ativação de nervos sensoriais<sup>53</sup>.

A resposta inflamatória inicial aos processos de cárie é caracterizada por uma acumulação focal de células inflamatórias, que é mediada inicialmente pelos odontoblastos e posteriormente pelas células dendríticas. De facto os odontoblastos possuem recetores específicos que ao reconhecerem moléculas associadas a patogénios (maioritariamente de natureza bacteriana), desencadeiam diversos mecanismos de defesa. Com efeito, assim que estes recetores odontoblásticos são estimulados produzem citocinas pró-inflamatórias, quimioquinas e peptídeos antibacterianos que resultam no recrutamento e estimulação de células imunes efetoras, bem como na morte direta das bactérias. Estes elementos agem em combinação com TGF- $\beta$  libertado da dentina com lesão de cárie. O influxo subsequente de células efetoras é composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Este infiltrado celular é acompanhado pelo brotamento de capilares em resposta a fatores angiogénicos e fibras nervosas em íntima proximidade<sup>387</sup>.

À medida que a lesão cariosa progride, aumenta a densidade do infiltrado inflamatório e das células dendríticas. Estas células são por sua vez responsáveis pela apresentação de antigénios e pela estimulação de linfócitos T agregando-se inicialmente na polpa e região subodontoblástica, mas estendendo-se depois para a camada odontoblástica e por fim para os túbulos<sup>53</sup>.

Acredita-se que os efeitos dos agressores pulpares decorrente de cárie, procedimentos restauradores ou traumatismos sejam cumulativos, ou seja a cada nova agressão a polpa diminui a capacidade de permanecer vital. Neste âmbito, deverá ser feito todo o esforço no sentido de minimizar qualquer agressão adicional particularmente durante os procedimentos restauradores, pois é possível que uma agressão excessiva possa converter uma lesão pulpar de um estado reversível para um outro irreversível<sup>387</sup>.

A primeira fase do processo inflamatório tem uma importância crucial para a sua resolução, sendo de realçar a sua influência no recrutamento de células estaminais. De facto, foi já demonstrada a presença de células estaminais mesenquimatosas em polpas infetadas e sobretudo nos tecidos periapicais de dentes infetados, sendo importante compreender como todo o processo inflamatório pode influenciar a atividade destas células<sup>154, 209, 386, 388</sup>.

A este respeito é importante sublinhar que a maioria das células estaminais/progenitoras existentes na polpa dentária, para além de constituírem apenas 1% das células pulpares<sup>337</sup>, têm uma capacidade de divisão limitada, designada por *Hayflick limit*<sup>389</sup>. Este limite representa o número de vezes que uma população celular consegue entrar em mitose, antes de parar de se dividir. O número de divisões possível está relacionado com o comprimento dos seus telómeros, essenciais para a estabilização dos cromossomas e processos de replicação<sup>390</sup>. Cada vez que a célula se divide, o comprimento dos seus telómeros diminui e, quando atinge um ponto crítico, a célula fica incapaz de se dividir. A isto, chama-se senescência replicativa. Assim as células estaminais embrionárias, por possuírem atividade telomerásica, apresentam uma muito maior capacidade de autorrenovação do que as células estaminais pós natais e, por sua vez, as células estaminais do adulto vão perdendo, com o avançar da idade, as suas capacidade de proliferação e diferenciação<sup>391</sup>.

De notar, mais uma vez, que Alongi *et al.*<sup>392</sup> vieram confirmar a existência de células estaminais em situações de pulpíte, salientando o facto de apresentarem uma senescência prematura, ou seja um *population doubling* mais baixo. Por outro lado, apesar de expressarem igual ou maior intensidade nos perfis de marcação as células estaminais presentes em situações inflamatórias apresentam uma diminuição do seu potencial dentinogénico. Com efeito, certas citoquinas como o TNF- $\alpha$  e IL-1, parecem reduzir as capacidade de diferenciação das DPSC, nas polpas infectadas<sup>15, 392</sup>.

Mais recentemente, Pereira *et al.*<sup>393</sup> ao compararem células estaminais extraídas de uma polpa dentária considerada saudável, com células estaminais provenientes de polpas inflamadas verificaram que não se observavam diferenças significativas quanto à sua morfologia, taxa de proliferação e potencial de diferenciação.

Ainda no âmbito dos processo inflamatórios, torna-se necessário salientar que as células estaminais podem, elas próprias, também modular as respostas inflamatórias. Neste contexto importa referir que os processos inflamatórios vão influenciar o desempenho das células estaminais e que, por sua vez, as células estaminais expressam recetores para inúmeros mediadores inflamatórios podendo exercer uma atividade imunomoduladora, geralmente imunossupressora, das respostas imunoinflamatórias<sup>386</sup>.

Um aspeto fundamental ainda a ter em conta reside na diferença entre as situações verificadas antes e depois dos tratamentos endodônticos utilizados para debelar a infeção (antisepsia com hipoclorito de sódio, medicação intracanal com hidróxido de cálcio ou pasta triantibiótica) e promover a cicatrização (aplicação de materiais endodônticos como o MTA e as matrizes). Verifica-se, geralmente, como era de prever, um desequilíbrio antes do tratamento e uma situação mais favorável depois do tratamento. Neste âmbito não podemos deixar de referir que certos mediadores

inflamatórios podem exercer ao mesmo tempo efeitos protetores e destruidores<sup>394</sup>. Tomemos como exemplo a IL-1, altamente responsável pela reabsorção das trabéculas ósseas localizadas nas regiões periapicais, verificou-se que a utilização de antagonistas dos recetores da IL-1, resulta numa diminuição, em cerca de 60%, das lesões ósseas<sup>386</sup>. Porém esta interleucina, exerce também um importante papel na defesa antibacteriana tendo sido já confirmado que a sua completa inativação conduz a um aumento da dimensão das lesões e a uma grave morbidade, que pode assumir um carácter sistémico<sup>395</sup>. De qualquer modo um tratamento antibacteriano atempado e eficaz, ao remover o agente causal, vai promover o declínio do número de células do sistema imunitário e reduzir a intensidade das reações de defesa diminuindo a presença de citocinas e quimioquinas pró-inflamatórias e os seus efeitos adversos. Esta situação favorece o aparecimento de um equilíbrio positivo, traduzido num aumento das citocinas anti-inflamatórias e fatores reparadores, bem como uma maior intensidade no recrutamento, proliferação e diferenciação das células estaminais mesenquimatosas<sup>386</sup>. É cada vez maior a capacidade demonstrada por certas citocinas e fatores de crescimento na modulação das células estaminais dentárias, promovendo processos de reparação. Os fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 3, BMP-2, BMP-4, BMP-7, IGF-1, VEGF e outras moléculas bioativas, libertadas da matriz dentinária (como resultado de lesões de cárie ou decorrente de aplicação de procedimentos e materiais endodônticos ou restauradores, como hidróxido de cálcio e MTA) podem influenciar as células estaminais da polpa dentária no sentido odontoblástico e desencadear a síntese de dentina reparadora<sup>160, 162, 163, 303, 308, 309, 325, 396</sup>.

Importa referir mais uma vez que, nem só as células estaminais tem a capacidade de receção de sinais provenientes do meio inflamatório em seu redor, através de vários recetores, mas também elas próprias têm capacidade de expressar várias citocinas e fatores de crescimento (IL-6, IL-8, IL-11 e M-CSF) com propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias<sup>397, 398</sup>.

Em síntese: a) a ativação dos processos inflamatórios pode ser considerada uma etapa crucial, senão mesmo um pré-requisito, no desencadear dos mecanismos de regeneração, incluindo os do complexo pulpo dentinário. Porém, a sua progressão e agravamento podem conduzir a uma grande destruição dos tecidos e mínimas capacidades de regeneração, b) as citocinas e os fatores de crescimento sintetizados/libertados localmente podem aumentar ou diminuir o recrutamento, proliferação e/ou diferenciação das células estaminais, c) é possível detectar e isolar células estaminais/progenitoras na polpa de dentes infetados, ainda com potencial regenerativo, embora segundo alguns autores com uma capacidade odontogénica reduzida, d) as células estaminais mesenquimatosas (incluindo as de origem dentária) expressam recetores para numerosos mediadores inflamatórios que podem ser sintetizados quer por células de natureza inflamatória, quer por células pulpares e periapicais lesadas, ou mesmo libertados a partir da dentina ou libertados a partir de materiais utilizados durante os procedimentos endodônticos e e) as células estaminais mesenquimatosas possuem propriedades imunossupressoras mediadas por fatores solúveis<sup>154, 303, 386, 392, 399</sup>.

O correto equilíbrio entre agentes bacterianos, células estaminais, células do sistema imunitário e imunomoduladores, depois do tratamento, irá proporcionar um ambiente adequado à cicatrização<sup>386</sup>.

O processo inflamatório quando em baixo grau promovem os mecanismos regenerativos incluindo os processo angiogénicos. A libertação de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos afetados resultam na formação de gradientes quimiotáticos que conduzem ao recrutamento e ativação das células dos sistema imunitário e das células estaminais. Pode pois considerar-se que as citocinas pró-inflamatórias exerçam numa fase inicial um efeito benéfico na sobrevivência dos odontoblastos e/ou sua diferenciação. Nos processos mais prolongados maior duração, intensidade e extensão verifica-se o contrário e o seu efeito pode ser destruído<sup>154</sup>.

#### 4.4.2 Lesões periapicais

Os tecidos periapicais são constituídos por cimento, ligamento periodontal e osso alveolar.

As respostas dos tecidos perirradiculares às diversas agressões é semelhante à de outros tecidos conjuntivos, manifestando-se normalmente como uma reação imunoinflamatória. Embora a infeção microbiana presente na polpa nos canais radiculares seja a causa primária da periodontite apical, as alterações patológicas dos tecidos periapicais, não são geralmente causadas diretamente pelos microrganismos em si, mas preferencialmente pelas suas toxinas e pelos seus produtos metabólicos nocivos, capazes de induzir importantes respostas imunoinflamatórias<sup>180, 386</sup>. De facto, a maior parte dos danos que ocorrem na periodontite apical são principalmente devidos à atividade celular e aos mediadores inflamatórios, que alteram a histofisiologia dos tecidos periapicais. Assim, a periodontite apical pode ser protetora ou destrutiva, dependendo da interação dinâmica entre a agressão microbiana e a capacidade de proteção dos tecidos periapicais<sup>180, 386</sup>.

A classificação histopatológica da periodontite apical é baseada nos tipos de células características das reações imunoinflamatórias presentes. A resposta imunoinflamatória aguda é caracterizada pela presença de neutrófilos e a crónica pela presença de linfócitos e macrófagos. Porém as respostas imunoinflamatórias não são fases visíveis de um evento isolado, mas sim duas respostas sobrepostas, ainda que com programas e mecanismos parcialmente distintos<sup>180</sup>.

As lesões dos tecidos periapicais que ocorrem na fase aguda, podem ser devidas à libertação de enzimas proteolíticas, lisossomais e de metaloproteinases da matriz provenientes de neutrófilos desintegrados e macrófagos, em vez das bactérias e suas toxinas<sup>180</sup>.

Na periodontite apical aguda primária a destruição óssea apical geralmente não é observada na radiografia, devido ao pouco tempo de duração da resposta aguda, uma vez que os neutrófilos e macrófagos ativados, não são capazes de reabsorver matriz óssea. Os mecanismos de osteoclastogénese requerem algum tempo e deste modo só mais tarde se podem observar as áreas de reabsorção óssea<sup>180</sup>.

De referir ainda que, muitos dos danos dos tecidos periapicais resultam da ativação das células T que expressam altos teores de RANKL (quer na forma transmembranar, quer solúvel),

sendo capazes de induzir diretamente (sem intervenção dos osteoblastos) os mecanismos de osteoclastogênese e de diferenciação osteoclástica, sendo por este motivo a periodontite considerada muitas vezes uma *RANKL disease*<sup>180</sup>.

Muitos são também os trabalhos que têm vindo a demonstrar<sup>400</sup> que algumas citocinas pró-inflamatórias e os lipolissacarídeos componentes da superfície da parede de algumas bactérias Gram negativas (LPSs) podem estar envolvidos na diferenciação terminal dos osteoclastos, de uma forma independente dos osteoblastos (ou seja, sem a necessidade do contacto direto com estas células). Tanto a interleucina-1 (IL-1), como a interleucina-6 (IL-6) como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) podem estimular por si só a osteoclastogênese, sem recurso ao eixo RANKL/RANK<sup>400</sup>.

Com efeito na infeção canal, as potentes endotoxinas (LPSs) estimulam por si só (de uma forma direta), ou através da expressão de citocinas pró-inflamatórias, a atividade osteoclástica. A perda de radiopacidade típica da lâmina dura é muitas vezes interpretada como uma imagem de marca da periodontite apical crónica, traduzindo uma resposta inflamatória associada aos processos de reabsorção óssea.

Estes mecanismos estão muitas vezes subjacentes à atividade e progressão de certas doenças como é o caso da periodontite, podendo afetar seriamente o osso alveolar, ao provocar grandes áreas de reabsorção óssea.

Infelizmente, o biofilme bacteriano formado nos sistemas de canais radiculares com polpa necrosada está maioritariamente protegido das defesas do hospedeiro e da terapia antibiótica, devido à falta de circulação sanguínea nos referidos canais. Consequentemente, qualquer medida terapêutica de natureza sistémica para reparar/regenerar os tecidos periapicais é quase sempre inútil, já que as toxinas bacterianas e os metabólitos nocivos provenientes dos canais radiculares se deslocam continuamente para as áreas periapicais. Estes biofilmes bacterianos podem, no entanto, ser significativamente reduzidos, ainda que não completamente eliminados, recorrendo a terapias endodónticas não cirúrgicas como a instrumentação manual e mecanizada, irrigação antisséptica e medicação intracanal<sup>180</sup>.

Uma pequena nota mais para pôr em evidência que a cicatrização pulpar pode ocorrer mesmo quando a remoção dos agentes bacterianos for incompleta. Do mesmo modo, a cicatrização dos tecidos periapicais pode verificar-se apesar de uma deteção positiva de bactérias no canal. Ou seja, mesmo quando algumas bactérias persistem, o processo de cicatrização pode ocorrer, ou pelo menos, pode ser conseguida uma situação clinicamente satisfatória e estável. Isto pode ser explicado em parte pela presença de um número reduzido/baixa virulência bacterianos ou selamento eficiente com consequente bloqueio de nutrientes para as bactérias residuais<sup>401, 402</sup>.

Finalmente importa sublinhar que, tal como na polpa, foi já demonstrada a presença de células STRO-1, CD146 e CD44 positivas, nas porções médias e apicais do ligamento periodontal e cimento radicular nos dentes afetados por periodontite<sup>403</sup>. De facto, nas superfícies radiculares de dentes com periodontite é muito evidente a presença de células estaminais no ligamento periodontal,

indiciando a ativação deste grupo de células para a regeneração da área afetada<sup>403</sup>. Por sua vez, estas células parecem responder facilmente a mudanças na matriz extracelular e à presença de citocinas inflamatórias. Com efeito, através de um processo de proliferação e diferenciação vão contribuir significativamente para a cicatrização das áreas afetadas<sup>377, 403</sup>.

#### **4.5 Transplantação celular versus homing celular**

Apesar de *a priori* a transplantação de células estaminais da polpa dentária constituir um dos recursos com maior potencial utilizados nos mecanismos de regeneração do tecido pulpar, este procedimento encontra, no entanto, na prática clínica, grandes barreiras e limitações<sup>33, 211</sup>. Para além de representarem técnicas muito complexas e onerosas, as dificuldades na colheita, isolamento, cultura, manipulação e amplificação das células estaminais são exemplos adicionais das inúmeras complexidades a ultrapassar<sup>33</sup>.

A possibilidade de implementar mecanismos capazes de desencadear o recrutamento e migração de células estaminais endógenas provenientes do sistema circulatório ou dos tecidos adjacentes, para os locais anatómicos onde se verificaram as lesões (tendo por base processos quimiotáticos ou similares desencadeados por fatores solúveis libertados pelos tecidos danificados), processo vulgarmente conhecido como *cell homing*, será também um passo importante na estratégia de regeneração do tecido pulpar<sup>33</sup>.

Com efeito, o *homing* celular apresenta-se como uma grande alternativa ao transplante de células de polpa dentária<sup>404-407</sup>. A complexidade e custos desta metodologia seriam substancialmente reduzidos quando comparados com as técnicas de transplantação de células e uso de bioreatores *ex vivo*<sup>33, 34</sup>.

De facto, verifica-se a existência de um grande número de problemas associados às terapias de células estaminais que incluem entre outras, segundo Bhartt e Le<sup>408</sup> e Zivkocik<sup>193</sup>: a) a dificuldade na obtenção de número suficiente de células estaminais sem causar grande morbilidade no local de colheita, b) as células transplantadas têm uma grande tendência para migrarem resultando, no final do processo, na presença de um pequeno número de células do dador no local de transplantação, c) uma vez que as células estaminais após colheita são normalmente sujeitas a uma expansão *ex vivo* podem não conseguir manter *in vivo*, a viabilidade e capacidade de diferenciação necessárias ao sucesso do processo regenerativo e d) não existe ainda conhecimento suficiente sobre a estabilidade cromossômica e atividade tumoral das células estaminais dentárias.

Apesar das limitações acima referidas a introdução na prática clínica de uma terapêutica baseada em células estaminais dentárias vai certamente representar uma ferramenta importante nos mecanismos regenerativos quer na área da Medicina Dentária, quer na área da regeneração craniofacial<sup>193</sup>.

Os mecanismos moleculares que controlam a migração e diferenciação das células estaminais ainda está longe de ser conhecido. De entre os fatores que regulam o *homing* das células estaminais para os locais lesados estão incluídos fatores solúveis libertados pelos tecidos e células danificadas. Porém a baixa densidade de células estaminais e o seu limitado potencial regenerativo podem não ser suficientes para conseguir regenerar grandes áreas de tecido danificado, como é o caso das grandes lesões inflamatórias periapicais<sup>33</sup>.

#### 4.6 Regeneração pulpar e angiogénese

O desenvolvimento e otimização de mecanismos pró-angiogénicos adquire uma importância crucial no campo da reparação e regeneração pulpar. Na verdade o sucesso da engenharia de tecidos, em particular na endodontia regenerativa, reside no rápido restabelecimento de uma rede vascular visando satisfazer as altas exigências metabólicas dos processo de reparação e regeneração<sup>166</sup>. Este aspeto assume especial relevância no espaço pulpar, tendo em conta a ausência de vascularização colateral. Assim o desenvolvimento de estratégias que estimulem os processo de neovascularização pulpar constituem um dos maiores desafios no campo da engenharia de tecidos associados aos processo de endodontia regenerativa.

No adulto, os novos vasos sanguíneos originam-se como capilares que brotam a partir de pequenos vasos já existentes. Este processo de angiogénese surge em resposta a sinais específicos. De facto a angiogénese é muito controlada por fatores libertados pelos tecidos circundantes<sup>166</sup>. O aparecimento de uma lesão tecidular induz desde logo um grande e repentino crescimento de capilares nas vizinhanças, constituindo uma fase inicial do mecanismo de cicatrização<sup>166</sup>. Vários fatores de crescimento e ambientais são reconhecidamente capazes de influenciarem a formação de uma nova rede vascular<sup>27</sup>. Com efeito, as células endoteliais respondem a sinais produzidos pelos tecidos que elas próprias invadem<sup>166</sup>. O fator de crescimento das células endoteliais vascular(VEGF) é considerado o mais importante fator de regulação da vasculogénese e angiogénese, induzindo ativamente as células endoteliais na formação de novas estruturas capilares<sup>166</sup>.

A existência de áreas de hipóxia tão frequentes em situação de inflamação e necrose, estimulam a indução de VEGF<sup>27,409</sup>. Uma falta de oxigénio, em praticamente qualquer tipo de célula, causa um aumento na concentração intracelular da forma ativa do gene de uma proteína reguladora designada por fator I induzido por hipóxia (HIF-I alfa). O HIF-I alfa estimula transcrição do gene VEGF. A proteína VEGF é então secretada, difunde-se através do tecido e atua sobre as células endoteliais próximas<sup>166</sup>. Quando os novos vasos se formam a concentração eleva-se e a atividade HIF-I alfa diminui, assim como a produção de VEGF<sup>127,166</sup>.

Nos mecanismos de endodontia regenerativa, para além de um nítido aumento da neovascularização do tecido pulpar, foi demonstrado que o VEGF, é capaz de induzir a diferenciação da DPSCs e das SHEDs, em células endoteliais<sup>27,254,410</sup>. Os estudos de Marchionni *et al.*<sup>411</sup> mostraram um forte

potencial angiogénico das DPSCs induzido pelo VEGF, quando cultivados na presença de uma rede tridimensional de fibrina. Também os trabalhos de Sakai *et al.*<sup>203</sup> e Cordeiro *et al.*<sup>253</sup> vieram demonstrar que as SHEDs apresentam uma grande capacidade de se diferenciar *in vivo* em estruturas vasculares funcionais. Um das principais fontes de fatores angiogénicos necessários para a diferenciação das SHEDs e DPSCs em células endoteliais parece residir na matriz dentinária envolvente.

Assim, em síntese poder-se-á considerar que as células estaminais da polpa constituem uma fonte única de células de grande importância na endodontia regenerativa uma vez que fornecem ao mesmo tempo as células indiferenciadas essenciais ao processo de regeneração pulpar, bem como a rede vascular que irá suportar o novo tecido regenerado<sup>191, 253</sup>.

## **II. Estudo experimental em modelo animal**



## I. Objetivos

Tentando encontrar uma matriz com melhores capacidades do que o coágulo sanguíneo, que possibilitasse a regeneração e reabilitação morfofuncional do complexo pulpo-dentinário, foram utilizadas matrizes de hialuronato de sódio e quitosano (HA:CS) e pectina e quitosano (P:CS).

Deste modo, este estudo experimental pretende avaliar *in vivo*, com base num modelo animal, a resposta dos tecidos pulpo-periapicais em dentes com ápice imaturo com necrose pulpar e periodontite apical, após tratamento com diferentes materiais e técnicas (apexificação e revascularização pulpar), tendo por base estudos radiográficos, histológicos, imunocitoquímicas e histomorfométricos.

Os tratamentos endodônticos e restauradores foram efetuados recorrendo ao instrumental e técnicas usados em dentes humanos.

Os materiais foram selecionados com base na literatura publicada, que assenta numa relativa consensualidade. Foi utilizado o MTA, tanto na técnica de apexificação, como na realização da barreira cervical nos tratamentos de revascularização, por se considerar no presente como um material de referência.

Este trabalho foi ainda concebido com o objetivo de avaliar e comparar, em relação ao coágulo sanguíneo utilizado na técnica de revascularização, o desempenho biológico de novas matrizes, colocadas no espaço pulpar disponível. Assim, foram adicionadas duas matrizes liofilizadas, uma de ácido hialurónico e quitosano (HA:CS) e outra de pectina e quitosano (P:CS), ao coágulo sanguíneo, de modo a criar de um microambiente favorável aos processos de regeneração.

A avaliação dos resultados dos procedimentos de revascularização, em dentes imaturos com diagnóstico de necrose pulpar, baseia-se geralmente em exames de natureza radiográfica, sendo muito escassos os estudos histológicos que descrevam com pormenor a verdadeira natureza dos tecidos presentes no espaço pulpar.

É neste âmbito que se situa o objetivo principal do trabalho experimental aqui apresentado.

Este trabalho experimental foi concebido tendo como objetivos:

- a) Primário: avaliação radiográfica, histológica e histomorfométrica de dentes permanentes imaturos necrosados e com periodontite apical sujeitos a protocolos de:
  - i. Apexificação com MTA.
  - ii. Revascularização pulpar após colocação de diferentes matrizes: coágulo sanguíneo, ácido hialurónico/quitosano e pectina/quitosano.
  
- b) Secundário: análise dos tecidos neoformados durante os processo de revascularização e reparação periapical, tendo por base estudos histomorfológicos, imunocitoquímicos e histomorfométricos.
  - i. Identificação dos tecidos formados no canal radicular.
  - ii. Identificação dos tecidos envolvidos no crescimento radicular.
  - iii. Encerramento apical e sua caracterização.

Com base nas observações genéricas foram elaboradas as seguintes questões científicas:

- Quais as principais diferenças verificadas entre os resultados obtidos com a técnica de apexificação e com as metodologias de revascularização do espaço pulpar?
  
- Quais as matrizes utilizadas nos procedimentos de revascularização (coágulo sanguíneo, coágulo sanguíneo + HA:CS e coágulo sanguíneo + P:CS) que apresentam o melhor desempenho, relativamente aos processo de reparação, revitalização ou regeneração do espaço canalar, em dentes permanentes imaturos com necrose pulpar?

## **2. Materiais e Métodos**

Como já foi referido, o presente estudo pretendeu avaliar *in vivo* a eficácia de um novo protocolo de revascularização pulpar, tendo por base a aplicação de diferentes matrizes biológicas: a) Coágulo sanguíneo, b) matriz poliméricas de ácido hialurónico/quitosano (HA:CS) e c) matriz polimérica de pectina/quitosano (P:CS).

A técnica de apexificação com MTA foi utilizada como grupo de referência, constituindo atualmente o *gold standard* do tratamento de dentes permanentes imaturos com necrose pulpar.

## 2.1. Matrizes

### 2.1.1. Síntese das matrizes

O coágulo sanguíneo representa uma matriz natural que é formada *in situ* por mecanismos fisiológicos, tendo já sido descrito em parágrafos anteriores.

As restantes matrizes poliméricas utilizadas no presente trabalho, foram desenvolvidas no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra com coordenação da Prof. Doutora Paula Ferreira (síntese e caracterização das matrizes). Os testes de biocompatibilidade foram realizados no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, sob orientação do Prof. Doutor Ilídio Correia. Os trabalhos de síntese dos complexos polieletrólíticos encontram-se já publicados<sup>215, 247</sup>.

As duas matrizes (ou *scaffolds*) poliméricas e biodegradáveis para regeneração do tecido pulpar foram preparadas com base em combinações de pectina/quitosano (P:CS) e hialuronato de sódio/quitosano (HA:CS). Para tal, foram preparadas soluções de pectina e de quitosano na concentração de 1% Massa/Volume (m/v) numa solução de tampão acetato a pH=4,5. A solução de hialuronato de sódio foi preparada na mesma solução tampão, mas na concentração de 2% (m/v). Os complexos polieletrólíticos (PECs) foram produzidos pela mistura das soluções de P:CS (na proporção 1:1) e de HA:CS (na proporção 2:1) (Figura 20), à temperatura ambiente e sob agitação mecânica.

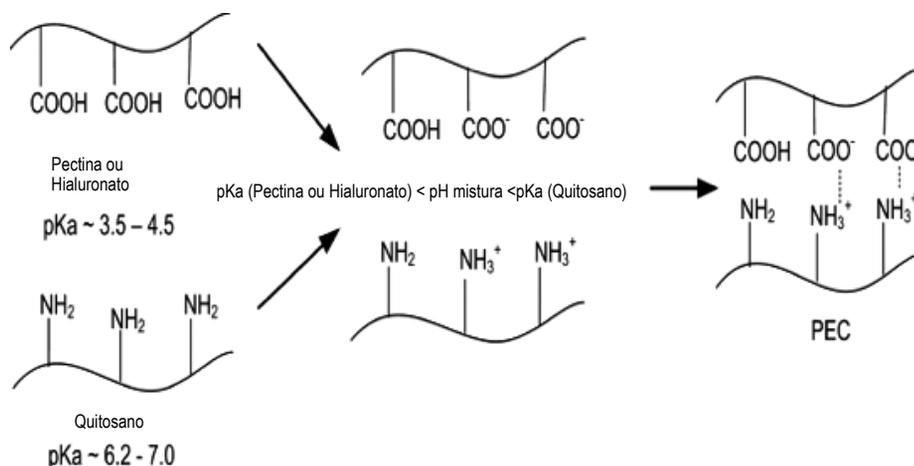


Figura 20. Representação esquemática da reação dos complexos polieletrólíticos (PEC): hialuronato de sódio (HA) ou pectina (P) com quitosano (CS).

Após formação e precipitação, os PECs foram isolados por centrifugação, congelados em azoto líquido e finalmente liofilizados durante pelo menos 8 horas. As amostras obtidas foram colocadas num molde cilíndrico (4 mm de altura por 2 mm de diâmetro) de forma a melhor se adaptarem ao formato pretendido e poderem ser inseridas no canal radicular (Figura 21).

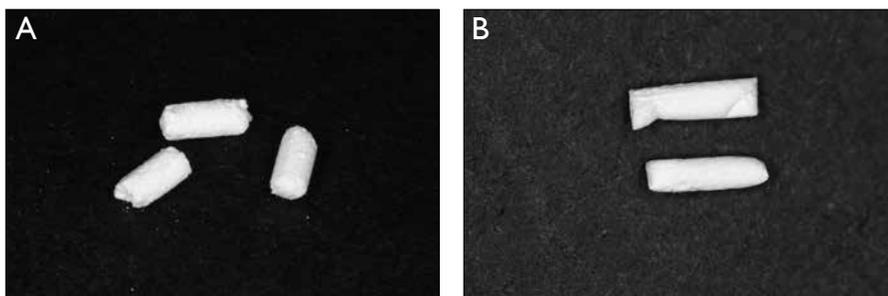


Figura 21. Imagens das matrizes compostas por A) HA:CS e B) P:CS.

As matrizes obtidas no final da síntese foram analisadas de forma a avaliar a sua potencial aplicação na regeneração de tecido pulpar. Foram também determinadas algumas características, como a capacidade de absorção de água, a morfologia e a biocompatibilidade.

Todos os polímeros utilizados na preparação das matrizes são de natureza hidrofílica, o que resultou na formação de complexos com a mesma natureza. A capacidade de absorção de água das amostras, calculada por imersão das mesmas em meio aquoso, demonstrou ser consideravelmente elevada. Esta capacidade de absorção de meios aquosos, aquando da sua aplicação *in vivo*, permitirá que os fluídos sanguíneos sejam rapidamente absorvidos pelo material e, como tal, incorporados na sua estrutura. Este fenómeno poderá ser um fator adjuvante para a regeneração do tecido em causa. No entanto, e apesar desta elevada absorção de água pelo material, os estudos de perda de massa demonstraram que as matrizes são resistentes à solubilização, mantendo aproximadamente 65% da sua massa após 5 semanas de imersão numa solução de tampão fosfato (PBS) a 37°C. O tempo de resistência desta matriz com consequente manutenção da sua estrutura, será importante para que o tecido tenha tempo para ser reparado/regenerado de forma eficaz.

As imagens das matrizes obtidas em microscopia electrónica de varrimento (MEV) (Figuras 22 e 23) demonstraram a sua estrutura altamente porosa e irregular.

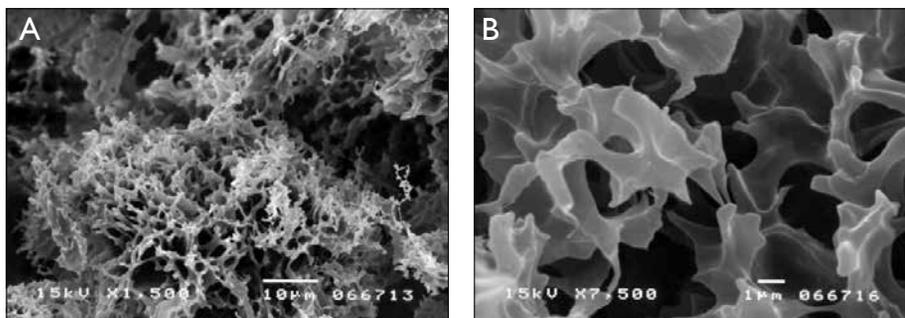


Figura 22. Imagens em MEV da morfologia da matriz composta por HA:CS com diferentes ampliações: A) 1500x, B) 7500x (imagens gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira).

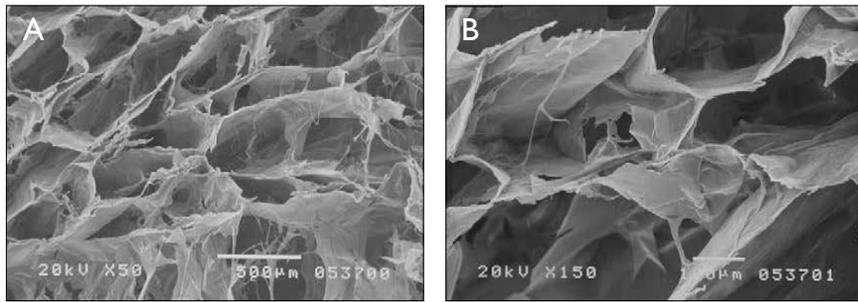


Figura 23. Imagens em MEV da morfologia da matriz composta por P:CS com diferentes ampliações. A) 50x e B) 150x (imagens gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira)

A existência de poros numa matriz utilizada para regeneração de tecidos é fundamental para que possa ocorrer o crescimento e migração celular, bem como permitir a chegada de nutrientes e a eliminação dos produtos resultantes do seu metabolismo.

Os testes de biocompatibilidade foram realizados *in vitro* utilizando células mesenquimatosas da medula óssea de ratos Wistar. Com base na sua observação em microscopia, foi possível verificar que as células aderiram e proliferaram na superfície destas matrizes (Figura 24), demonstrando a sua biocompatibilidade e ausência de citotoxicidade.

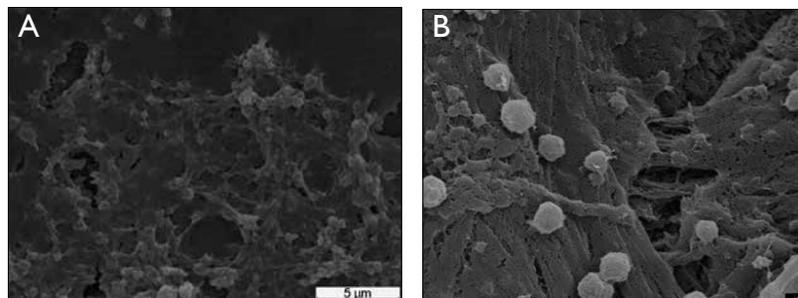


Figura 24. Aspeto em MEV das células mesenquimatosas da medula óssea na A) superfície da matriz de HA:CS, ampliação no original de 3500x. B) Superfície da matriz de P:CS, ampliação no original de 5000x (imagens gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Paula Ferreira).

## 2.2. Medicação intracanal

### 2.2.1. Pasta de hidróxido de cálcio

No presente estudo foi utilizada uma pasta de hidróxido de cálcio (Calcur® Voco GmbH, Cuxhaven, Alemanha) com o n° de lote 0932251 e prazo de validade de 06/2011.

O hidróxido de cálcio é uma substância alcalina, de baixa solubilidade, com um pH de cerca de 12,5. Em solução aquosa dissocia-se em iões cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e hidróxido ( $\text{OH}^-$ ), sendo estes últimos

responsáveis pelo ambiente alcalino e pela sua ação antibacteriana. Por sua vez os iões hidroxilo são radicais livres de elevada reatividade, capazes de se ligarem a diversas biomoléculas.

### 2.2.2. Pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina)

A pasta triantibiótica consistiu na mistura de três antibióticos: metronidazol, ciprofloxacina e minociclina.

O Metronidazol é um antibiótico bactericida de origem sintética, pertencente à família dos 5-metroimidazóis (derivado heterocíclico com um núcleo de 5 átomos e com radical 5-NO<sub>2</sub>). Este fármaco apresenta um largo espectro de atividade contra bactérias anaeróbias estritas, microaerofílicas e forte ação antiparasitária, mediante a redução química intracelular do grupo 5-nitro (efetuada por mecanismos únicos do metabolismo de anaerobiose em microrganismos contendo o sistema piruvato-ferrodo-quina-oxireduases)<sup>412</sup>.

A ciprofloxacina (também incluída neste estudo), sendo uma quinolona de 2ª geração, é uma 6-fluoroquinolona sintética, em que a introdução dum ciclo aminado na posição 7, vai aumentar o seu espectro antibacteriano, com ação bactericida. Este antibiótico atua através da inibição da DNA girase.

As tetraciclina, que incluem a doxiciclina e minociclina, pertencem a um grupo de agentes antimicrobianos que, quando utilizados em doses terapêuticas, apresentam um mecanismo bacteriostático, com um amplo espectro de atividade contra microrganismos Gram-positivo e Gram-negativo. As tetraciclina são eficazes na maioria das espiroquetas, em muitas bactérias anaeróbias e aeróbias facultativas. O acesso das tetraciclina às células bacterianas ocorre por difusão passiva através da membrana externa, e por transporte ativo respetivo através da membrana interna. Finalmente verifica-se, a inibição primária da síntese proteica bacteriana ao nível da subunidade 30S dos ribossomas e o respetivo efeito bacteriostático<sup>412</sup>.

A minociclina (utilizada neste estudo experimental), é um derivado semissintético da tetraciclina (molécula lipofílica, que exibe um coeficiente de partilha de 0,98 no sistema octanol-tampão de fosfatos). O seu espectro antibacteriano é muito idêntico ao da doxiciclina, mas com maior atividade<sup>412</sup>.

#### 2.2.2.1 Preparação da pasta triantibiótica

O metronidazol 250mg, ciprofloxacina 250mg, minociclina 100mg e a água bidestilada foram adquiridos nos Laboratórios da Farmácia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC).

A pasta triantibiótica foi preparada no dia do tratamento, imediatamente antes do seu uso, com base na mistura dos diferentes antibióticos (sob a forma de pó) na proporção (1:1:1) em água bidestilada estéril (B Braun Medical, Portugal), mantendo-se as proporções finais recomendadas por Hoshino<sup>413</sup>, que determinam um rácio pó-líquido de 5:1 obtendo-se uma pasta homogénea, com uma concentração aproximada de 20mg/mL de cada um dos constituintes antibióticos.

### 2.3. MTA

No presente trabalho, foi utilizado o ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA) na sua forma branca, lote 0900121, com um prazo de validade de 04/2012.

O ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA) surgiu em 1993, após pesquisas desenvolvidas por Mahmoud Torabinejad e seus colaboradores na Universidade de *Loma Linda*, Estados Unidos da América.

O agregado de trióxido mineral ou *mineral trioxide aggregate* (MTA) é caracterizado como sendo um “cimento hidráulico” pois cristaliza na presença de meios húmidos, tendo sido desenvolvido a partir do cimento de *Portland* tipo I. Embora existam uma miríade de marcas comerciais, a constituição base do MTA permanece bastante similar em todas elas, com apenas algumas alterações em termos de composição, proporção dos seus componentes e propriedades físico-químicas. O MTA é um material cuja a composição química é muito similar à do cimento Portland (cimento utilizado na construção civil). Este pó consiste num agregado de partículas de sílica, cálcio, oxigénio, ferro, bismuto e outros componentes residuais (enxofre, magnésio, alumínio, potássio) resultantes do processo fabríco. A composição final do MTA consiste em silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, aluminoferrite tetracálcica, sulfato de cálcio dihidratado (gesso) e ainda de outros compostos residuais (calcite, óxido de bismuto, óxidos e sulfatos de metais alcalinos)<sup>414</sup>. De um modo geral, o MTA apresenta-se sob a forma de um pó fino e purificado, ao qual é necessário adicionar uma solução aquosa (água destilada ou soro fisiológico), mantendo as proporções recomendadas pelo fabricante, que determina um rácio pó-líquido de 3:1.

A hidratação do pó do ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA) com solução aquosa resulta num gel coloidal, o qual solidifica em menos de 3 h<sup>414-416</sup>.

### 2.4. Modelo experimental

Na realização deste trabalho experimental, foi usado um modelo animal, devidamente autorizado pela Direção Geral de Veterinária. Foram utilizados quatro cães (*Canis familiaris*) da raça *Beagle* de origem pura, nascidos e criados para fins de investigação e certificados pelo *Colegio Oficial de Veterinários da Catalunya*, Barcelona, com o n° 113039, adquiridos à *Isoquimen, S.L.* (Barcelona, Catalunha, Espanha). Todos os animais apresentavam uma identificação através de sistema de *chips* subcutâneos localizados na zona do dorso.

### 2.5. Manutenção e bem estar animal

A receção, observação, manutenção e procedimentos cirúrgicos foram executados no Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, sob supervisão do Investigador Coordenador Responsável pelo Bem Estar Animal o Prof. Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas.

À chegada dos animais com 4 meses de idade, as suas condições gerais de saúde, foram avaliadas por médicos veterinários acreditados e com experiência na área da experimentação animal. Excluídas quaisquer patologias crónicas ou agudas, os animais foram mantidos num período de quarentena, com observação diária, durante um intervalo nunca inferior a uma semana. Todos os animais tiveram uma fase de ambientação às novas instalações de cerca de 6 semanas, antes de qualquer intervenção.

No momento da primeira intervenção experimental os animais tinham cerca de 6 meses de idade e pesos compreendidos entre os 8 e os 9 quilogramas (Tabela 2).

Tabela 2. Tabela da identificação dos animais da amostra.

Nº do animal	Número de identificação	Sexo	Data de nascimento	Data da 1ª intervenção	Peso inicial (1ª intervenção)	Peso final (eutanásia)
1	93800000326185	Masculino	25/06/10	8/12/2010	8,30Kg	11,30
2	93800000352560			8/12/2010	9,10Kg	13,05
3	93800000488133			9/12/2010	8,90Kg	12,83
4	93800000515563			9/12/2010	8,45Kg	11,56

Os animais foram alojados em estruturas individuais normalizadas e adequadas para a sua espécie, devidamente identificadas em relação ao estudo em questão e ao número do animal, sendo mantidos em condições laboratoriais apropriadas de ciclos de luz e temperatura.

A água, facultada aos animais *ad libitum*, teve como origem a rede de abastecimento municipal. A dieta foi providenciada uma vez por dia, com ração seca de origem comercial (Canine Puppy Healthy Development Chicken, Lamb & Rice, Hills™) com concentrações de contaminantes controladas e analisadas pelo fabricante. Contudo após a primeira intervenção cirúrgica e durante o restante período experimental a ração foi amolecida em água antes de ser fornecida.

A manutenção dos animais e os protocolos anestésico e cirúrgico foram avaliados e aprovados pela Direção de Serviços de Saúde e Proteção Animal, da Direção Geral de Veterinária, com o nº0420/2011, respeitaram as Portaria nº 1005/92, de 23 de Outubro de 1992, Portaria nº 466/95, de 17 de Maio de 1995 e Portaria nº 1131/97, de 7 de Novembro de 1997, e os regulamentos da Legislação da Comunidade Europeia para o Bem-Estar Animal e Experimentação Animal.

## 2.6. Organização estrutural e cronológica do trabalho

Este trabalho experimental decorreu num período aproximado de 4 meses (entre Dezembro de 2010 e Abril de 2011), dividido pelas diversas fases de intervenção esquematizadas no *workflow* (Figura 25).

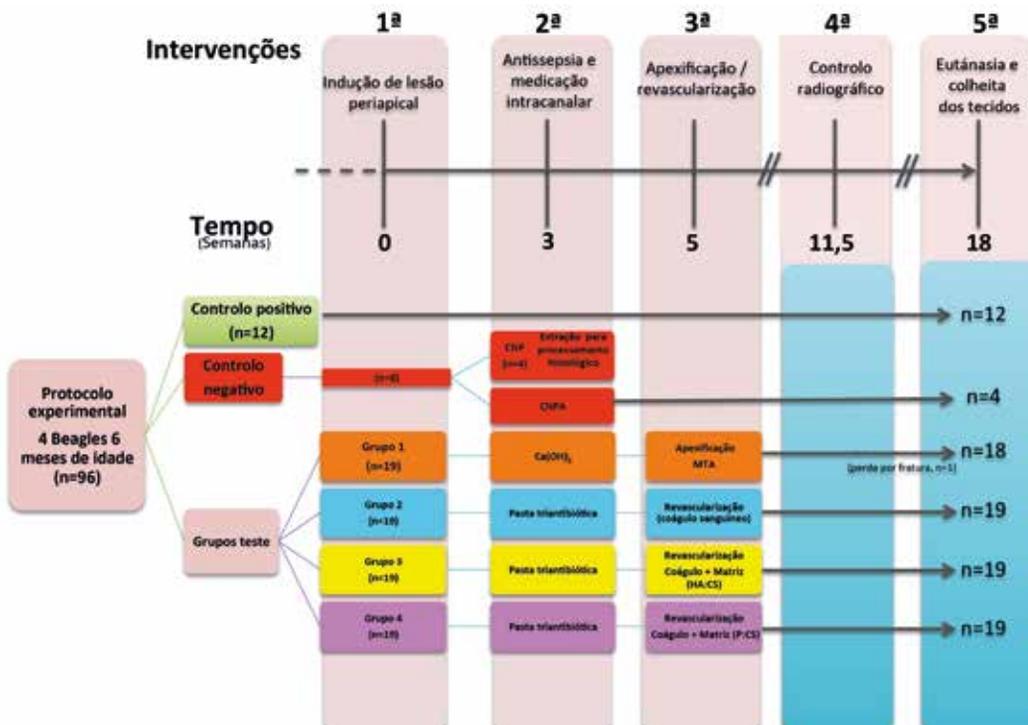


Figura 25. Workflow do estudo experimental em modelo animal.

## 2.7. Anestesia e sedação

Os procedimentos operatórios foram realizados no bloco operatório do Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. A equipa multidisciplinar envolvida nesta fase do ensaio experimental foi constituída por dois médicos dentistas, dois médicos veterinários, uma técnica de laboratório e duas tratadoras de animais.

Nas três primeiras intervenções, o protocolo anestésico a que os animais foram sujeitos consistiu numa pré-medicação inicial por via intramuscular (IM) com morfina 2% (0,3 mg/Kg, B Braun Medical, Portugal) e dexmedetomidina (0,005 mg/Kg, Dexdomitor®, Esteve Farma, Portugal), meia hora antes da intervenção. De seguida foi cateterizada a veia céfalica com um cateter (Introcan®-WV 22G, B Braun Medical, Portugal) e efetuada a indução anestésica geral com administração endovenosa de diazepam (0,2 mg/Kg, Diazepam Labesfal, Portugal) e propofol 2 mg/Kg (Propofol Lipuro 2%, B Braun Medical, Portugal). Esta perfusão venosa foi mantida com lactato de Ringer (Braun Vet, Portugal) sendo depois efetuada uma intubação com um tubo endotraqueal n° 6 (In tube®, Intersurgical, Portugal) para administração de uma mistura de oxigénio a 100 % com 1 a 2 % de isoflurano (Isoflo®, Esteve Farma, Portugal) de modo a permitir a manutenção anestésica.

No decurso das intervenções operatórias foi realizada uma monitorização contínua da frequência e ritmo cardíaco com eletrocardiograma(ECG), da pressão arterial média pelo método oscilométrico, da ventilação com capnografia e da saturação de oxigénio com oxímetro de pulso portátil. A temperatura corporal foi controlada de 30 em 30 minutos com termómetro digital.

No pós-operatório, todos os animais foram medicados com uma dose única subcutânea de meloxicam (0,2 mg/Kg, Meloxidyl®, Ceva Santé Animale, França). Não foi realizada qualquer antibioterapia.

Para os controlos radiográficos foi necessária a sedação dos animais através da administração intramuscular de butorfanol (0,2 mg/Kg, Dolorex®, Intervet Schering Plough Animal Health, Portugal) e dexmedetomidina (0,005 mg/Kg, Dexdomitor®, Esteve Farma, Portugal).

## 2.8. Grupos experimentais

Em cada um dos animais, foram selecionados 14 pré-molares (o primeiro, segundo e terceiro pré-molares superiores e o primeiro, segundo, terceiro e quarto pré-molares inferiores). Estes dentes foram divididos em 6 grupos, dos quais dois grupos de controlos (com 20 raízes) e quatro grupos de teste (76 raízes), envolvendo num total de 96 canais radiculares (Figura 26 e tabela 3).

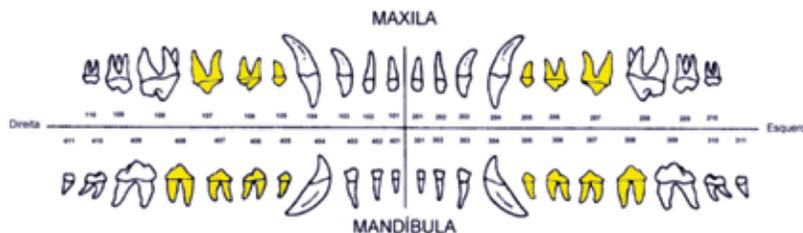


Figura 26. Odontograma do cão com identificação dos dentes sujeitos a tratamento.

Os grupos em estudo e respetivos materiais encontram-se descritos na tabela 3.

Tabela 3. Grupos, materiais e procedimentos do estudo.

Grupos	Procedimentos /Materiais	
	Apexificação/Revascularização pulpar	Nº de canais radiculares (n)
Controlo positivo	Dentes sem qualquer intervenção	12
Controlo negativo	Dente com lesão periapical (sem tratamento endodôntico)	8
1	Apexificação (MTA)	19
2	Revascularização pulpar (coágulo sanguíneo)	19
3	Revascularização pulpar (coágulo sanguíneo + matriz polimérica de ácido hialurónico e quitosano)	19
4	Revascularização pulpar (coágulo sanguíneo + matriz polimérica de pectina e quitosano)	19

### 2.8.1 Aleatorização/ Randomização

Em cada animal, a distribuição dos grupos de teste foi efetuada seguindo uma metodologia de randomização permutada em blocos, tendo em vista que todos os grupos fossem testados em dentes do mesmo tipo, localizados nos vários quadrantes e em igual número em todos os animais. Esta abordagem permitiu que os animais fossem sujeitos ao mesmo número de intervenções e de tratamentos até à eutanásia, obtendo assim, uma maior homogeneidade das variáveis de base no início do estudo.

## 2.9. Protocolo experimental

O protocolo desenvolvido compreendeu um total de 5 intervenções. A primeira consistiu na indução de lesão periapical. Na segunda procedeu-se à antissepsia canal e à aplicação da medicação intracanal. Na terceira realizaram-se os procedimentos de apexificação ou de revascularização pulpar, incluindo neste caso a indução e estabilização do coágulo sanguíneo e colocação de matrizes. Na quarta foi efetuado o controlo radiográfico e finalmente na quinta, executou-se a eutanásia e a colheita em bloco dos maxilares (Figura 27).

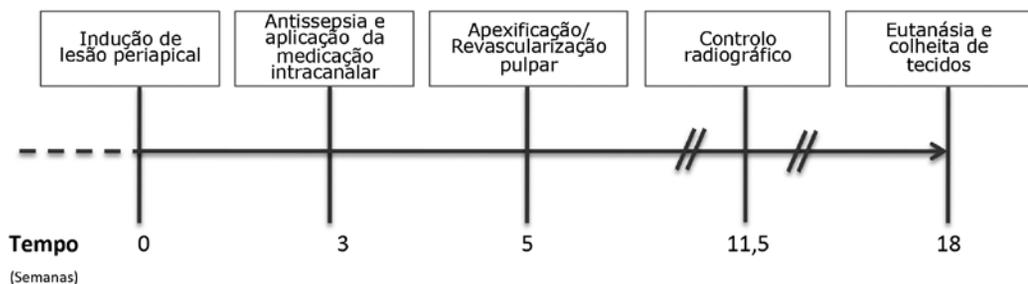


Figura 27. Diagrama cronológico das etapas do protocolo operatório.

Antes de qualquer intervenção, todos os dentes envolvidos neste estudo, foram radiografados, utilizando um sistema de radiovisografia (Gendex Vix Win 2000, USA), pela técnica da bissetriz nos dentes superiores e de paralelismo nos dentes inferiores<sup>417, 418</sup>. Estas angulações foram registadas de modo a serem usadas em todas as radiografias subsequentes, visando reproduzir o mesmo ângulo e angulação, possibilitando a aquisição de uma imagem o mais isométrica possível. O exame radiográfico antes da primeira intervenção permitiu confirmar a fase de desenvolvimento radicular (incompleto) dos dentes em estudo e avaliar a sua morfologia, de maneira a realizar cavidades de acesso que não comprometessem de forma grave a integridade estrutural do dente.

### Grupo de controlo positivo

Nos 12 canais atribuídos a este grupo, referentes a 6 dentes birradiculares sadios, não foi aplicado qualquer tratamento durante todo o tempo experimental, seguindo o seu desenvolvimento natural. Estes dentes foram utilizados como referência na análise radiográfica e histológica.

#### 2.9.1. Indução de lesão periapical (**1ª intervenção**)

O protocolo experimental nos grupos do controlo negativo e grupos 1, 2, 3 e 4, foi iniciado com a realização de cavidades de acesso e exposição da polpa dos pré-molares à flora oral autóloga, de modo a induzir uma necrose pulpar e o desenvolvimento de uma periodontite apical.

Para tal, foi realizado acesso e exposição pulpar com uma broca diamantada Endo Acess™ (Maillefer Dentsply, Ballaigues, Suíça) montada em turbina, refrigerada com água destilada, sem utilizar qualquer tipo de barreira de isolamento do meio oral (Figura 28 A). Com ajuda de uma lima K30 (Maillefer Dentsply, Ballaigues, Suíça) foi feita com remoção da polpa camaral e disrupção do tecido pulpar até cerca de 2 mm para apical do orifício de entrada canalal (Figura 28B).

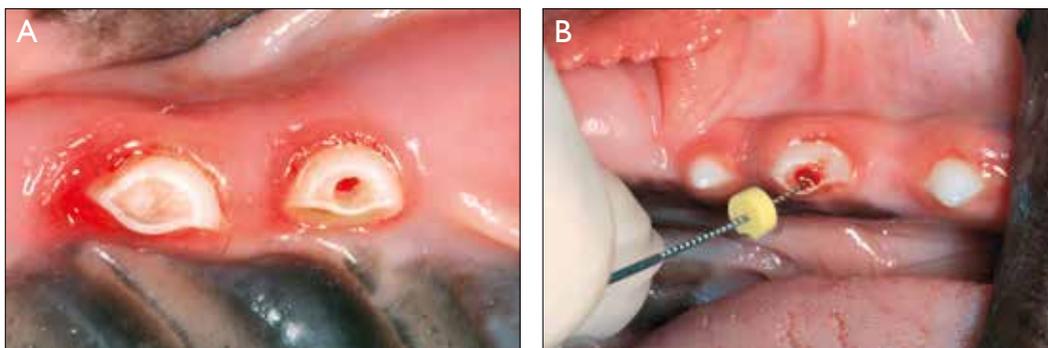


Figura 28. A) Imagem de um dente após a redução oclusal da cúspide e exposição pulpar e B) aspeto da realização da disrupção pulpar com lima K 30 (B).

Após a exposição pulpar, foi colocado na câmara uma bola de algodão contaminada com uma suspensão de placa bacteriana autóloga. Esta suspensão foi efectuada individualmente para cada cão, usando a placa bacteriana recolhida com um escavador no sulco gengival do I molar inferior e água bidestilada esterilizada (B Braun Medical, Queluz, Portugal). A bola de algodão foi então embebida nesta mistura durante aproximadamente 30s antes de ser colocada na cavidade de acesso. A restauração foi realizada utilizando um material restaurador provisório (Cavit®-G, 3M ESPE, Seefeld, Alemanha).

Os dentes foram monitorizados semanalmente até à evidência radiográfica de periodontite apical (aproximadamente 3 semanas) que, em muitos casos, foi acompanhada de sinais clínicos, como edema e eritema.

### Grupo de controlo negativo

O grupo de controlo negativo englobava 8 dentes (n=8) monorradiculares com intuito de induzir lesões periapicais, mantendo-as sem qualquer tratamento endodôntico. Estes controlos foram por sua vez subdivididos em controlos negativo pulpares (CNP) e controlos negativo periapicais (CNPA). Os controlos pulpares (n=4) foram extraídos às três semanas (na 2<sup>o</sup> intervenção) para análise histopatológica do estado pulpar no momento inicial da realização dos protocolos de tratamento testados nesta pesquisa. Porém, os controlos periapicais (n=4) foram restaurados com um cimento ionómero de vidro (Ketac™ Fil, 3M ESPE AG, Alemanha), às três semanas (na 2<sup>o</sup> intervenção), e mantidos até final do tempo experimental.

#### 2.9.2. Antissepsia e medicação intracanal (2<sup>a</sup> Intervenção)

Após 3 semanas e antes de iniciar a abordagem canal, foram efetuadas radiografias periapicais dos dentes (Figuras 29 e 30) e realizou-se um polimento com pasta profilática (Super Polish®, Kerr Hawe, Suíça).

Depois da colocação do isolamento absoluto com recurso a dique de borracha (Diques de Goma® ou Nic tone Dental Dam®, Proclinic, Barcelona, Espanha), grampo (210, Hygienic®, Coltène/Whaledent AG, Suíça), arco metálico e uma resina (Oraseal®, Ultradent, Utah, USA) (Figura 31), procedeu-se a antissepsia do dente e todo o campo operatório com uma solução de iodopovidona a 10% (Betadine®, Medapharma, Portugal).

Após a remoção da restauração provisória, foi estabelecido e estimado radiograficamente o comprimento de trabalho a 2 milímetros aquém do ápice radiológico com a introdução de uma lima K 50.

O protocolo de antissepsia canal realizou-se com recurso a irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% (NaOCl) preparada nos Laboratórios da Farmácia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), aquecido a 30°C. Assim os canais foram irrigados, através de uma agulha de 27-Gauge (Kendall Monoject™, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA) no sentido corono-apical, com 10 mL de solução (Figuras 32 e 33), seguida de uma irrigação final de 3 ml de soro fisiológico (B Braun Medical, Portugal). Seguidamente o canal foi seco (Figuras 34 e 35) com cones de papel esterilizados (Absorvent Paper Points, VDW GbmH, Alemanha) e procedendo-se à colocação da respetiva medicação intracanal.

Não foi realizada qualquer instrumentação sobre as paredes canales, evitando deste modo a remoção do tecido pulpar potencialmente viável, bem como de dentina radicular.



Figura 29. Aspeto clínico dos dentes três semanas após exposição pulpar e indução das lesões periapicais.



Figura 30. Imagem radiográfica da confirmação do desenvolvimento de lesões periapicais, às três semanas.



Figura 31. Dente sujeito a isolamento absoluto com dique de borracha, grampo(n°210, Hygienic®) e Oraseal®(Ultradent), antes de iniciar a 2ª intervenção.



Figura 32. Irrigação canal com hipoclorito de sódio a 2,5%, após abertura da cavidade de acesso.



Figura 33. Aspeto do efeito da reação do hipoclorito com a matéria orgânica.



Figura 34. Remoção do excesso de humidade do canal, com ajuda de cones de papel.

No Grupo I foi aplicada pasta de hidróxido de cálcio (Calcicur®, Voco GmbH, Cuxhaven, Alemanha), sendo introduzida no canal com uma seringa, ao nível do comprimento de trabalho, recuando progressivamente até ao nível da junção amelo-cimentária (JAC) de modo a conseguir um preenchimento total do canal (Figura 36 e 37). Após a limpeza das paredes, colocou-se uma bola de algodão esterilizada na entrada dos canais, o acesso coronário foi duplamente restaurado com Cavit®-G (Cavit®-G, 3M ESPE, Seefeld, Alemanha) e cimento ionómero de vidro (Ketac™ Fil, 3M ESPE AG, Alemanha).

Nos Grupos 2, 3 e 4 foi colocada como medicação intracanal uma mistura de pasta triantibiótica de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina (Figuras 38 e 39).

Após a introdução da pasta no canal com uma agulha de 27-Gauge (Kendall Monoject™, Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA), desde o comprimento de trabalho até ao nível da JAC, o acesso coronário do dente foi encerrado temporariamente como descrito para o grupo I (Figuras 40, 41 e 42).



Figura 35. Imagem da cavidade de acesso preparada para receber a medicação intracanal.



Figura 36. Colocação da pasta de hidróxido de cálcio (Calcicur®, Voco GmbH, Cuxhaven, Germany), (Grupo I) com uma ponta da seringa de mono uso.



Figura 37. Aspeto dos canais radiculares preenchidos com hidróxido de cálcio até ao soalho da câmara pulpar.



Figura 38. Aplicação da pasta triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) nos canais radiculares dos grupos 2, 3 e 4.



Figura 39. Aspecto da cavidade canal após preenchimento com pasta triantibiótica.



Figura 40. Colocação do material de restauração provisória (Cavit®-G, 3M ESPE, Seefeld, Alemanha) com uma pistola e ponta Centrix™ anterior (LV).



Figura 41. Imagem da câmara pulpar após a colocação do Cavit®.



Figura 42. Restauração do dente com cimento ionómero de vidro (Ketac Fill™ 3M ESPE).

### 2.9.3. Realização da apexificação/revascularização (3ª Intervenção)

Após duas semanas, executou-se o isolamento absoluto do campo operatório, polimento com pasta profilática (Super Polish®, Kerrhawe) e a desinfecção do campo operatório com solução de iodopovidona a 10% (Betadine®). Foi feita a remoção da restauração coronária, de modo a ter acesso à medicação intracanal, removendo a bola de algodão com um tiranervos (Dentsply Maillefer). Posto isto, fez-se uma irrigação na câmara pulpar com 3 mL de hipoclorito de sódio a 2,5 % e no canal com 10 mL de soro fisiológico, para remover a medicação intracanal. De seguida procedeu-se à secagem canal com pontas de papel absorvente nº80 (Absorvent Paper Points, VDW GbmH, Alemanha).

#### 2.9.3.1. Grupo I – barreira apical com MTA

Procedeu-se à colocação de uma barreira apical com ProRoot® MTA White (Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA). O preenchimento e colocação do MTA foi executado de acordo com o seguinte protocolo operatório:

- 1) seleção do transportador e seleção do compactador vertical a 3 mm do ápice radiológico;
- 2) mistura do pó de MTA com solução aquosa;

- 3) colocação do gel coloidal no canal com o transportador;
- 4) compactação do material ao comprimento de trabalho pré-determinado e preenchimento canalar até 2 a 3 mm da junção amelo-dentinária (Figura 48);
- 5) limpeza das paredes canalares.

Finalmente foi colocada uma bola de algodão húmida na entrada dos canais e realizada a restauração da cavidade de acesso com CIV (Ketac™ Fil, 3M ESPE AG, Alemanha).

### 2.9.3.2. Grupos 2, 3 e 4 – revascularização pulpar

Procedeu-se à indução da hemorragia apical através de uma lima K 30 esterilizada (Dentsply Maillefer) introduzida nos tecidos periapicais a 2-3 mm além do ápice (Figura 43), de modo a obter sangramento e um preenchimento do espaço canalar (Figura 44).



Figura 43. Introdução de uma lima K30 para além do ápex do dente de modo a induzir a hemorragia.



Figura 44. Imagem do preenchimento dos canais e estabilização do coágulo (grupo 2, 3 e 4), após a indução da hemorragia.

### Grupo 2 – Coágulo sanguíneo

Provocou-se uma hemorragia com a finalidade de proporcionar um preenchimento completo do espaço canalarr, aguardou-se alguns minutos para estabilização do coágulo a 2 mm para apical do orifício de entrada do canal (Figura 44). Posto isto, realizou-se o selamento coronário com a colocação de uma barreira de ProRoot® MTA de 2 de mm de espessura até ao nível do pavimento da câmara(Figura 48 ) e restauração com cimento ionómero de vidro (Ketac™ Fil, 3M ESPEAG, Alemanha).

### Grupo 3 –Coágulo sanguíneo + Matriz polimérica de HA:CS

A seguir ao preenchimento canalar pela hemorragia, foi colocada a matriz polimérica liofilizada de ácido hialurónico/quitosano (HA:CS) a 2 mm para apical do orifício de entrada do canal (Figura 45). Após, a formação do coágulo sanguíneo, procedeu-se ao duplo selamento coronário como descrito para o grupo 2 (Figura 48).



Figura 45. Presença de uma matriz de ácido hialurônico/quitosano, no canal radicular.



Figura 46. Colocação de uma matriz de pectina/quitosano (grupo 4), para além do coágulo sanguíneo.

#### **Grupo 4 – Coágulo sanguíneo + Matriz polimérica de P:CS**

Os procedimentos foram semelhantes ao grupo 3, com a diferença de que foi aplicada uma matriz de pectina/quitosano (P:CS) (Figura 46, 47 e 48).



Figura 47. Imagem da matriz de P:CS embecida no coágulo sanguíneo.



Figura 48. Aspeto geral do canal após a colocação do MTA (ProRoot® MTA).

#### **2.9.4. Recuperação da anestesia e sedação**

Após a realização de cada uma das intervenções, os animais foram colocados em estruturas individuais, numa sala com temperatura adequada, escura, silenciosa e limpa, tendo sido vigiados na sua recuperação. Tomaram-se também medidas para evitar traumatismos no reinício da atividade motora. Todos os animais recuperaram completamente após os procedimentos envolvendo anestesia geral e sedação.

#### **2.9.5. Avaliação clínica e radiográfica da cavidade oral (4ª intervenção)**

Após finalizar o protocolo operatório e durante o período de controlo todos os dentes foram monitorizados clínica e radiograficamente com uma periodicidade mensal, de modo a pesquisar sinais de patologia infecciosa, sobretudo nos dentes controlos negativos periapicais (CNPA), bem como avaliar a integridade dos dentes e das respetivas restaurações coronárias.

### 2.9.6. Eutanásia dos animais (5ª Intervenção)

No final do estudo experimental, decorridas 18 semanas após a indução de lesões periapicais, procedeu-se à eutanásia dos animais, seguindo o protocolo de anestesia geral, já anteriormente descrito. Durante a intervenção, foi realizado o exame clínico, dando especial atenção aos seguintes aspetos: 1) integridade das restaurações coronárias; 2) estado dos tecidos periodontais; 3) mobilidade dentária. Para além disso, foram realizadas radiografias periapicais em todos os dentes envolvidos no estudo.

Durante esta intervenção, foram realizados os procedimentos para fixação *in vivo* dos tecidos maxilares. Para tal, o animal foi colocado em posição de decúbito dorsal e realizado o acesso cirúrgico para exposição adequada das carótidas primitivas. Seguidamente foram passados dois fios em redor destes vasos, com dois nós cada, espaçados cerca de 3 centímetros, por forma a colapsar momentaneamente o vaso, interrompendo a circulação sanguínea. Neste momento, procedeu-se à injeção através de um cateter de 120 mL de formaldeído a 10% tamponado (PRS Panreac®, Espanha) em cada carótida. Em simultâneo, desapertaram-se os nós o que fez com que a circulação sanguínea fosse imediatamente restabelecida facilitando a difusão do formol em direção cefálica. A perfusão e fixação dos tecidos pôde ser confirmada pelo aparecimento progressivo de um aspeto seco e esbranquiçado das mucosas orais. De imediato, para assegurar a eutanásia, injetou-se por via endovenosa uma “overdose” de anestésico tiopental sódico (Pentotal® sódico, Abbot). Todos os animais sofreram paragem cardíaca ao fim de alguns segundos, confirmada pelo monitor do ECG e por auscultação.

## 2.10. Colheita da amostra

Após a eutanásia, procedeu-se de imediato à colheita em bloco do maxilar superior e inferior. Para tal, foram efectuadas incisões e dissecados os tecidos moles por planos de modo a expor o osso cortical. No maxilar foi realizada uma osteotomia transversal por distal do 1º molar superior e horizontal à espinha nasal anterior. Na mandíbula foram realizados cortes transversais por distal do 1º molar inferior. Estes blocos foram imersos em formol neutro tamponado e transportados para o laboratório.

## 2.11. Processamento histológico

Todo o material utilizado nos estudos histológicos foi processado no Laboratório de Tecidos Duros da Clínica Universitária de Medicina Dentária, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, tendo como responsável o Prof. Doutor Fernando Guerra. Foi usada a técnica de preparação de tecidos por “descalcificação”.

Imediatamente após a chegada ao laboratório, procedeu-se ao corte, separação e identificação das peças. Do maxilar superior foram preparados 3 blocos por quadrante, contendo as raízes dos dentes: a) 1º pré-molar e raiz mesial do 2º pré-molar; b) raiz distal do 2º pré-molar e a raiz mesial do 3º pré-

molar e c) raiz distal do 3° pré molar. De cada quadrante da mandíbula foram efetuados 4 blocos com as respectivas raízes: a) 1° pré molar e a raiz mesial do 2° pré molar; b) raiz distal do 2° pré molar e a raiz mesial do 3° pré molar; c) raiz distal do 3° pré molar e mesial do 4° pré molar e d) distal do 4° pré molar.

Depois de colocados em cassetes “histológicas” individuais (Figura 49), devidamente identificadas (n° do animal, quadrante e raízes dentárias), as peças foram novamente colocadas em formalina tamponada a 10% a +4°C durante uma semana. Após este processo de fixação procedeu-se à descalcificação das amostras.



Figura 49. Blocos de tecido preparados a partir da mandíbula, devidamente seccionados, acondicionados e identificados.

#### 2.1.1.1. Técnica para material descalcificado

O processo de descalcificação foi efetuado por imersão das amostras numa solução de Morse (ácido fórmico a 50% + citrato de sódio a 20% em partes iguais), sob agitação permanente, numa unidade de agitação (Jkika Labortechnik HS 501), durante um período mínimo de oito semanas. Após a descalcificação das amostras e remoção das restaurações, procedeu-se à sua desidratação por sucessivas passagens em soluções crescentes de etanol, 50%, 70%, 90% e 100%, sob agitação permanente. Posteriormente procedeu-se à fase de diafanização em xilol (Xileno PA Panreac®), impregnação e inclusão em parafina (Paraplast® Regular), utilizando cassetes apropriadas (Kartell® Spa). Depois do processo de inclusão, as amostras foram cortadas num micrótomo (Leica RM 2155), num plano proximal (mesiodistal), longitudinalmente ao longo do eixo do canal, em cortes sequenciais de 7 µm de espessura, ao longo de toda a área canalar e ápex do dente. Realizou-se uma média de 30 cortes por amostra, de forma a fazer uma seleção que pudesse permitir, tanto quanto possível, uma avaliação tridimensional dos parâmetros em estudo. Os cortes foram em seguida secos em estufa a 37°C, durante cerca de 16h, sendo posteriormente selecionadas e coradas 7 lâminas com Hematoxilina e eosina (HE). Foram ainda coradas algumas lâminas com Tricrómio Masson (TM). Para cada uma das raízes foi selecionada e corada uma lâmina pela técnica de *Brown & Brenn* (BB) visando identificar a presença de bactérias.

Durante todo o processamento foi assegurada uma rigorosa identificação das amostras, contendo o número do animal, localização do quadrante, identificação das raízes e número de corte.

### 2.11.2. Imunocitoquímica

Foram ainda efetuados alguns cortes e colocados em lâminas revestidas com poli-L-lisina para estudos imunocitoquímicos, com soro anti-queratina (Monoclonal Mouse, anti-human cytokeratin, clone MNF 116, nº de código M0821, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca), visando a detecção dos restos epiteliais de Malassez, considerando que as cito queratinas constituem marcadores fundamentais da diferenciação epitelial.

Na técnica imunocitoquímica para microscopia de luz foi seguido o método de peroxidase-anti-peroxidase, apenas com pequenos ajustes de pormenor. Após desparafinação e hidratação dos cortes procedeu-se a uma “digestão” enzimática recorrendo a ação da tripsina. A peroxidase endógena foi inibida com um solução de peróxido de hidrogénio a 0,6% metanol. Após lavagens dos cortes procedeu-se a uma série de incubações realizadas em câmara húmida separadas por lavagens em tampão Tris.

O anticorpo primário *Monoclonal Mouse, anti-human cytokeratin*, foi utilizado com uma diluição de 1:100, durante 30 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se a uma incubação com o complexo peroxidase-anti-peroxidase. A peroxidase foi revelada com uma solução de 3,3’ - diaminobenzidina. A técnica imunocitoquímica para os grupos controlo positivo e negativo foram feitas em simultâneo.

## 2.12. Métodos de análise

### 2.12.1. Análise radiográfica

Todas as radiografias foram efetuadas usando a técnica de paralelismo e bissetriz, para melhor reproduzir a colocação do sensor radiográfico (Gendex®, VisualiX/GX-S Intraoral CCD Sensor, Pensilvânia, EUA) e angulação do feixe de raio-X. As radiografias digitais foram gravadas e arquivadas em computador em formato jpeg, com “software” de imagem (VixWin®, Pensilvânia, EUA). Posto isto, as radiografias foram observadas individualmente por dois avaliadores, de um modo randomizado, após uma sessão de calibração e identificação dos parâmetros em análise (Tabela 4). Aos avaliadores foi omitido o número do cão e o tipo de tratamento realizado, sendo que para cada uma das raízes foram avaliadas duas radiografias. A primeira radiografia foi realizada visando a confirmação da presença de lesões (imediatamente antes do início da 2ª intervenção) e a segunda efetuada no final do período experimental. A análise radiográfica comparativa teve por base a avaliação dos seguintes parâmetros:

- 1) Lesão periapical radiotransparente (ausente, diminuição, manutenção ou aumento).
- 2) Aumento da espessura das paredes radiculares (ausente/presente).
- 3) Encerramento apical (ausente/presente).

Para os casos em que não houve unanimidade entre os avaliadores, procedeu-se a uma reunião para discussão de modo a chegarem a um consenso.

### 2.12.2. Análise histológica

Para além de uma análise qualitativa (com observação das lâminas e registo das imagens), a avaliação histológica incluiu também o estudo quantitativo de alguns parâmetros (Tabela 5).

As observações das lâminas foram efectuadas com recurso a um microscópio de luz de campo claro (Nikon® Eclipse 600, Tóquio, Japão) e estereomicroscópio (Nikon® SMZ I 500, Tóquio, Japão). Estes dispositivos têm capacidade para acoplar equipamento fotográfico convencional (Nikon® FDX-35, com sensor multiponto Nikon® U-III, Tóquio, Japão), bem como câmaras fotográficas digitais (Optronics® DEI 750D CE, Goleta, Califórnia, Estados Unidos da América e Nikon® Digital Camera DXM-1200 C, Tóquio, Japão) ligadas a computadores PC (Intel® Pentium™ III e Intel® Core™ 2 Duo Core™) com “software” para fotografia, análise de imagem (Nikon® ACT-1 C, Tóquio, Japão) e histomorfometria (Bioquant Osteo® 2012 Bioquant™ – Image Analysis Corporation, Nashville, Estados Unidos da América).

#### 2.12.2.1. Análise histológica qualitativa

A análise qualitativa dos cortes histológicos consistiu na deteção da presença ou ausência de tecidos vitais no espaço canal, incidindo fundamentalmente na observação e registo das suas características histomorfológicas, nas características da interface destes tecidos com os materiais utilizados (obturações canalares ou regeneradores) e ainda na presença ou ausência de uma resposta inflamatória.

Para além da coloração com Hematoxilina-Eosina (HE), foram também utilizados mais dois métodos de coloração, o Tricrómico de Masson (TM) e Brown & Brenn (BB), permitindo evidenciar a presença de colagénio e de bactérias, respetivamente. No método de coloração de Tricrómico de Masson destaca-se o colagénio que adquire uma coloração verde. No método Brown & Brenn, os diferentes tecidos coram de amarelo e as bactérias coram de azul e vermelho.

Os critérios histológicos usados para identificar a dentina, o cimento, o tecido ósseo e o ligamento periodontal, foram os utilizados e descritos por Wang *et al.*<sup>19</sup> Assim, para a dentina, é condição a presença de túbulos dentinários; para o cimento, a ausência de túbulos dentinários e aderentes/ aposicionados à dentina, presença de células semelhantes a cementócitos; para o osso, presença de sistemas de Havers com distribuição uniforme de células semelhantes a osteócitos; e para o ligamento periodontal, presença de fibras de Sharpey e fibras de colagénio que ligam cimento ao osso.

#### 2.12.2.2. Análise histológica quantitativa

A histomorfometria foi efetuada tendo por base um “software” para análise de imagem (Bioquant Osteo® 2012 Bioquant™ - Image Analysis Corporation, Nashville, Estados Unidos da América). Este programa tem a capacidade de distinguir as diferentes afinidades tintoriais dos tecidos e componentes da amostra, convertendo essa informação em quantificação de áreas, reproduções tridimensionais, determinação de densidades e outros parâmetros mais especializados.

A calibração do programa e as análises foram sempre efetuadas pelo mesmo operador. Todas as sessões foram antecedidas por uma verificação da calibração intra-examinador.

Cada raiz foi tomada como unidade individual e observada com uma ampliação de 2x, sendo analisada a porção apical da raiz (aproximadamente 4mm) e os tecidos periapicais circundantes.

A quantificação dos tecidos mineralizados formados no interior do canal, foi determinada em função da área ocupada por estes tecidos (TM) e da área total do espaço canal (T). Com base nestes dados foi posteriormente possível determinar a percentagem de tecido mineralizado formado, calculada como  $TM/T \times 100$ .

O tecido mineralizado aposicionado à dentina foi designado por TMAD e considerado e quantificado individualmente, bem como as ilhotas de tecido óseo (IO) dispersas no interior do canal.

Procedeu-se também à quantificação das áreas ocupadas pelas matrizes/scaffold (S) presentes no interior do canal (Figura 50).

Em síntese, a análise histomorfométrica efectuada teve como objetivo a quantificação dos seguintes parâmetros:

- a) Área total do canal (T) radicular.
- b) Área total do tecido mineralizado formado (TM) obtida pelo somatório das duas áreas seguintes:
  - I. área ocupada pelos tecidos mineralizados formados no lúmen do canal (IO);
  - II. área de tecido mineralizado formado por aposição à parede interna da dentina (TMAD);
 III.  $TM = IO + TMAD$ .
- c) Percentagem total dos tecidos mineralizados formados =  $(TM/T) \times 100$ .
- d) Área ocupada pelas matrizes presentes no interior do canal (S).
- e) Percentagem total de tecido mineralizados e matriz residual  $(MT+S)/T \times 100$ .

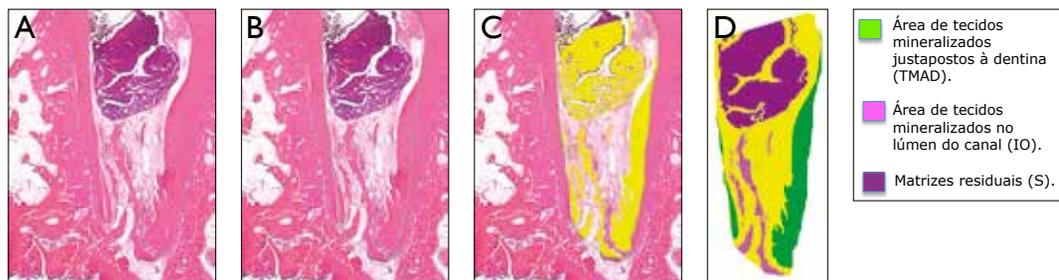


Figura 50. Etapas da histomorfometria: A) imagem de corte longitudinal do dente, obtida com estereomicroscópio acoplado a um software analítico; B) delimitação da área total do canal (linha verde); C) identificação por pseudo-cor do novo tecido mineralizado e matriz (áreas amarelas); D) representação das variáveis histomorfométricas em relação à área do defeito: tecidos mineralizados aposicionados na parede interna da dentina - TMAD (verde), tecidos mineralizados formados no lúmen do canal, IO (rosa) e matrizes presentes no interior do canal (violeta).

Tabela 4 . Classificação dos parâmetros utilizados na análise radiográfica.

Parâmetros da análise radiográfica	Classificação
Lesão periapical radiotransparente	0 - Ausente 1 - Diminuição do tamanho 2 - Manutenção do tamanho 3 - Aumento
Aumento da espessura das paredes do canal	0 - Ausente 1 - Presente
Encerramento apical	0 - Ausente 1 - Parcial 2 - Completo

Tabela 5. Parâmetros observados na análise histológica e respectiva classificação, baseada em variáveis qualitativas ordinais.

Parâmetros na análise histológica	Classificação
Preenchimento canal	0- Ausente 1- Ligeiro : preenche até 50% do lúmen do canal disponível 2- Parcial: preenche mais de 50% do lúmen do canal disponível 3- Total: preenche 100% do lúmen do canal disponível
Vascularização	0- Ausente 1- Presente com hiperémia 2- Presente normal
Tecidos mineralizados formados canal	0- Ausente 1- Presente
Cimento formado na parede externa da raiz	0- Ausente 1- Presente, com aumento da espessura radicular 2- Presente, com aumento do comprimento radicular 3- Presente, com aumento da espessura e comprimento radicular
Tecidos mineralizados adjacente ao MTA (ponte)	0- Ausente 1- Presente mas incompleta 2- Presente e completa
Encerramento apical	0- Ausente 1- Parcial 2- Completo
Reabsorção/ reparação de tecidos mineralizados da parede radicular (cimento e dentina)	0- Ausência de reabsorção ou reparação total das áreas reabsorvidas. 1- Reparação parcial das zonas reabsorvidas 2- Reabsorção sem reparação
Infiltrado inflamatório	0- Ausente 1- Ligeiro 2- Moderado 3- Grave
Espessura do ligamento periodontal	0. Normal ( $\leq 200\mu\text{m}$ ) 1. Ligeiramente aumentado (de $201\mu\text{m}$ a $300\mu\text{m}$ ) 2. Moderadamente aumentado (de $301\mu\text{m}$ a $400\mu\text{m}$ ) 3. Gravemente aumentado ( $\geq 401\mu\text{m}$ )
Presença de microrganismos	0- Ausente 1- Presente
Extrusão do MTA	0- Ausente 1- Presente

### 2.12.3. Análise estatística

A análise dos dados foi realizada em ambiente Windows 7, com recurso ao programa estatístico *IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics Standards 19* (IBM Corporation, NY, USA).

A exploração das diferentes variáveis do estudo foi efetuada recorrendo a técnicas de estatística descritiva. Verificando-se que o número de medidas é limitado ( $n < 20$ ) e que a maioria das variáveis são qualitativas ordinais, optou-se por efetuar uma análise univariada, de todas as variáveis, baseada em testes não paramétricos, nomeadamente de *Kruskal-Wallis*. Com esta análise pretendeu-se avaliar diferenças entre as várias técnicas e materiais endodônticos. O Teste de *Mann-Whitney U* foi usado para testar diferenças entre pares de técnicas clínicas, *post-hoc*. Esta análise foi feita com um nível de significância de 95% ( $p < 0.05$ ).

Realizou-se também uma análise multivariada, em carácter exploratório, com o objetivo de obter uma melhor compreensão da interação entre as variáveis do estudo. Esta avaliação iniciou-se com uma análise dos componentes principais (PCA) com o intuito de reduzir o número de dimensões relevantes. Após determinação das variáveis mais pertinentes, realizou-se uma regressão logística (método Enter) para estas variáveis, identificadas como preditores do sucesso/insucesso do tratamento endodôntico avaliado com base nas radiografias periapicais. Procedeu-se ainda a análise univariada para discriminar os grupos que apresentavam melhores resultados.

### 2.13. Locais de execução do projeto

Este estudo foi realizado nos seguintes locais:

- Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e Produtos da Floresta (CIEPQPF), Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, no desenvolvimentos das matrizes poliméricas, com a colaboração da Prof. Doutora Paula Ferreira, Prof. Doutora Helena Gil e Prof. Doutora Margarida Figueiredo.
- Hospital Veterinário da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, no desenvolvimento de todos os procedimentos da fase experimental relacionados com o modelo animal, com a colaboração do Prof. Doutor Carlos Alberto Antunes Viegas.
- Laboratório de Tecidos Duros da Clínica Universitária de Medicina Dentária da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, processamento do amostras para estudo histológico e histomorfometria, Prof. Doutor Fernando Guerra e Prof. Doutor João Carlos Ramos.
- Instituto de Histologia e Embriologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Prof. Doutora Maria Helena Figueiredo.
- Laboratório de bioestatística e informática médica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Doutor Miguel Patrício e Prof. Doutor Francisco Caramelo.

### 3. Resultados

#### 3.1. Evolução do estado de saúde dos animais e avaliação clínica da cavidade oral

Os animais utilizados neste estudo experimental toleraram bem os procedimentos operatórios, apresentando uma adequada recuperação cirúrgica, mantendo-se saudáveis durante todo o período experimental. Ao longo do período do estudo não foram observados sinais de dor ou sofrimento, nem quaisquer manifestações ou alterações comportamentais.

Às três semanas, após a disrupção pulpar, foi observado clinicamente um ligeiro edema vestibular com supuração sulcular na zona do 2º pré-molar inferior direito, no animal identificado com o número 1 e na zona do 2 e 3º pré-molar superior direito (Figura 51) no animal com o número 4.

Ao longo das 13 semanas de avaliação, apenas um dente (2 pré-molar inferior direito, 4º quadrante, animal com o nº 2) do grupo I apresentou uma fratura vertical na zona da furca, o que levou à perda da raiz às 11 semanas de evolução, motivo pelo qual foi excluída do estudo. No entanto, dado que a raiz distal apresentava a restauração coronária aparentemente íntegra e sem sinais de infeção ativa ou bordos cortantes na margem mesial da furca, foi mantida a raiz distal até final do período experimental.

As restantes 42 restaurações mantiveram-se íntegras, contudo, é de referir que nos grupos 2, 3, e 4 existiram vários dentes com intensa pigmentação coronária associada à utilização da pasta triantibiótica (Figura 52) e que se manteve durante todo o tempo experimental.



Figura 51. Aspeto da zona do 2 e 3º pré-molar superior direito (animal identificado com nº4) com ligeiro edema vestibular e com supuração sulcular, observado às três semanas.



Figura 52. Imagem panorâmica dos dentes superiores intervencionados às 18 semanas antes da eutanásia, sendo evidente a pigmentação dentária provocada pela minociclina.

### 3.2. Análise macroscópica

As observações macroscópicas dos maxilares e mandíbulas, recolhidos após a disseção da pele e dos tecidos moles, não mostraram alterações morfológicas nem a existência de processos inflamatórios visíveis, para além das lesões expectáveis e decorrentes do ato cirúrgico. Constatou-se, também, uma evolução normal do processo cicatricial, com uma boa tolerância dos tecidos em redor dos dentes. Estes dados foram posteriormente complementados, na necropsia, com biopsias colhidas dos diversos órgãos (coração, rim, fígado, baço e gânglios linfáticos da cadeia loco regional) para análise histopatológica efetuada em microscopia de luz e que, por sua vez, não demonstraram também quaisquer alterações anatomopatológicas.

### 3.3. Avaliação radiográfica e histológica

Qualquer agressão causada a um tecido vascularizado leva ao imediato desenvolvimento de um hematoma que funciona como uma matriz cicatricial provisória, constituída essencialmente por uma rede de fibrina. Segue-se, então, uma resposta inflamatória aguda e a formação de um tecido de granulação, quase sempre acompanhado de um processo de angiogénese e finalmente a síntese de uma matriz tecidual.

Estes eventos podem ser avaliados quer sob um ponto de vista radiológico quer histológico, tendo em conta que as imagem radiológicas são o resultado dos processos histológicos em curso. Apresentamos, em primeiro lugar, os resultados radiológicos e de seguida as imagens histológicas.

Sempre que possível, estabelecemos um paralelismo entre os dois tipos de resultados. É ainda de referir a importância dos resultados radiográficos na previsão do processo de evolução da cicatrização/regeneração e possíveis decisões e alterações dos métodos em questão.

Dado que o objetivo primário deste estudo consistia numa avaliação do comportamento biológico de diferentes matrizes no processo de revascularização pulpar, julgou-se conveniente deixar passar a fase de hemorragia e de inflamação, que constituem reações inespecíficas comuns a quase todas as processos iniciais de cicatrização e regeneração tecidual e só então avaliar a dinâmica e eficácia dos métodos aplicados e das matrizes em estudo.

De referir contudo que o hematoma e o tecido de granulação constituem, matrizes condutoras que suportam (componentes estruturais) e estimulam (moléculas bioativas) o processo de regeneração tecidual. Por sua vez a resposta inflamatória aguda ativa o mecanismo da angiogénese bem como a produção de numerosas citocinas e de fatores de crescimento que promovem o influxo (recrutamento e migração) de células mesenquimatosas pluripotenciais para o local da lesão, sendo ainda responsáveis pela sua proliferação e diferenciação.

O conjunto das imagens histológicas apresentadas demonstrou que a metodologia seguida na preparação e corte do material foi bem sucedida, proporcionando a obtenção de cortes histológicos com qualidade, provenientes de material bem preservado.

O procedimento de corte permitiu a obtenção de imagens coronoapicais, efetuadas no plano mesiodistal, com elevado grau de paralelismo em relação ao eixo da raiz, possibilitando a avaliação de todos os parâmetros histológicos e histomorfométricos, definidos nos objetivos e na metodologia.

Tendo em conta as designações maioritariamente utilizadas na literatura, considerámos como controlo positivo as raízes não intervencionadas e como controlo negativo os dentes infetados, mas sem tratamento subsequente. Este critério foi seguido tanto para as observações radiográficas como histológicas.

Foram utilizados 12 controlos positivos e 8 controlos negativos, permitindo uma redução do número de animais a incluir na amostra e, simultaneamente, uma validação interna do estudo.

Visando proporcionar uma certa continuidade e um melhor entendimento dos fenómenos biológicos decorrentes das diferentes variantes utilizadas, pareceu-nos mais elucidativo iniciar a apresentação dos resultados pelo controlo positivo, logo seguido pelo controlo negativo e só depois os diferentes grupos experimentais.

### 3.3.1. **Controlo positivo** (n=12)

Todas as raízes, não intervencionadas, que como foi referido, constituem o controlo positivo, prosseguiram o seu normal desenvolvimento. Assim, as imagens radiográficas (Figura 53) e histológicas (Figuras 54 a 57) demonstraram, no final do período experimental, uma morfologia e espessura dentinária característica de um desenvolvimento radicular completo, um ápice radicular encerrado e a presença típica de delta apical/ múltiplos *foramina* apicais.

A figura 53 corresponde ao aspeto radiográfico do 3º pré-molar inferior, do 4º quadrante do animal identificado com o nº 3, com aproximadamente 6 meses de idade (Figura 53A) e do mesmo dente no final do período experimental (Figura 53B), revelando um normal processo de crescimento e maturação radicular.

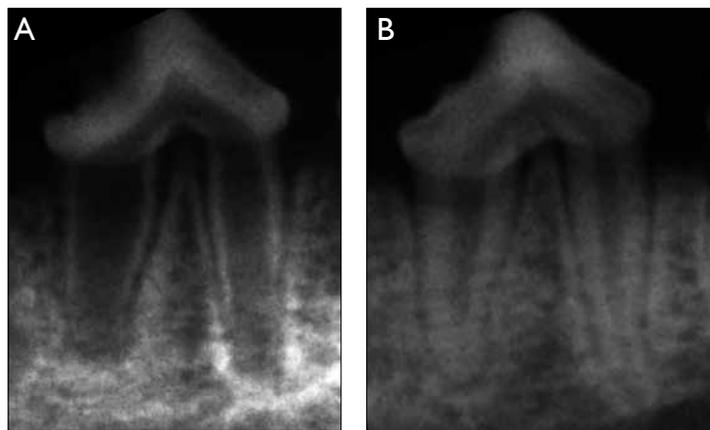


Figura 53. Imagens radiográficas de um dente (3º PM Inferior, 4º quadrante, animal identificado com o nº3) do grupo do controlo positivo, apresentando um desenvolvimento radicular próprio da idade. A) Aspeto radiográfico de um ápice aberto (fase inicial do período experimental). B) Imagem radiográfica do mesmo dente (no final do período experimental), mostrando um aumento da espessura das paredes radiculares e um encerramento apical completo.

A observação das lâminas histológicas, no final do período experimental, mostrou uma cavidade pulpar com características estruturais e organização normais, apresentando (Figura 54) perifericamente uma camada odontoblástica contínua e uma região central de tecido conjuntivo laxo ricamente vascularizado.

As zonas apical e periapical, no final do período experimental, não apresentavam quaisquer alterações dignas de registo, nem a presença de processos inflamatórios, sendo evidente, em comparação com a fase inicial, um aumento da espessura das paredes radiculares e um encerramento apical completo (Figura 55).

Os componentes do periodonto de inserção (Figuras 56 e 57) apresentavam uma espessura e estrutura histológica típica tanto do cimento, como do ligamento periodontal e do osso alveolar propriamente dito. De registar, ainda, a presença de inúmeros restos epiteliais de Malassez, próximos ao cimento e distribuídos ao longo do ligamento periodontal (Figuras 58 e 59).

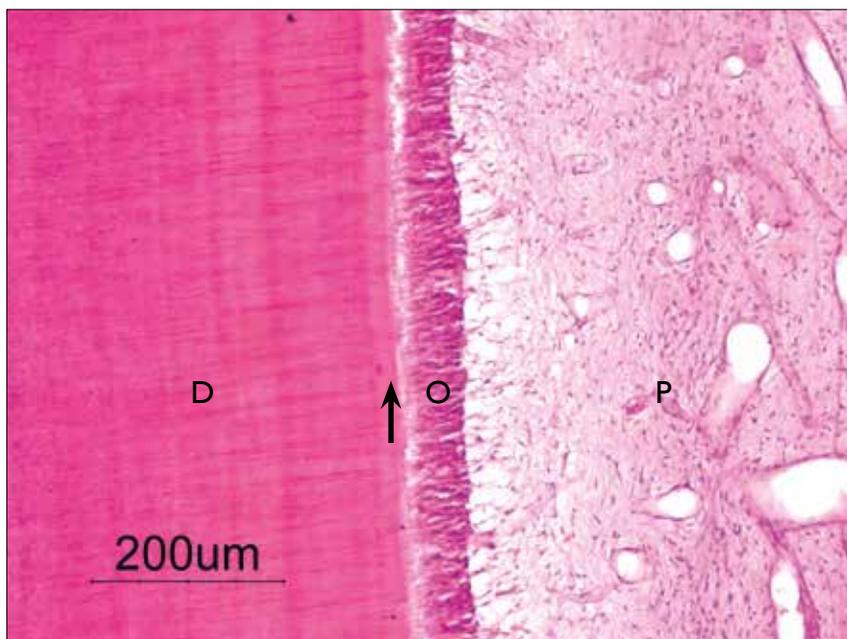


Figura 54. Aspeto do complexo pulpo-dentinário com uma estrutura e organização histológica normal. Dentina (D), pré-dentina (seta), camada odontoblástica (O) e região central da polpa (P). (HE).

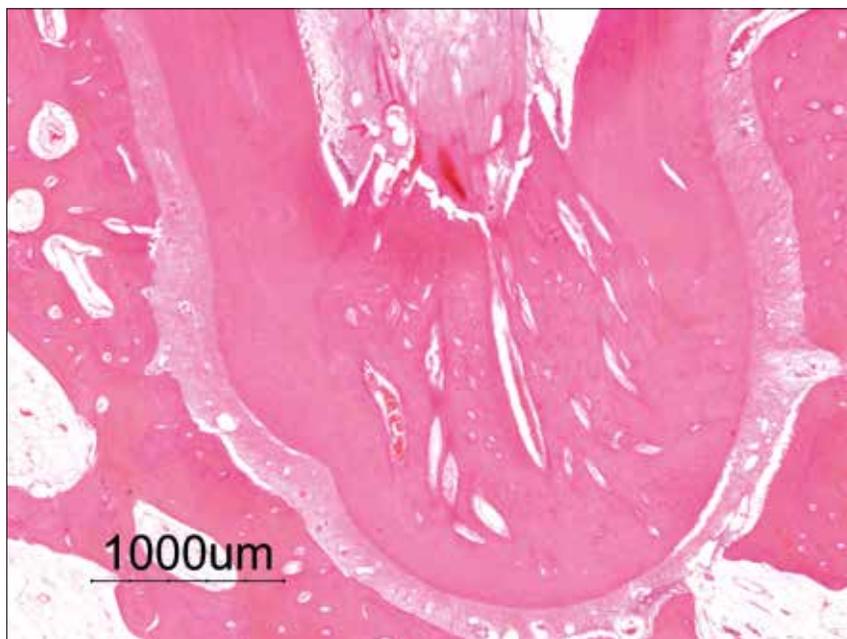


Figura 55. Corte histológico no sentido mesiodistal de uma raiz dentária, no final do período experimental, sendo visível um ápice fechado e a presença de múltiplos *foramina* apicais. (HE).

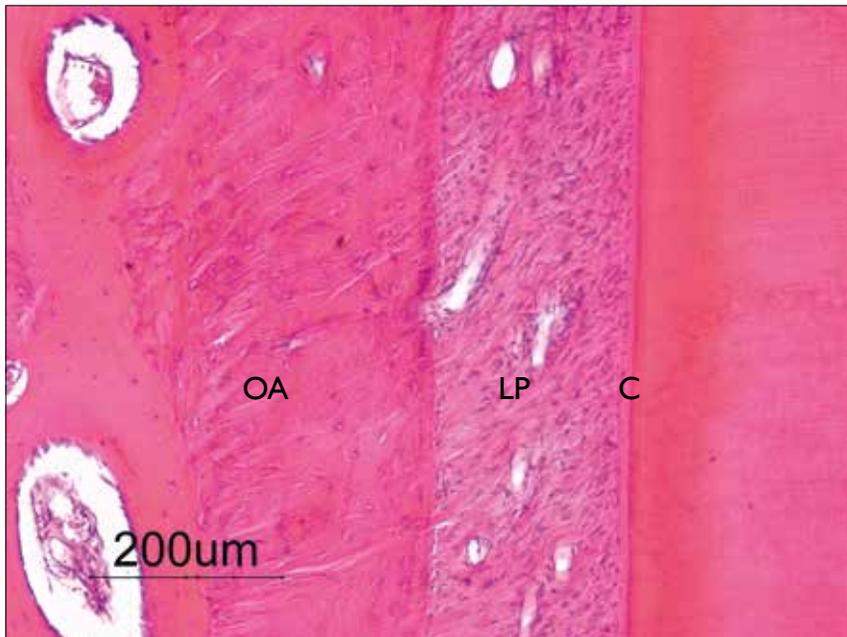


Figura 56. Aspecto histológico das estruturas que compõem o periodonto. Cimento (C), ligamento periodontal (LP) e osso alveolar propriamente dito (OA) com fibras de Sharpey. (HE).



Figura 57. Imagem semelhante à da figura anterior, pondo em evidência a constituição histológica do ligamento periodontal, sendo possível observar um rolo vasculo-nervoso (\*). (TM).

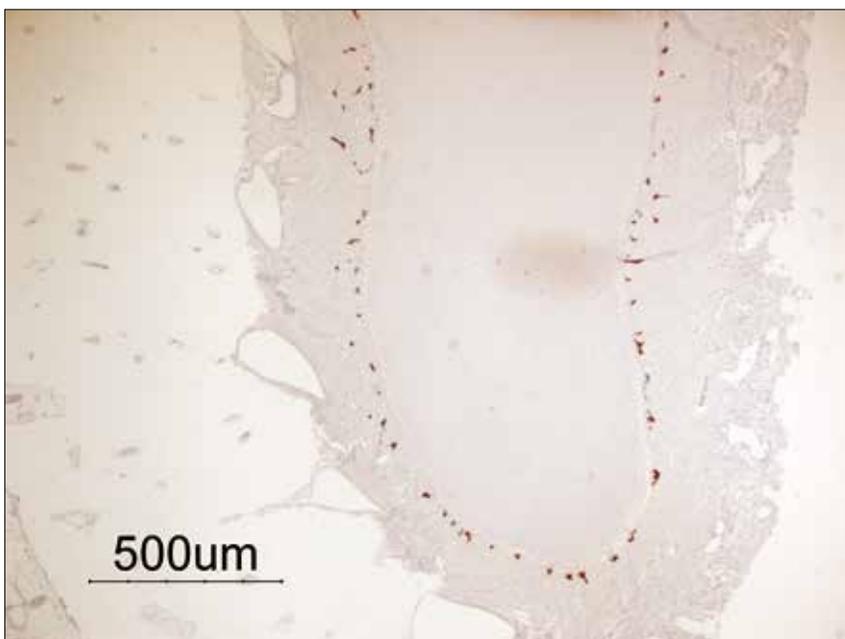


Figura 58. Presença de restos epiteliais de Malassez (localizados no ligamento periodontal junto ao cimento), confirmada por imunocitoquímica, com anticorpos anti-queratina.

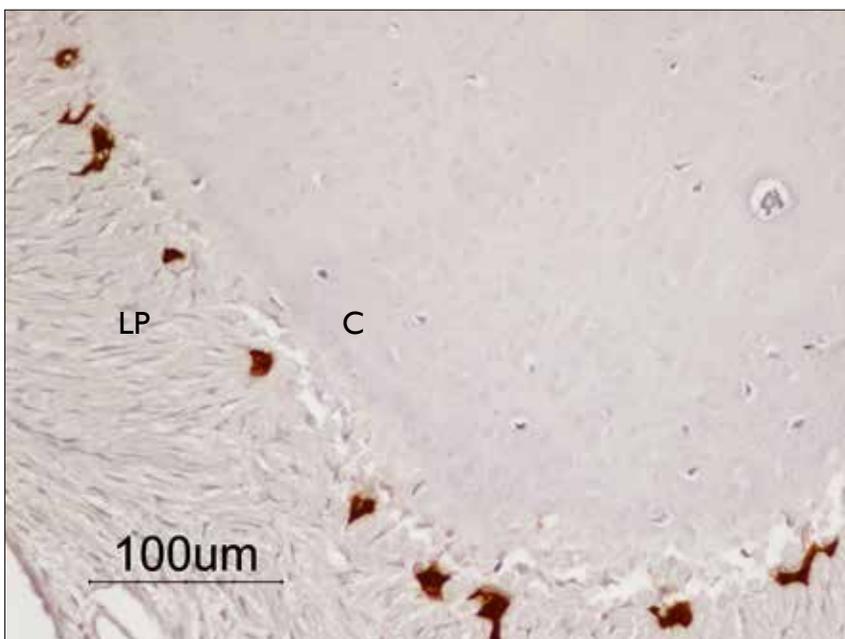


Figura 59. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior. Cimento (C) e ligamento periodontal (LP).

### 3.3.2. **Controlo negativo** (n=8)

O controlo negativo constituído por raízes com periodontite apical (infetadas sem tratamento) foi dividido em dois grupos com distintos períodos de avaliação: um para avaliação pulpar, com raízes extraídas 3 semanas após o início da fase experimental e o outro para avaliação da região periapical, no final do período experimental.

Este grupo permite validar o modelo utilizado ao confirmar o desenvolvimento de uma infeção/inflamação pulpar e periapical (assim como a manutenção ou aumento das lesões) em dentes sujeitos a um protocolo de indução de lesões periapicais.

#### 3.3.2.1. Controlo negativo pulpar (CNP)

Os dentes extraídos às 3 semanas, apenas para controlo pulpar (4 raízes) apresentavam, de um modo geral, para além de grandes espaços vazios, a presença de tecidos em necrose e zonas de infiltrado inflamatório. Em paralelo foi possível observar grandes áreas de tecido fibroso, constituído por uma rede de fibras de colagénio (mas inexistência de fibroblastos viáveis), localizadas preferencialmente no terço médio e apical e geralmente adjacentes às paredes radiculares (Figura 61, 62 e 63). De referir ainda a presença de grandes áreas de reabsorção de origem inflamatória na superfície radicular externa.

#### 3.3.2.2. Controlo negativo periapical (CNPA)

Todas as raízes, cujo sistema radicular foi infetado e deixado sem qualquer tratamento endodôntico, mostraram no final do período experimental uma inflamação periapical com um nível de intensidade grave, associada a uma acentuada destruição dos tecidos periodontais adjacentes.

Em termos radiográficos, podemos referir que, neste grupo (Figura 60), ficou demonstrado um aumento das lesões periapicais, das três para as 18 semanas, traduzido por uma maior área de radiotransparência, com paragem do desenvolvimento das paredes radiculares (tanto em comprimento como em espessura), bem como destruição da lâmina dura e sinais radiográficos de ápice aberto.

Sob um ponto de vista histológico, notou-se neste grupo, e em relação às raízes não intervencionadas, uma paragem do crescimento radicular; a par de uma reduzida espessura tanto da camada de dentina como do cimento, para além de um ápice aberto. De facto, nas figuras 64 e 65, verifica-se uma ausência de formação de novos tecidos mineralizados na parede de todos os canais radiculares, associada a um processo de degenerescência e necrose pulpar, com desenvolvimento frequente de infiltrados inflamatórios graves. É também essencial referir que a dentina radicular mostrava várias áreas de reabsorção não reparadas.

Os tecidos constituintes da maior parte do ligamento periodontal apresentavam um aspeto bastante diferente da sua normal arquitetura e organização. Com efeito, era evidente um espessamento à custa de um notório aumento do número de células e fibras de colagénio, bem como a presença de um infiltrado inflamatório grave.

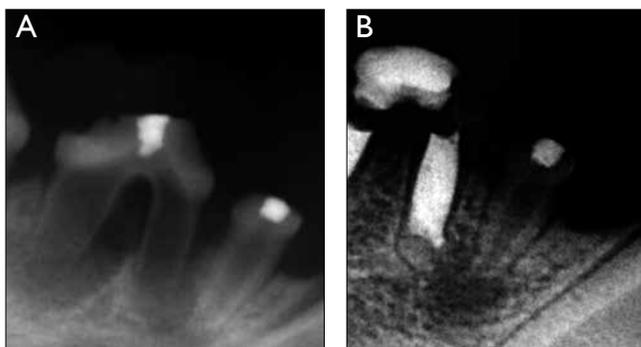


Figura 60. Imagens radiográficas de um dente (1° PM Inferior, 4° quadrante, animal identificado com o n° 4) do grupo do controlo negativo mostrando a interrupção do seu desenvolvimento radicular. A) Aspeto radiográfico de um ápice aberto e lesão periapical 3 semanas após a exposição e disrupção pulpar. B) Imagem radiográfica do mesmo dente (no final do período experimental), mostrando um nítido aumento da lesão periapical.

Na região apical e periapical, era também visível a existência de um intenso infiltrado inflamatório. A reação inflamatória encontrada, típica de uma periodontite apical crónica, apresentava uma predominância de células mononucleadas, linfócitos, com alguns polimorfonucleares e uma grande riqueza de neovasos.

A utilização da técnica de coloração *Brown & Brenn* nas raízes que constituem o controlo negativo permitiu demonstrar a presença de bactérias no lúmen do canal (Figura 66), nas paredes da cavidade pulpar e nos túbulos dentinários (Figura 67).

Foi também possível observar muitas áreas de reabsorção na já delgada camada de cimento, sem qualquer processo de cementogénese associado, bem como a manutenção de um ápice aberto (Figura 64).

É de sublinhar ainda a notória destruição do osso alveolar contíguo à região apical, ocupado por áreas de tecido conjuntivo e denso infiltrado inflamatório, com presença de apenas algumas trabéculas ósseas bastante finas.

Em síntese, nas imagens dos controlos negativos periapicais constatámos a presença de finas paredes radiculares e grandes áreas de reabsorção dos tecidos radiculares a nível apical, envolvendo dentina e cimento, mais pronunciadas junto à emergência dos *foramina*. Por outro lado, era bem visível a presença de um infiltrado inflamatório grave.

As áreas normalmente ocupadas por osso alveolar, apresentavam-se maioritariamente formadas por tecido conjuntivo laxo e pequenas trabéculas ósseas irregulares e com intensa atividade osteoclástica.

Os aspetos morfológicos descritos são compatíveis com o desenvolvimento e permanência de intensas lesões periapicais, confirmando os achados radiológicos.

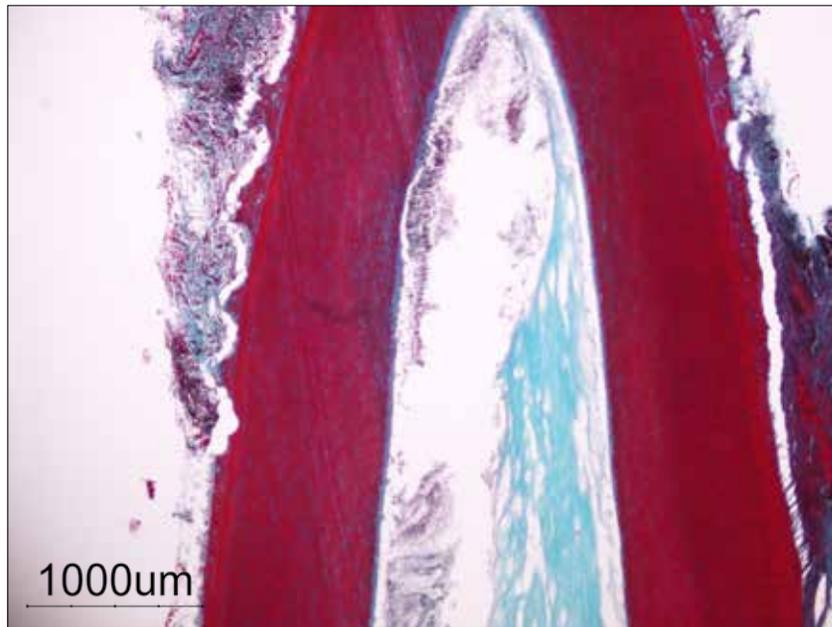


Figura 61. Imagem histológica de um controle negativo pulpar, mostrando na cavidade pulpar grandes áreas vazias, zonas de tecido necrótico e inflamatório bem como a presença de extensa rede de fibras de colagénio. De notar ainda a existência de inúmeras zonas de reabsorção na superfície externa da parede radicular. (TM).

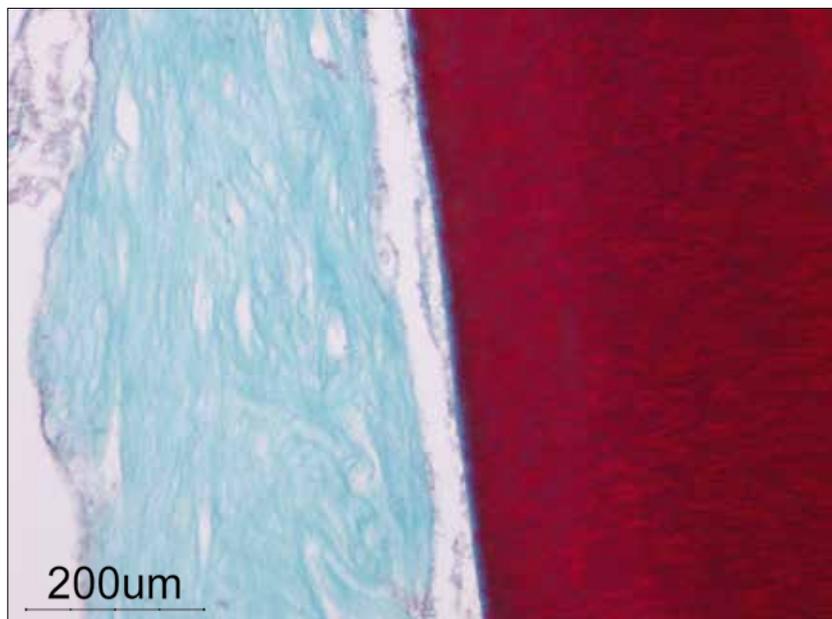


Figura 62. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior, pondo em evidência uma rede de fibras de colagénio. (TM).

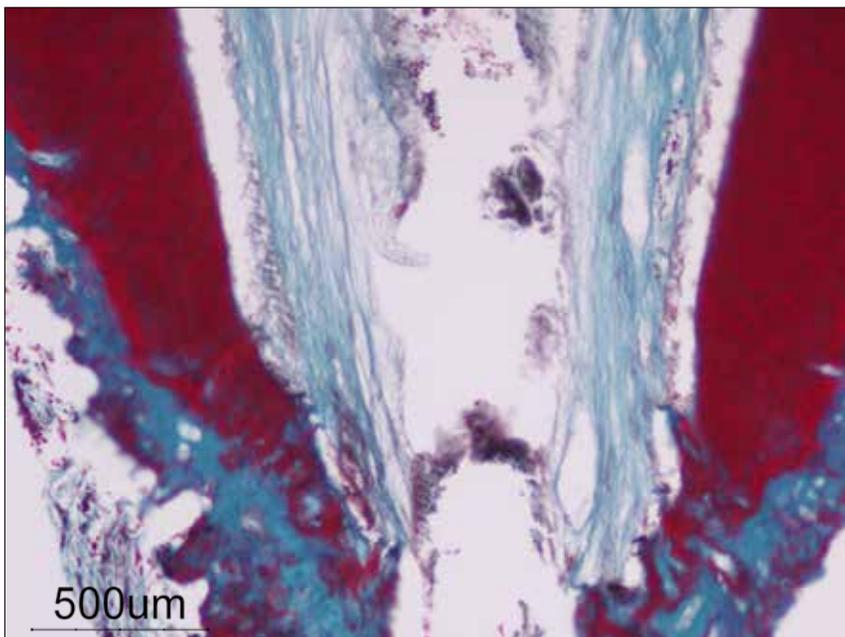


Figura 63. Presença de fibras de colagénio e áreas de infiltrado inflamatório na região apical de um controle negativo pulpar (TM).

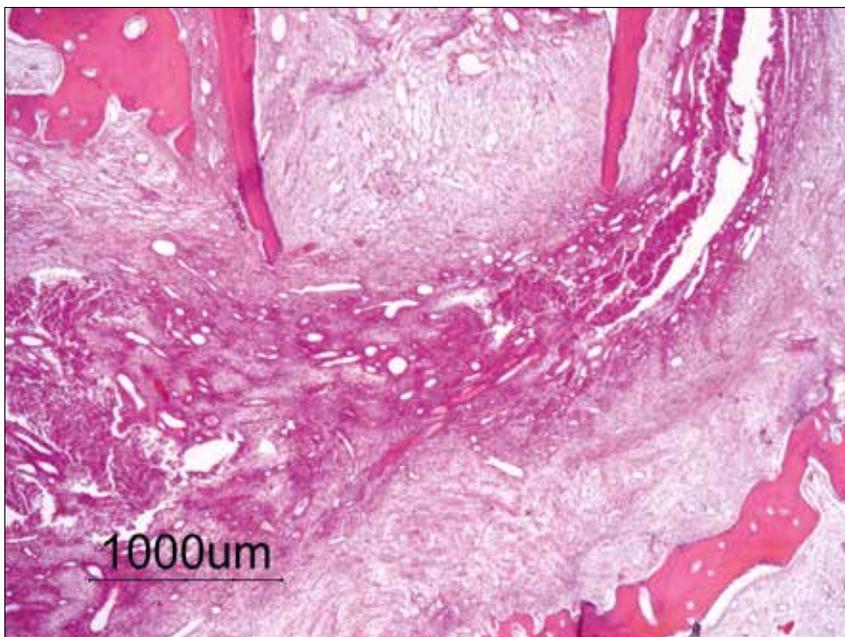


Figura 64. Imagem histológica de um controle negativo periapical, mostrando uma raiz de paredes muito finas, ápice aberto e uma reação inflamatória periapical grave. (HE).

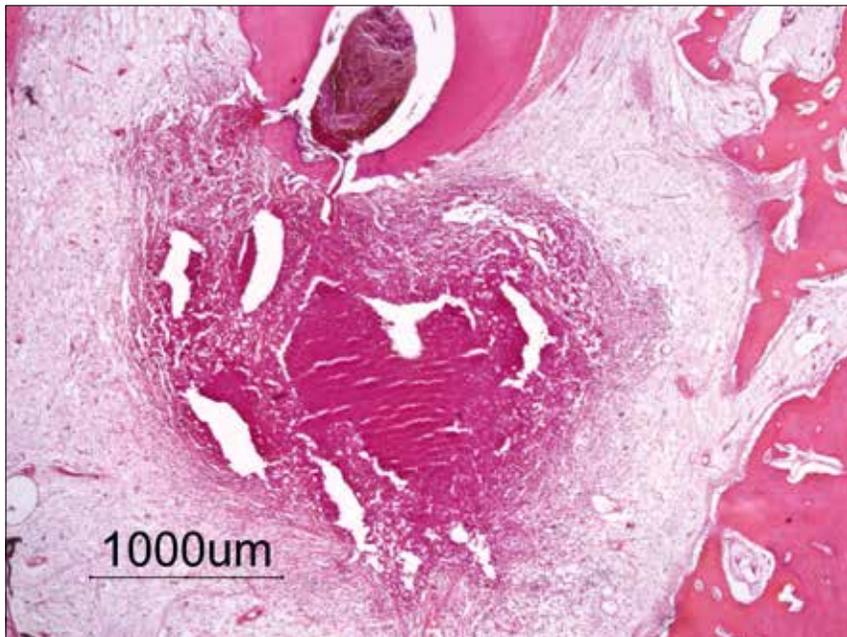


Figura 65. Aspeto típico de uma lesão periapical crónica exuberante associada a uma raiz pertencente a um controlo negativo apical. (HE).

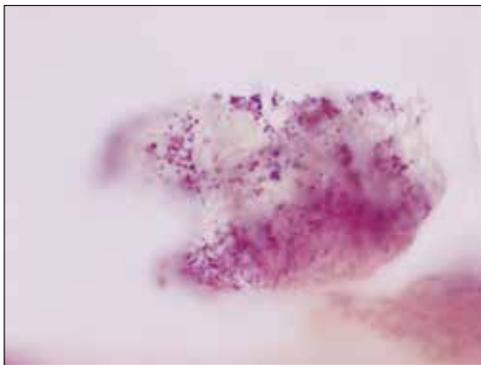


Figura 66. Presença de grande densidade de bactérias no lúmen de um canal radicular infetado e sem tratamento. 1000X no original (BB).

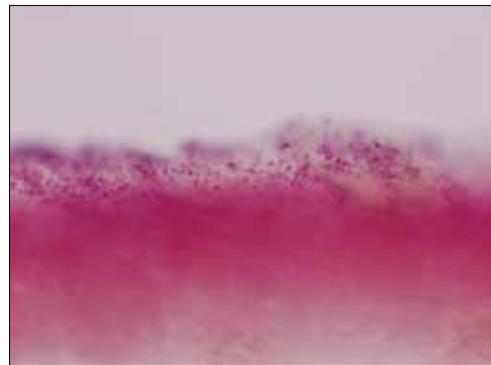


Figura 67. Presença de bactérias numa das paredes radiculares correspondente a um controlo negativo. 1000X no original (BB).

### 3.3.3. Grupo I – Apexificação com MTA (n=18)

As imagens radiográficas (Figura 68 A e B), obtidas neste grupo, põem em evidência e confirmam as obturações canalares com MTA que se apresentam com uma densidade e homogeneidade compatíveis com um elevado padrão de qualidade técnica. No entanto, foi detetada uma pequena extrusão do MTA para os tecidos periapicais em 44 % (8 em 18) das raízes.

Para além disso, foi também possível verificar, no fim do período experimental (Figura 68 A e B), uma nítida ausência de lesões periapicais (inicialmente visíveis), em 94 % (17 em 18) das raízes, associada a um aumento da espessura das paredes dos canais radiculares e encerramento apical em 67% (12 em 17) das raízes. De sublinhar, ainda, a presença de áreas radiopacas (Figura 68 B), certamente relacionadas com a presença de tecidos duros, adjacentes ao MTA.

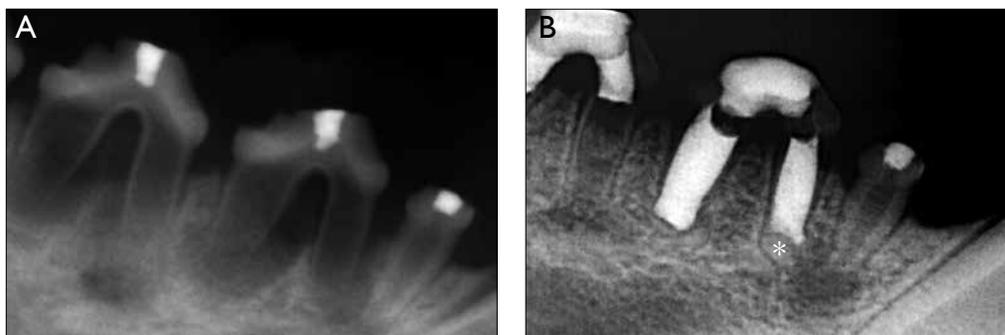


Figura 68. Imagem radiográfica de um dente (2° PM inferior direito, animal com o n° 4) do grupo I, submetido a um procedimento de apexificação com ProRoot® MTA. A) Imagem inicial às 3 semanas, demonstrando a existência de grandes lesões periapicais radiotransparentes. B) Imagem radiográfica no final do período experimental, pondo em evidência o preenchimento canal com MTA, presença de áreas radiopacas adjacentes ao MTA (\*), encerramento apical e resolução das lesões periapicais.

As imagens histológicas, correspondentes a este grupo, confirmam que todo o lúmen dos canais radiculares estava preenchido com o ProRoot® MTA, sendo praticamente inexistente a presença de tecidos (mineralizados ou não) no seu interior.

É de realçar, todavia, que a característica histológica mais importante deste grupo de raízes (sujeitas à técnica de apexificação), foi a presença de áreas de tecidos mineralizados, recém formados, adjacentes ao MTA, maioritariamente associados ao encerramento apical. De facto, é visível (Figura 69) a existência de um tecido mineralizado semelhante a cimento celular, adjacente ao MTA, formando uma ponte (entre as paredes radiculares) em cerca de 83% (15 em 18) das raízes, sendo que 9 destas estavam incompletas. É ainda importante assinalar que este tecido apresenta uma perfeita continuidade e semelhança com o cimento celular presente das zonas periodontais (Figuras 69 e 70).

De registar também nesta região, junto à ponte de tecidos mineralizados, a existência de uma zona de tecido conjuntivo representando uma extensão do ligamento periodontal, mantendo com ele uma continuidade. A espessura e organização do ligamento periodontal apresentou-se normal em 78% (14 em 18) dos casos.

Várias são as amostras (Figuras 71 a 74) que apresentavam nas zonas periapicais e em proximidade ao MTA (e/ou pontes atrás referidas) grandes áreas de tecidos mineralizados constituídas tanto por cimento celular, como por zonas de dentina, bem como a existência de estruturas muito semelhantes a *foramina*. Tal como as figuras 75 A e B demonstram, é visível a existência de túbulos dentinários (contendo alguns prolongamentos odontoblásticos) em perfeita continuidade com uma matriz mineralizada, onde é possível identificar a presença de células com aparência nítida de cementócitos. Também aqui se verifica uma extensão do ligamento periodontal rodeando estas áreas. Podem também ser observadas estruturas deste tipo separadas da raiz correspondente (Figura 77) por um espaço ocupado por lamelas ósseas.

De notar que o cimento celular, constituinte do periodonto, atinge na porção apical destas raízes uma espessura considerável (Figura 76), quando em comparação com a dentina adjacente.

De referir, porém, que mesmo nas situações em que houve extrusão do MTA, apenas três raízes, não apresentaram formação de tecidos mineralizados, na proximidade do MTA. Nestes casos, foi possível observar apenas a presença de áreas de tecido conjuntivo fibroso, por vezes semelhante ao de uma cápsula fibrosa, com ligeiro infiltrado inflamatório.

De registar, por último, a presença habitual de grupos de macrófagos, contendo partículas que julgamos ser de MTA, localizados quer no ligamento periodontal (Figura 78 A), quer mesmo nos espaços medulares (Figura 78 B) entre as trabéculas ósseas.

Pela coloração de *Brown & Brenn* não foi possível detectar a presença de bactérias nos cortes histológicos correspondentes a este grupo.

Em síntese, do conjunto de imagens apresentado podemos afirmar que:

- O lúmen dos canais radiculares encontra-se completamente preenchido com MTA.
- A existência de pontes de cimento celular, envolvidas por ligamento periodontal, nas áreas periapicais adjacentes ao MTA.
- A presença frequente de grandes estruturas constituídas por dentina e cimento situadas, quer em estreita proximidade e continuidade com as pontes atrás referidas, quer separadas por um espaço ocupado por lamelas ósseas localizando-se para apical das raízes correspondentes.

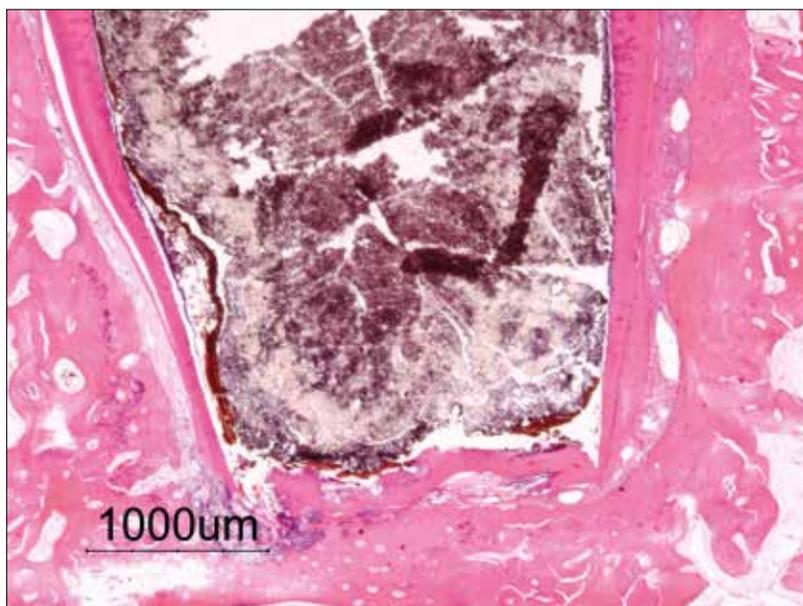


Figura 69. Imagem de uma raiz do grupo I, submetida a um procedimento de apexificação, onde é visível a presença de uma ponte de tecido mineralizado, adjacente ao MTA, rodeada por uma extensão do ligamento periodontal. (HE).

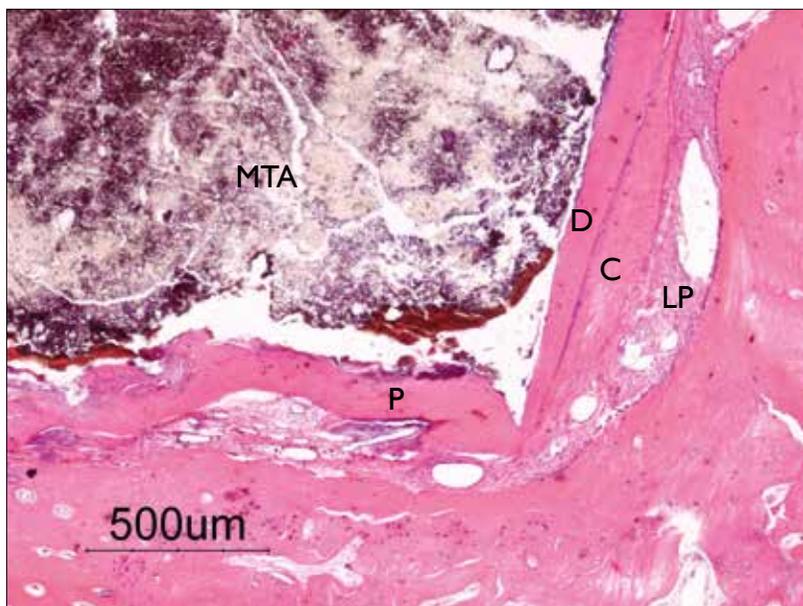


Figura 70. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior, mostrando a ponte (P) de tecido mineralizado semelhante a cimento celular e a sua continuação com o cimento constituente do periodonto. Cimento celular (CE), dentina radicular (D) e ligamento periodontal (LP). (HE).

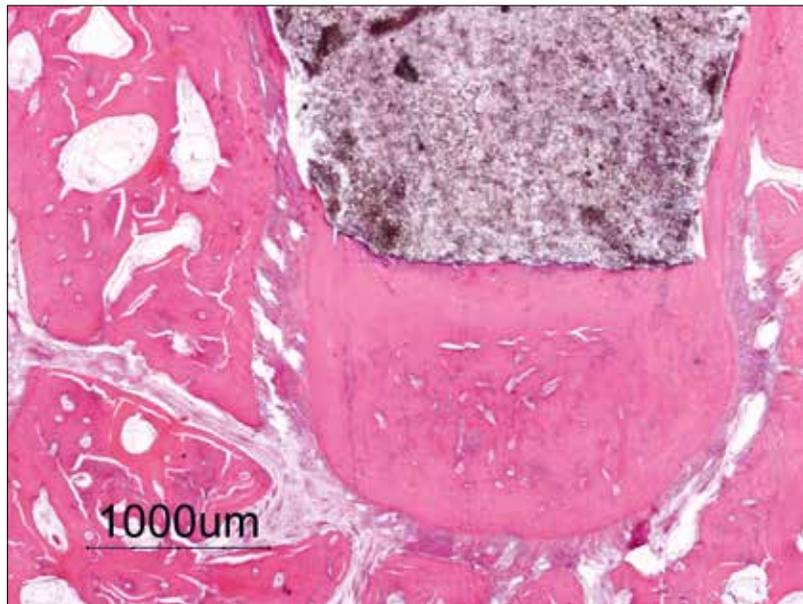


Figura 71. Aspeto de uma zona periapical pertencente ao grupo I, apresentando para além de um encerramento apical completo, a presença na zona apical de uma grande área de tecido mineralizado constituída por cimento celular e dentina. De notar ainda o seu envolvimento pelo ligamento periodontal. (HE).

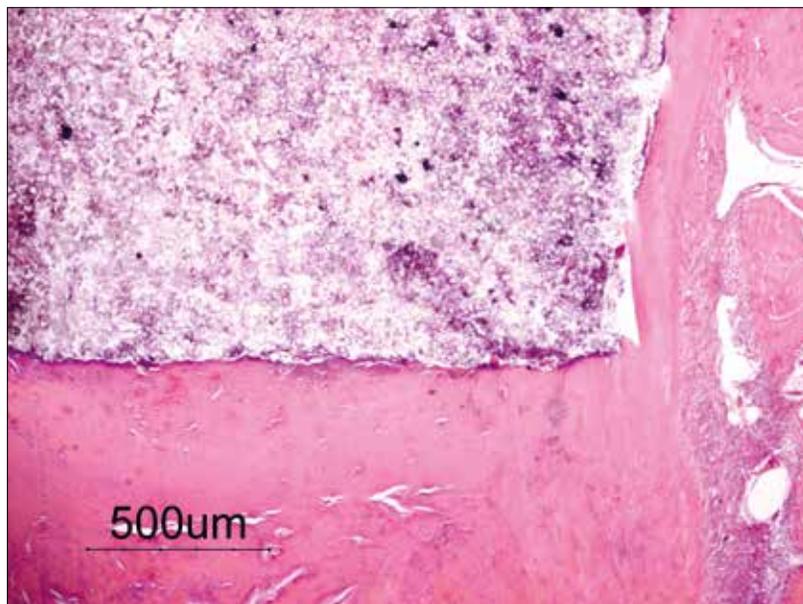


Figura 72. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior. (HE).



Figura 73. Imagem de uma zona periapical (grupo I), com extrusão de MTA sendo visível a presença de duas grandes áreas de tecido mineralizado constituídas por cimento celular e dentina, envolvidas pelo ligamento periodontal. Estas formações de tecido mineralizado podem também ser observadas na imagem radiográfica da figura 68. (HE).

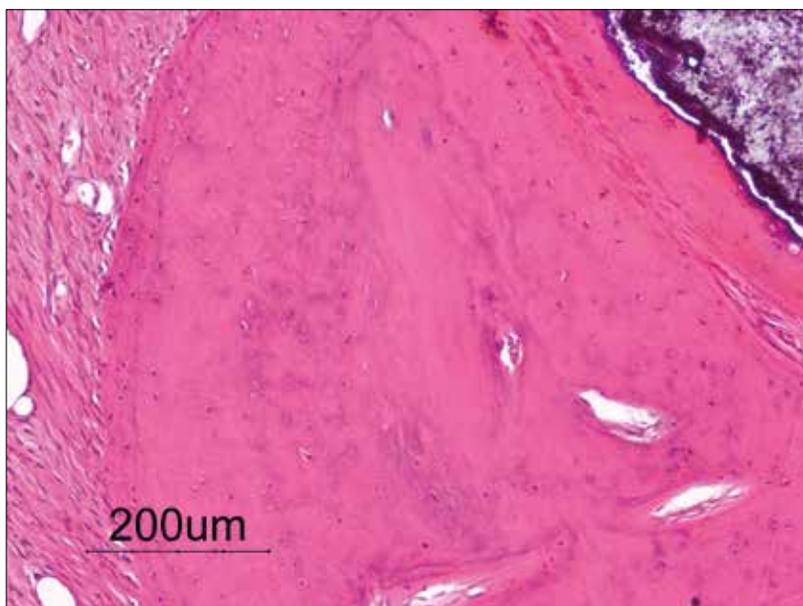


Figura 74. Presença de grande quantidade de células (cementócitos), que caracterizam a maioria das áreas tecidulares de formação recente, adjacentes ao MTA, representadas na figura anterior. É também visível o ligamento periodontal e alguns *foramina* apicais. (HE).

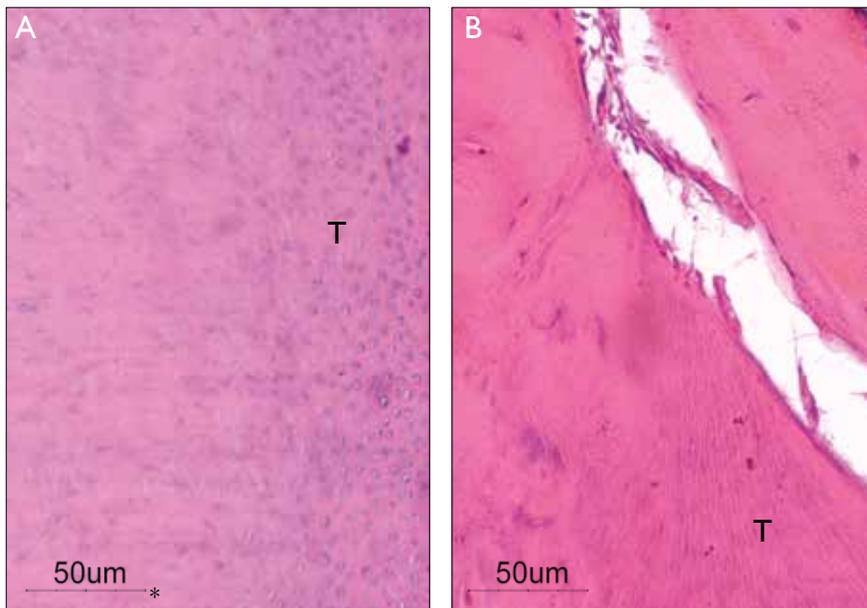


Figura 75. Existência de túbulos dentinários (T) observados em muitas das áreas constituintes dos tecidos duros recém formados representados nas figuras 71 e 73. A) Corte transversal B) Corte longitudinal. (HE).

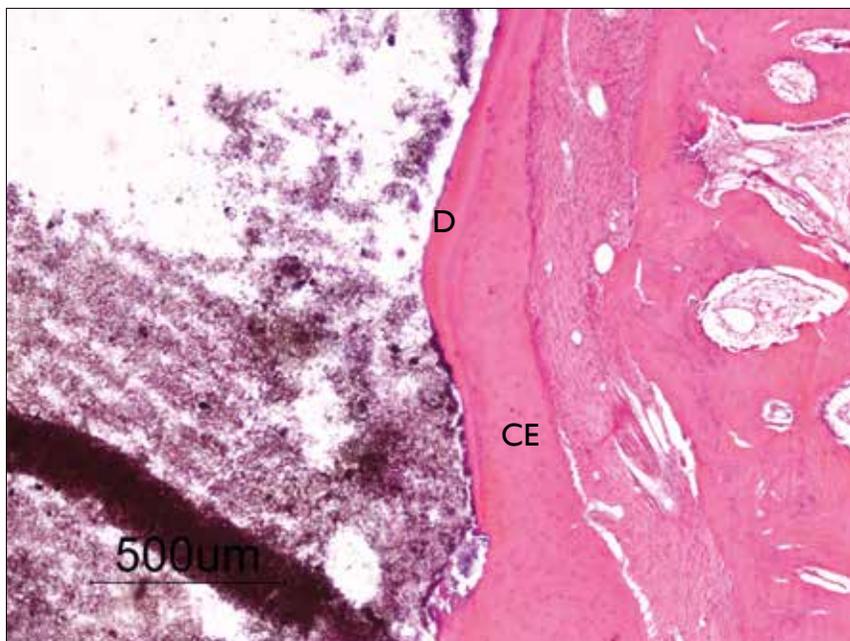


Figura 76. Maior ampliação de uma zona representada na figura 73, pondo em evidência a considerável espessura do cimento celular periodontal (CE) quando em comparação com a dentina adjacente (D). (HE).

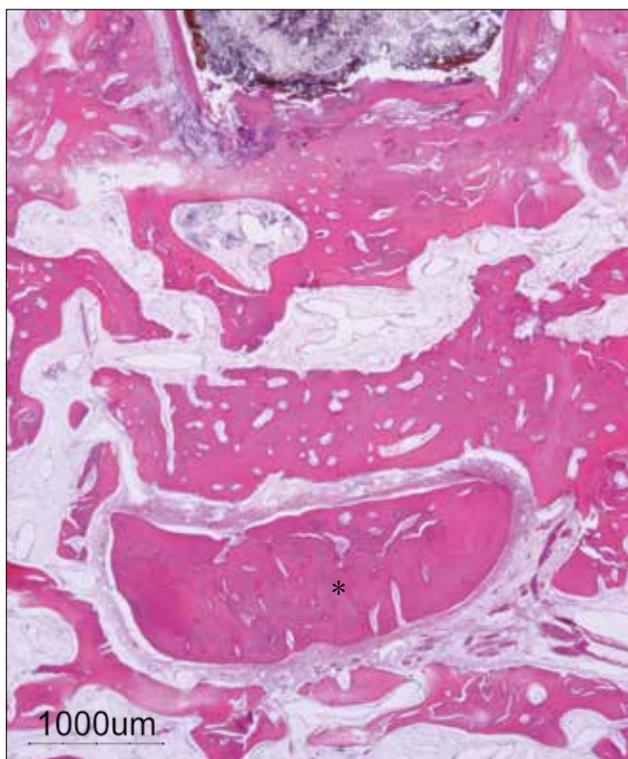


Figura 77. Imagem de uma estrutura mineralizada(\*) localizada para apical da raiz dentária rodeada por ligamento periodontal e separada da raiz correspondente por áreas ocupadas por trabéculas ósseas. (HE).

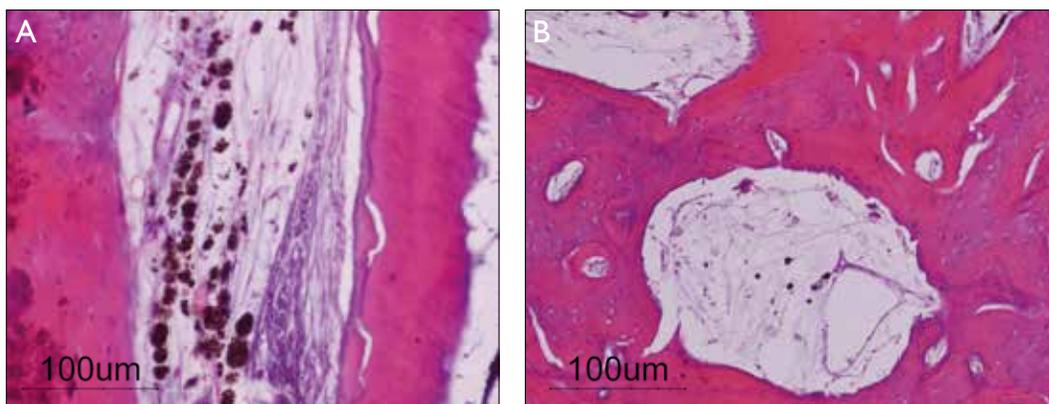


Figura 78 . Aspeto de uma grande densidade de macrófagos contendo partículas de MTA localizados no ligamento periodontal (A) e no espaço medular entre as trabéculas ósseas(B). (HE).

### 3.3.4. **Grupos experimentais com matrizes**

Antes de uma descrição pormenorizada de cada um dos grupos pareceu-nos vantajoso tecer algumas considerações de carácter geral, apresentando alguns aspetos comuns a todos os grupos experimentais com matrizes.

Nos grupos experimentais em que foram aplicadas as matrizes atrás descritas (grupos 2, 3, 4), num total de 57 raízes, foi possível confirmar radiograficamente, na grande maioria dos casos, a existência de uma barreira cervical de MTA adequada e bastante satisfatória. Verificou-se também uma evolução positiva no sentido da resolução da radiotransparência apical em 84% (48 em 57) das raízes, um aumento da espessura das suas paredes radiculares em 77,2 % (44 em 57) e um encerramento apical parcial e/ou completo em 70,2% (40 em 57) das situações estudadas.

Histologicamente foi possível observar no espaço canal, apical ao MTA, e na generalidade dos casos (Figuras 79 e 80), áreas de tecido conjuntivo bastante vascularizado, bem como a presença de tecidos mineralizados com diferentes características e localizações. De facto, é visível, com frequência, a existência de um tecido mineralizado com uma organização histológica semelhante a cimento celular (Figuras 81 a 84), formado em aposição à parede dentinária. À medida que se caminha para coronal a espessura desta camada de cimento vai diminuindo.

É impossível deixar de realçar as interessantes imagens de dentina revestida bilateralmente por cimento (Figuras 81 e 83), que poderemos referenciar como cimento intracanal e extracanal. De acentuar, no entanto, que a camada de cimento intracanal e de dentina se encontram, por vezes, destacadas uma da outra (Figura 82), verificando-se um pequeno espaço entre ambas, que pode ser entendido como um artefacto. De sublinhar também (Figuras 79 e 84) a existência de uma perfeita continuidade entre este novo tecido mineralizado de formação recente, cimento intracanal, com o cimento constituinte do periodonto já existente.

Habitualmente disperso no lúmen do canal e geralmente mais afastado das paredes dentinárias, foi frequentemente encontrado nestes grupos a presença de áreas de tecido mineralizado (Figuras 80, 81 e 84) com características de tecido ósseo (intensa vascularização, grande densidade celular e alguns sistemas de Havers), que muitas vezes apresentam continuidade com as trabéculas ósseas que formam a parede alveolar da região periapical.

Um aspeto que nos parece importante registar é a presença quase constante de estruturas mineralizadas (Figura 84 e 86), circundadas por ligamento periodontal, contendo restos epiteliais de Malassez, situadas a uma certa distância das raízes dentárias correspondentes. Estas áreas de tecido mineralizado são essencialmente constituídas por cimento celular e dentina, mostrando uma composição em tudo idêntica as paredes da região apical de qualquer raiz, incluindo a presença de *foramina*. Estas formações bastante semelhantes às descritas no grupo do MTA, parecem posicionar-se ao nível do local estimado para a formação do seu ápice.

Com efeito, estas estruturas parecem representar o desenvolvimento de um ápice radicular totalmente (Figuras 85) ou parcialmente (Figura 109) separado da restante raiz correspondente, dependendo da sua ligação ou não a uma das paredes radiculares. O espaço entre estas formações e a porção mais apical da raiz correspondente está, na maior parte dos casos, ocupado por lamelas ósseas.

Um facto, que não podemos deixar de referir e ilustrar, prende-se com a frequência com que encontramos células macrofágicas, habitualmente com uma localização perivascular, contendo partículas, que julgamos ser de MTA, presentes quer na cavidade pulpar (Figuras 87 e 88) quer no ligamento periodontal e até mesmo nos espaços medulares entre as trabéculas ósseas.

Relativamente à existência de bactérias não foi possível detectar de forma clara a sua presença em todos os grupos experimentais com matrizes, com exceção de dois cortes pertencentes ao grupo 3.

Feitas estas considerações de carácter geral, achamos por bem proceder a uma descrição mais detalhada dos resultados obtidos em cada um dos grupos.

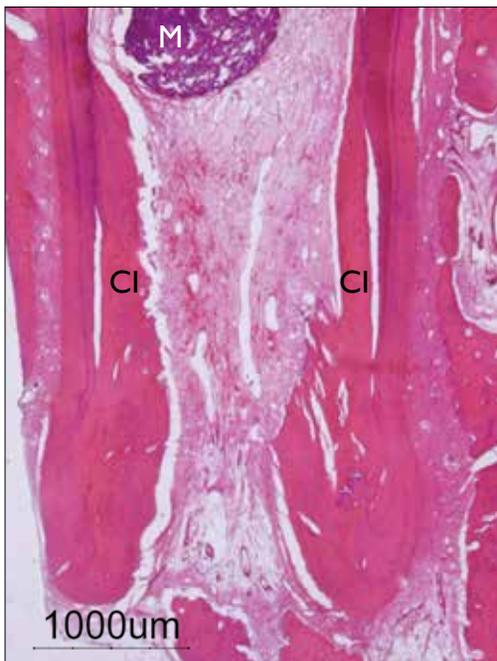


Figura 79. Aspeto de uma raiz do grupo 4, mostrando no espaço canalar, para além de parte residual da matriz de P:CS (M), a existência de áreas de tecido conjuntivo laxo com intensa vascularização e a presença de um tecido mineralizado semelhante a cimento celular(CI), em aposição à parede dentinária. (HE).

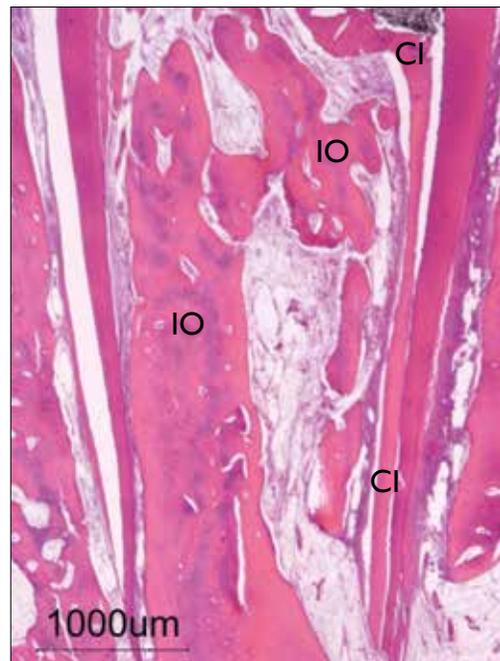


Figura 80. Imagem de uma raiz do grupo 2 (coágulo), mostrando no espaço canalar para além de tecido conjuntivo laxo, intensamente vascularizado, zonas ocupadas por tecidos mineralizados com características de tecido ósseo (IO). É também visível a presença de cimento celular (CI) adjacente à dentina. (HE).

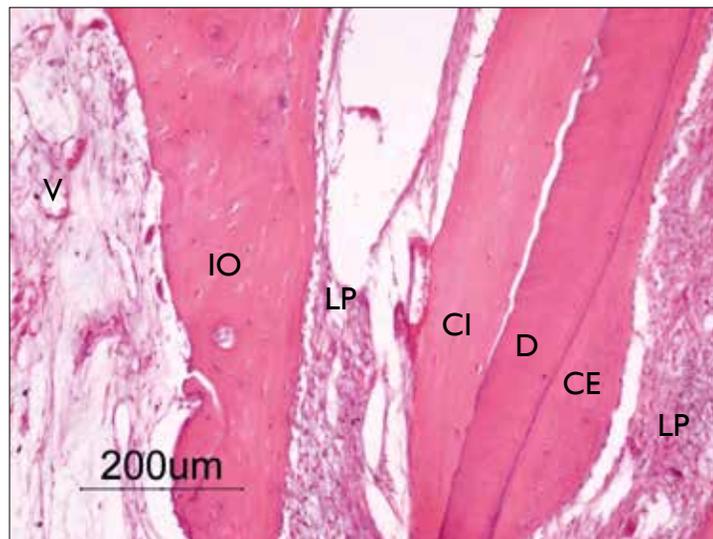


Figura 81. Presença no espaço canal de uma raiz do grupo 2 de áreas de tecido conjuntivo bastante vascularizado(V), áreas de tecido ósseo (IO), extensões do ligamento periodontal (LP) e áreas de cimento celular (CI) em aposição à face interna da parede dentinária (D). São visíveis também zonas de cimento celular na face externa da dentina (CE) e de ligamento periodontal (LP). (HE).

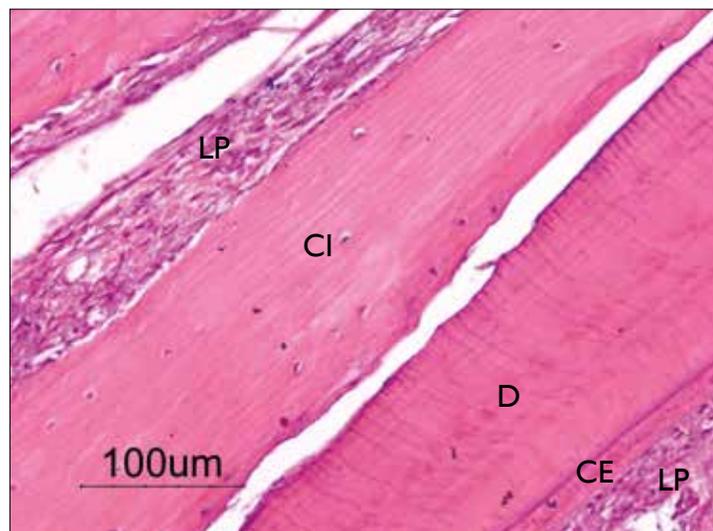


Figura 82. Imagem histológica de uma raiz do grupo 3, mostrando um tecido mineralizado, semelhante a cimento celular (CI) formado em justaposição à dentina (D). É de sublinhar, porém, que estes dois tecidos (cimento e dentina) se encontram destacados um do outro, verificando-se um pequeno espaço entre ambos. É ainda possível identificar uma área de tecido conjuntivo, considerado como uma extensão do ligamento periodontal (LP) adjacente ao cimento celular (CI). De notar também a presença de uma pequena zona de cimento (CE) e de ligamento periodontal (LP). (HE).

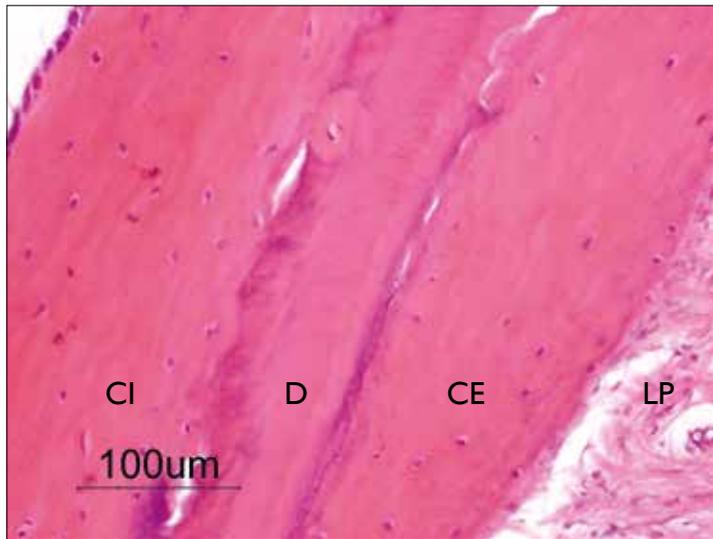


Figura 83. Imagem de uma raiz do grupo 4, com uma zona de dentina (D), revestida bilateralmente por cimento celular, que podemos referir como intracanal (CI) e extracanal(CE). É também visível parte do ligamento periodontal (LP). (HE).

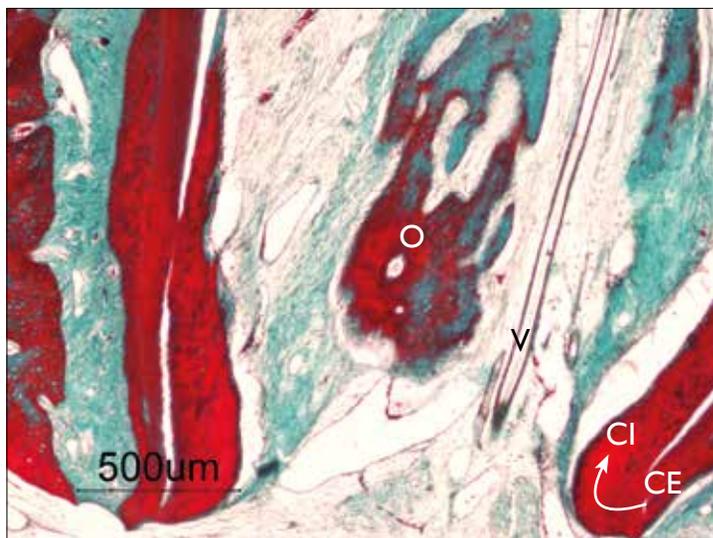


Figura 84. Presença de áreas de tecido ósseo (IO) no lúmen do canal (região central) mostrando, numa raiz do grupo 2, algumas zonas de tecido ósseo imaturo (verde) e tecido ósseo lamelar(vermelho). É ainda possível observar (na periferia) a existência de áreas de cimento celular (CI) adjacentes à dentina em perfeita continuidade (seta) com o cimento do periodonto (CE). O restante espaço canal ar está preenchido por tecido conjuntivo laxo muito vascularizado (V). (TM).

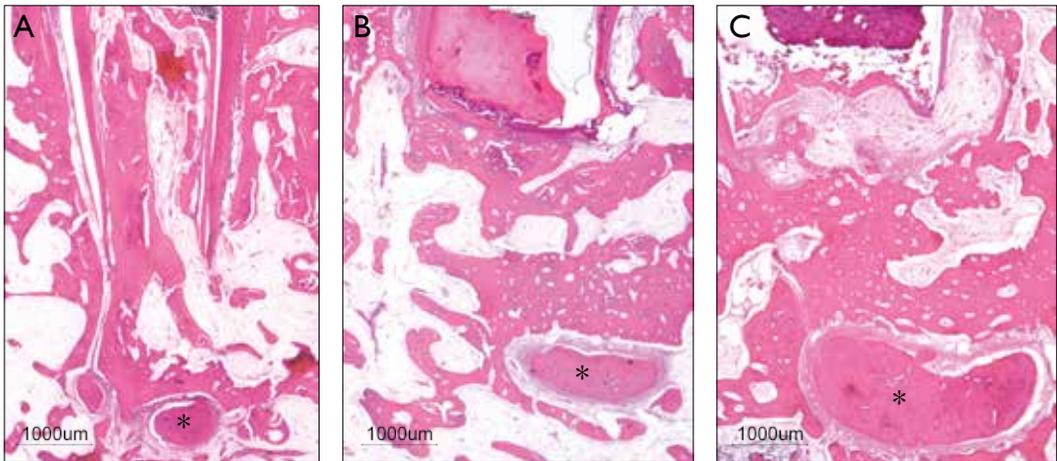


Figura 85. Presença de várias estruturas mineralizadas (\*), circundadas por ligamento periodontal, situadas para apical das raízes dentárias correspondentes. A) Raiz do grupo 2, B) raiz do grupo 3 e C) raiz do grupo 4. (HE).



Figura 86. Imagem de uma formação constituída essencialmente por cimento celular e circundada por ligamento periodontal e osso alveolar, localizada a uma certa distância de uma raiz dentária de ápice aberto do grupo 3. (HE).

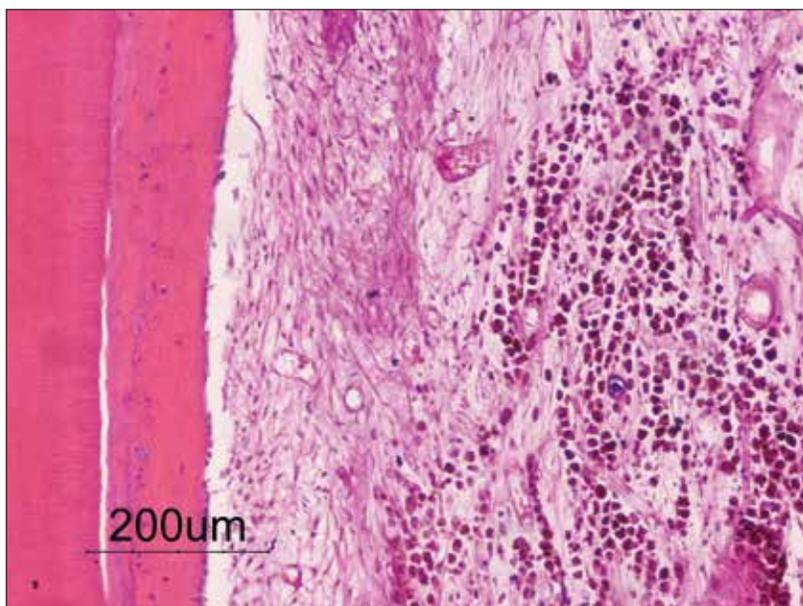


Figura 87. Aspeto de uma grande densidade de macrófagos (contendo partículas de MTA) localizados na cavidade pulpar de uma raiz do grupo 4. Na parede radicular é também visível a habitual presença de cimento celular adjacente à dentina (HE).

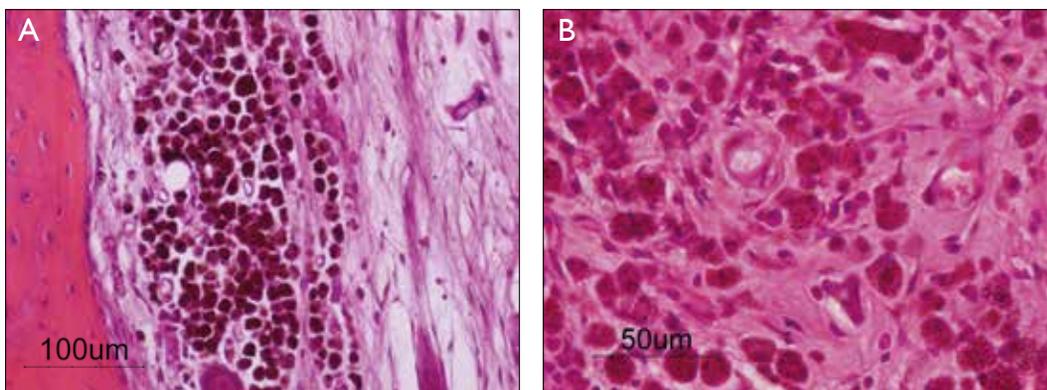


Figura 88. Maior ampliação de duas zonas (A) e (B) representadas na imagem anterior. (HE).

### 3.3.4.1. Grupo 2 – Coágulo sanguíneo (n=19)

O conjunto de imagens radiográficas correspondente a este grupo experimental (Figura 89) demonstrou, na grande maioria dos casos (74%, 14/10), o aumento da espessura das paredes radiculares. De notar, também, a ausência de lesões periapicais em 79% (15/19) dos casos em estudo, a sua significativa diminuição em três outros casos, verificando-se, apenas num caso, um aumento da radiotransparência periapical.

Foi observado um encerramento apical completo em 42% (8 /19) dos casos, verificando-se um encerramento apical parcial em 32% (6/19) dos casos. As restantes raízes não apresentaram sinais radiográficos de um encerramento apical.

A figura 99 pretende estabelecer um paralelismo entre uma análise radiológica e histológica do mesmo dente (3°PM superior, 1° quadrante, animal identificado com o n° 3) correspondente à imagem histológica da figura 98, demonstrando o seu eficaz processo de crescimento e maturação radicular durante o período experimental.

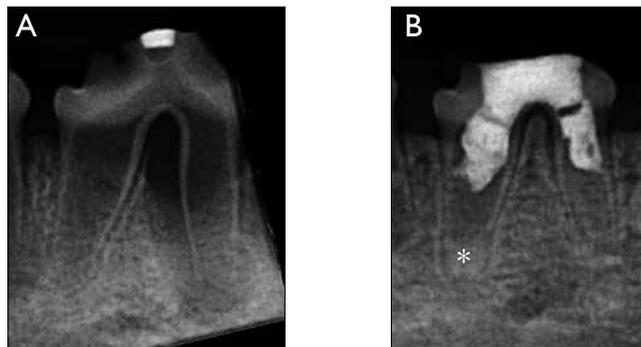


Figura 89. Imagens radiográficas de um dente (3°PM inferior, 4° quadrante, animal identificado com o n° 1) do grupo 2. A) Aspeto radiográfico de um ápice aberto e lesão periapical na fase inicial do período experimental. B) Imagem radiográfica do mesmo dente no final do período experimental, mostrando resolução da lesão periapical, ligeiro aumento da espessura das paredes radiculares e encerramento apical (\*).

Nas raízes em que foi estimulado um procedimento de revascularização através da indução de uma hemorragia apical e desenvolvimento de um coágulo sanguíneo, foi possível identificar no espaço canalar subjacente ao MTA (Figuras 80, 81, 84, e 90) a presença de áreas de tecido conjuntivo laxo intensamente vascularizadas e zonas ocupadas por tecidos mineralizados com diferentes características e localizações.

Como já foi referido, é notória a existência de um tecido mineralizado em tudo semelhante a cimento celular, formado em aposição à face interna da dentina radicular, sendo mesmo possível observar a sua continuidade (Figura 84 e 91) com as zonas de cimento periodontal. Por outro lado, nos casos em que houve formação de uma ponte subjacente ao MTA (Figura 98 e 100, 104 e 105), podem também verificar-se zonas de continuidade entre esta ponte mineralizada (constituída por cimento e dentina) e o cimento justaposto à dentina.

É de sublinhar, porém, que estes dois tecidos, cimento e dentina, se encontram muitas vezes destacados um do outro (Figura 92A), verificando-se um espaço entre ambos. Este aspeto poderá ficar a dever-se a artefactos decorrentes do processamento histológico, pois como é possível observar nesta figura, nota-se uma perfeita correspondência entre as interfaces destes dois tecidos. No entanto, não será de excluir uma certa fragilidade na sua ligação/coesão, resultante da sua diferente constituição e diferentes períodos de formação. Parece-nos ainda importante referir que este espaço se encontra localizado nas áreas habitualmente correspondentes à pré-dentina, sendo de realçar a curiosa e original imagem representada na figura 92B. De facto, nota-se nesta figura uma perfeita continuidade entre este espaço e uma região conservada de pré-dentina junto ao cimento recém formado/neoformado, sendo muito raro encontrar pré-dentina (Figura 93) na interface entre dentina e cimento.

Adjacente ao cimento recém formado, sobretudo na região apical, é visível a presença de um tecido conjuntivo com características muito semelhantes ao ligamento periodontal, verificando-se também (Figura 94 A) uma continuidade com esta estrutura.

De registar, no entanto, que à medida que caminhamos para coronal vai diminuindo a densidade celular e fibrilar apresentando-se gradualmente como um tecido conjuntivo bastante laxo.

De notar que foram encontradas imagens sugestivas de restos epiteliais de Malassez (Figura 94B) nestas zonas do ligamento periodontal de localização intracanal, como muito maior frequência nas regiões mais apicais. Estas observações, devido ao seu carácter inesperado e surpreendente, foram posteriormente confirmadas por imunocitoquímica (Figura 95), com anticorpos anti-queratina, ficando assim demonstrado tratar-se, mesmo, da presença de restos epiteliais de Malassez.

Ainda no canal radicular podem ser identificadas (Figura 96 e 37) várias áreas de tecido mineralizado, por vezes bastantes extensas, dispersas no lúmen pulpar, com uma localização mais interna, quando consideradas em relação ao cimento e ligamento intracanal atrás descritos. Estas regiões apresentam nítidas características de tecido ósseo, mostrando uma intensa vascularização, grande densidade celular e alguns sistemas de Havers. Importa também referir a existência de regiões de tecido ósseo imaturo, facilmente identificado pela sua diferente coloração, apresentando frequentemente processo de remodelação ativa.

Muitas vezes é ainda possível observar a continuidade deste tecido ósseo (Figuras 85A, 96 e 97) de formação recente, com o tecido ósseo constituinte da parede alveolar.

Também, não é invulgar encontrar uma continuidade entre estes dois tecidos, cimento celular e tecido ósseo.

De sublinhar, a existência de grandes áreas de tecido conjuntivo laxo, muito vascularizadas e inervadas preenchendo os espaços entre os tecido mineralizados, ocupando no seu conjunto a maior área da cavidade pulpar. Nestas regiões (Figura 98, 101, 102 e 103) pudémos encontrar, por vezes (em 4 dos casos estudados), a presença de uma extensa camada de células odontoblásticas adjacente a uma zona de pré-dentina e dentina recém formada, que consideramos como uma área em que se verificou um verdadeiro processo de regeneração do complexo pulpo-dentinário. Este facto, foi maioritariamente observado em apenas uma das paredes dentinárias. Contudo, nunca foi encontrada uma cavidade pulpar completamente regenerada e revestida na sua totalidade por células odontoblásticas.

Não queremos terminar a descrição dos resultados histológicos deste grupo experimental sem apresentar algumas imagens (Figuras 90, 98 e 99) que ilustram um completo encerramento apical e um eficaz processo de crescimento e maturação radicular durante o período experimental.

Em síntese, do conjunto de imagens apresentado podemos afirmar que apesar de encontrarmos, com grande frequência, o espaço canalar novamente preenchido por grande áreas de tecido conjuntivo laxo com grande vascularização foi notória na cavidade pulpar a presença de tecidos mineralizados.

De entre estes tecidos destaca-se por um lado a formação de cimento celular em aposição à face interna da dentina, geralmente acompanhado por um tecido conjuntivo semelhante ao ligamento periodontal (contendo alguns restos epiteliais de Malassez) bem como, várias áreas de tecido ósseo por vezes bastante extensas dispersas no lúmen canal.

Ainda que não tenha sido encontrada nenhuma cavidade pulpar completamente regenerada foi possível observar por vezes a presença de uma camada extensa de células odontoblásticas, adjacente a zonas de pré-dentina e dentina formando um eficaz complexo pulpo-dentinário, para além de muitas situações de encerramento apical completo e crescimento radicular.

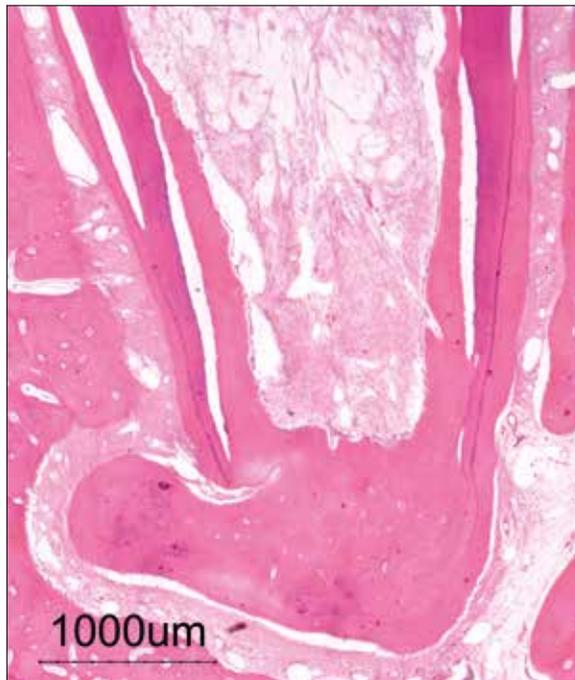


Figura 90. Aspetto de uma raiz do grupo 2, (coágulo sanguíneo) mostrando no espaço canalar a presença de áreas de tecido conjuntivo laxo, intensa vascularização e zonas ocupadas por um tecido mineralizado formado em aposição à dentina (que vai diminuindo de espessura para coronal). É também visível um completo encerramento apical. (HE).

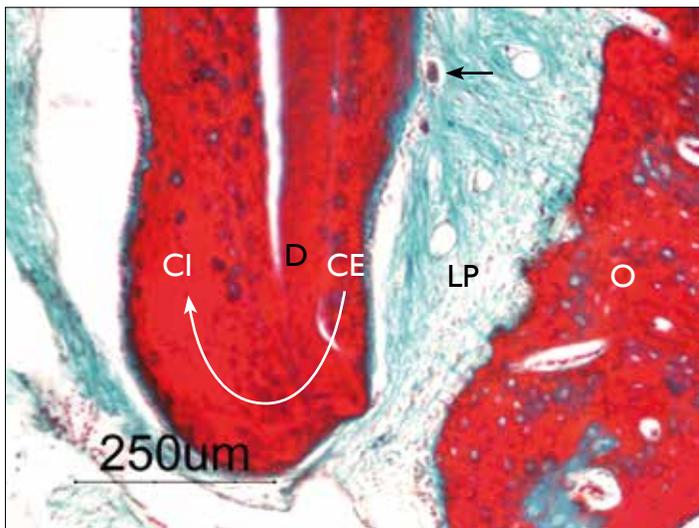


Figura 91. Presença de um tecido mineralizado em tudo semelhante a cimento celular (CI), formado em justaposição à face interna da dentina (D) e a sua continuidade com o cimento periodontal (CE). É também possível observar parte do ligamento periodontal (LP) com alguns restos epiteliais de Malassez (seta) e tecido ósseo (O) da parede alveolar. (TM).

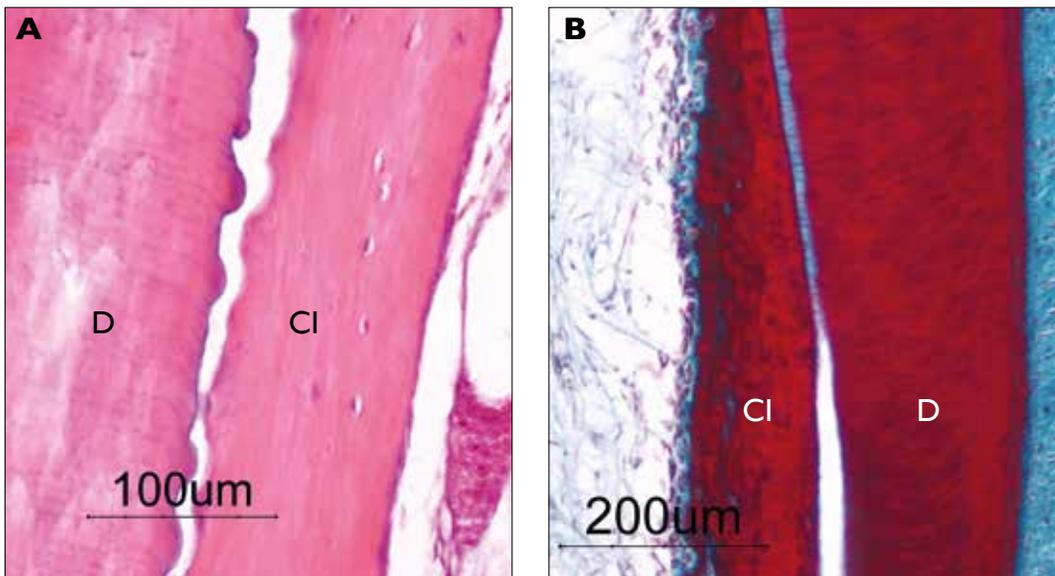


Figura 92. **A)** Existência de um pequeno espaço separando o cimento intracanal (CI) da dentina (D), notando-se no entanto uma perfeita correspondência nas interfaces destes dois tecidos. (HE). **B)** É possível observar uma continuidade entre este espaço e uma região conservada de pré-dentina (TM).

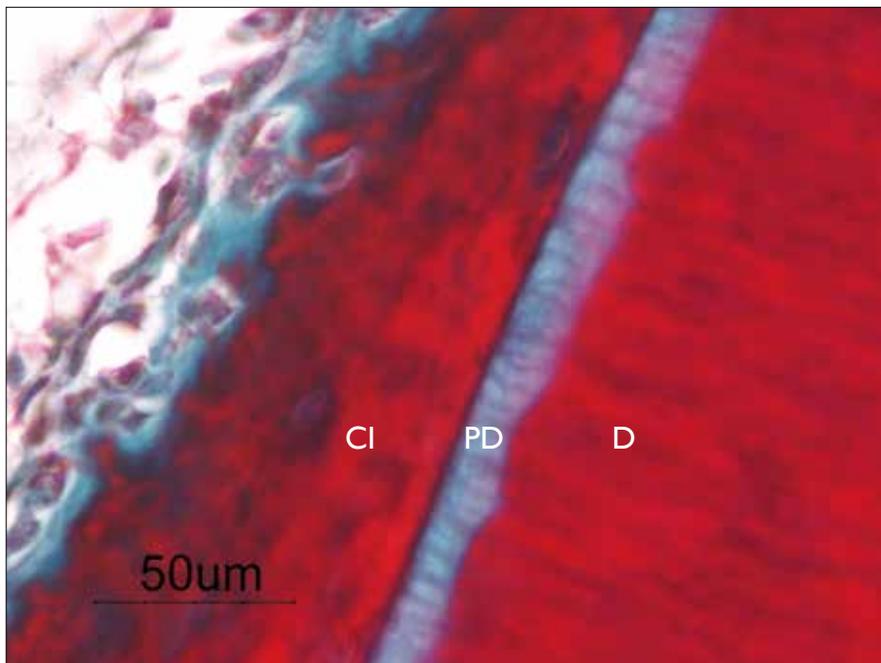


Figura 93. Presença de pré-dentina (PD) na interface entre dentina (D) e cimento intracanal (CI). É também visível uma camada de cementoblastos e cementóide, na periferia do cimento. (TM).

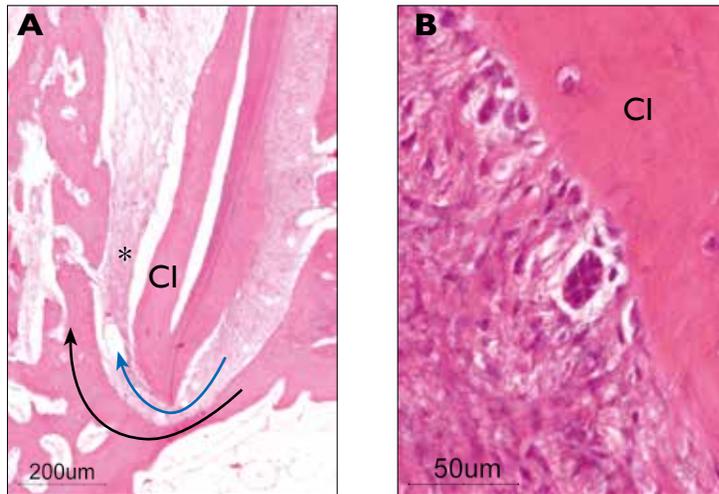


Figura 94. **A)** Presença no espaço pulpar de um tecido conjuntivo (\*), adjacente ao cimento intracanal (CI) com características muito semelhantes ao ligamento periodontal, verificando-se uma perfeita continuidade (seta azul) com esta estrutura. É também possível verificar a continuidade (seta preta) entre o tecido ósseo formado no lúmen pulpar e o tecido ósseo constituente da parede alveolar. (HE). **B)** Imagem sugestiva de restos epiteliais de Malassez localizados no ligamento periodontal junto ao cimento presente no espaço intracanal. São também visíveis algumas fibras de Sharpey. (HE).

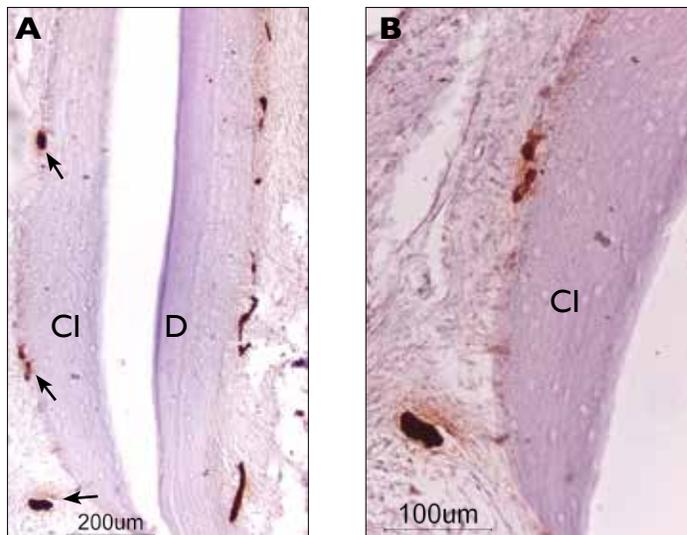


Figura 95. **A)** Demonstração por imunocitoquímica (com anticorpos anti-queratina) da existência de restos epiteliais de Malassez (setas), junto ao cimento intracanal e extracanal. É ainda visível uma área de dentina (D) e uma pequena separação entre este tecido e o cimento intracanal (CI). **B)** Maior ampliação de uma zona representada em **A)** pondo em evidência para além de restos epiteliais de Malassez, a constituição histológica (presença de cementócitos) do cimento celular intracanal (CI) e a presença de fibras de Sharpey.

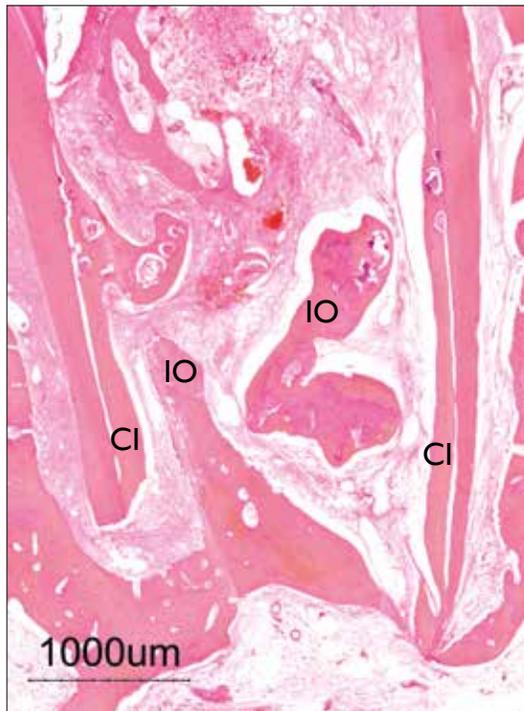


Figura 96. Presença de várias áreas de tecido ósseo (IO) dispersas no lúmen pulpar, com uma localização mais interna quando consideradas em relação ao cimento intracanal (CI). (HE).

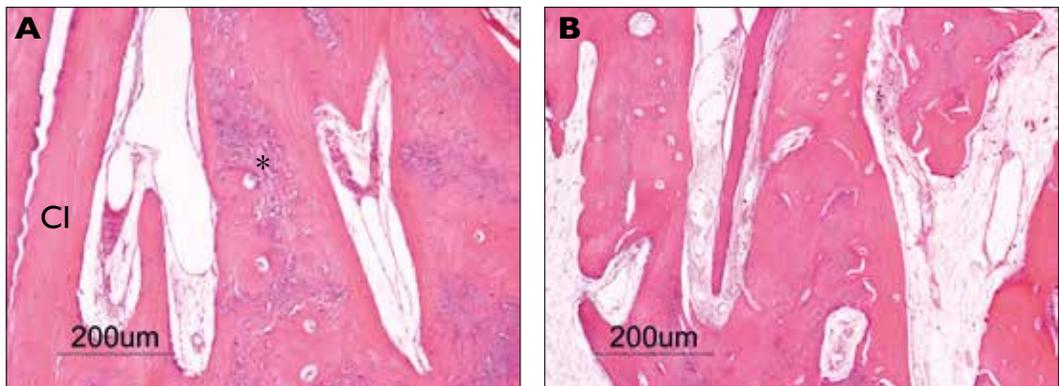


Figura 97. Maior ampliação de duas zonas representadas na figura 80 mostrando: **A**) algumas áreas de tecido ósseo imaturo (\*) rodeadas de tecido ósseo lamelar. É ainda possível observar a existência de áreas de cimento celular (CI) adjacentes à dentina, para além de uma intensa vascularização. **B**) Observa-se a continuidade entre o tecido ósseo da parede alveolar e o tecido ósseo da cavidade pulpar. (HE).

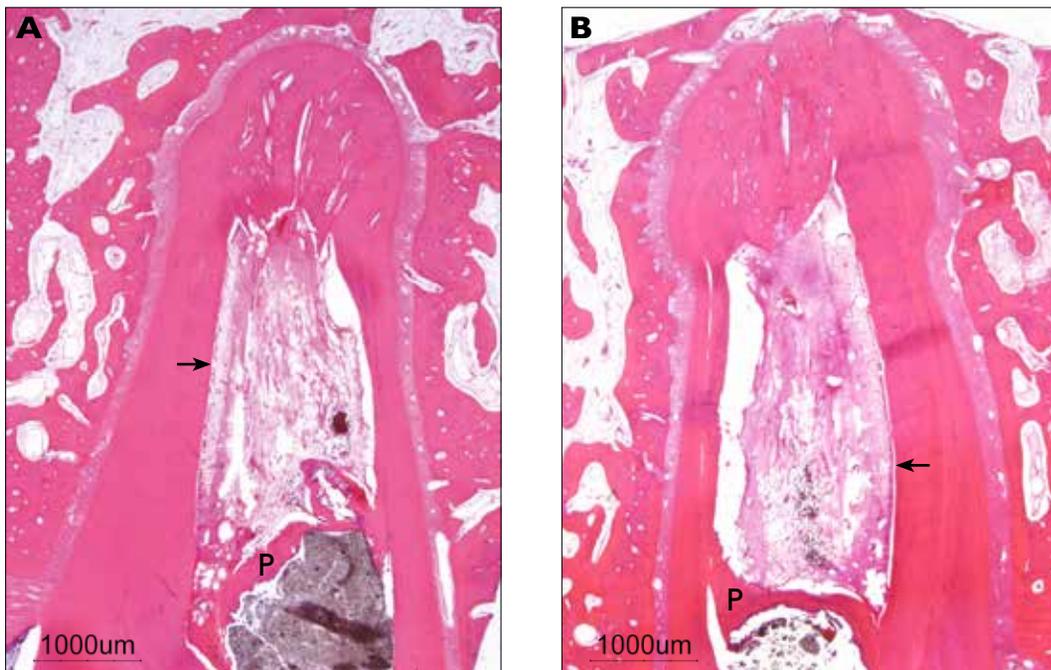


Figura 98. Corte mesiodistal de duas raízes (A) e (B) de um dente do grupo 2, no final do período experimental, sendo visível um ápice fechado e múltiplos *foramina*. É de sublinhar ainda a existência de grandes áreas de tecido conjuntivo laxo, muito vascularizadas, ocupando a cavidade pulpar, subjacente a uma ponte de tecido mineralizado (P), junto ao MTA. É também possível observar a presença de uma extensa camada de células odontoblásticas (seta), revestindo uma grande superfície da parede dentinária. (HE).

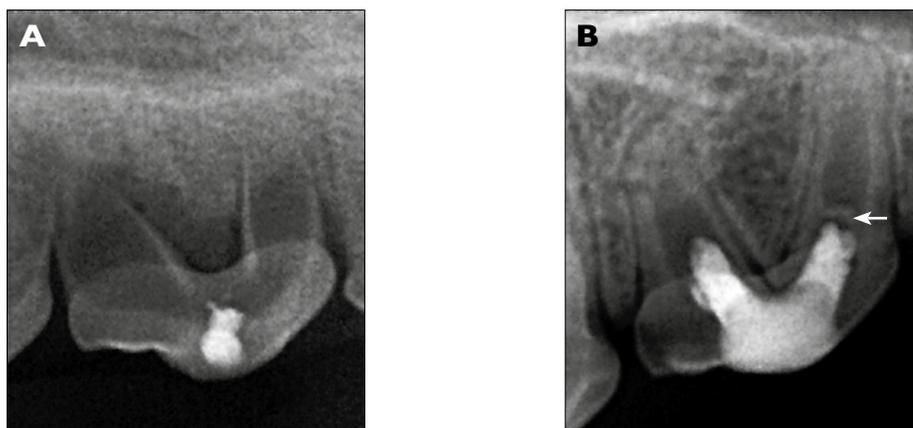


Figura 99. Imagens radiográficas de um dente (3°PM superior, 1° quadrante, animal n° 4). A) Imagem inicial às 3 semanas, mostrando ápice aberto e finas paredes radiculares B) Imagem do mesmo dente no final do período experimental, evidenciando um aumento da espessura das paredes radiculares, encerramento apical e a presença de pontes radiopacas (seta branca) adjacente ao MTA observadas histologicamente nas figuras 100, 104 e 105.

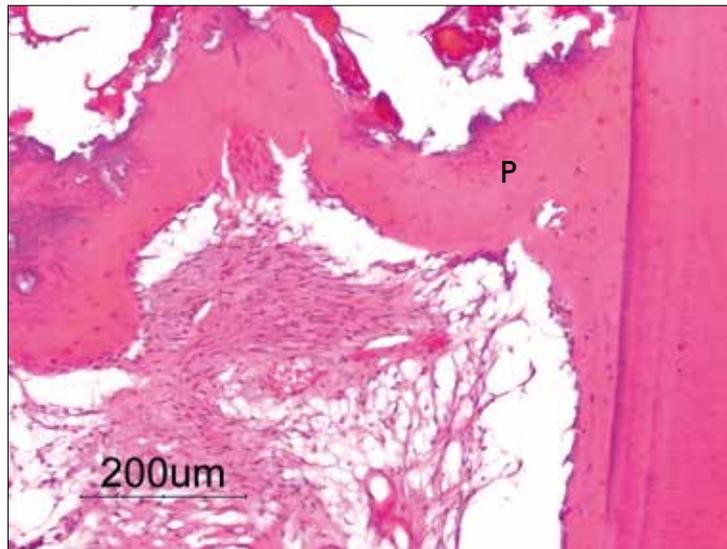


Figura 100. Maior ampliação de uma zona representada na figura 98, mostrando uma ponte (P) completa (subjacente ao MTA) constituída essencialmente por cimento celular, ligando as paredes radiculares. É ainda visível a sua continuidade com o cimento aposicionado à dentina. (HE).

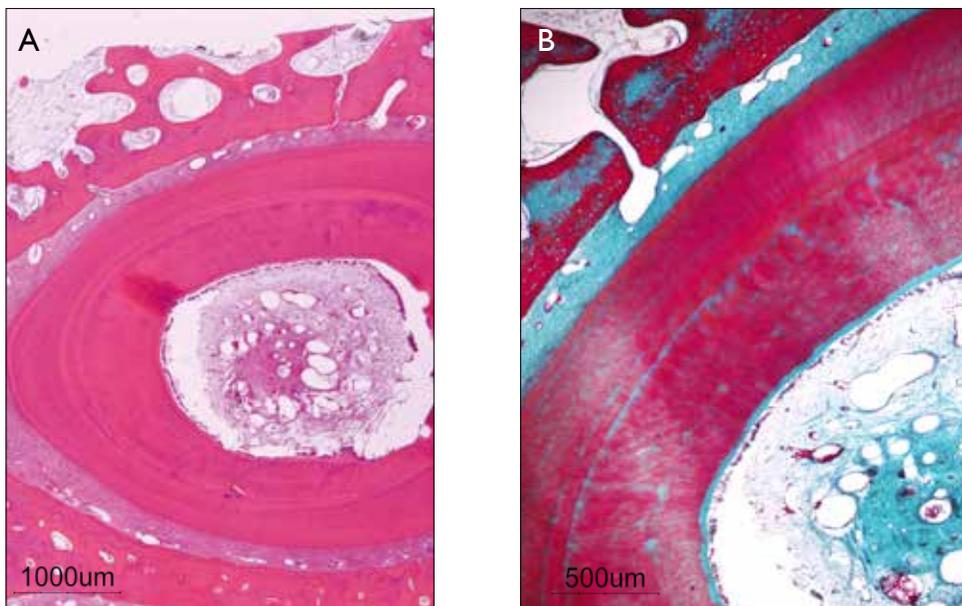


Figura 101. Imagens de uma raiz (2°PM superior, 2° quadrante, animal n° 2) do grupo 2, no final do período experimental, sendo visível a deposição de uma camada adicional de dentina, adjacente a dentina primária e secundária. **A** (HE) e **B** (TM).

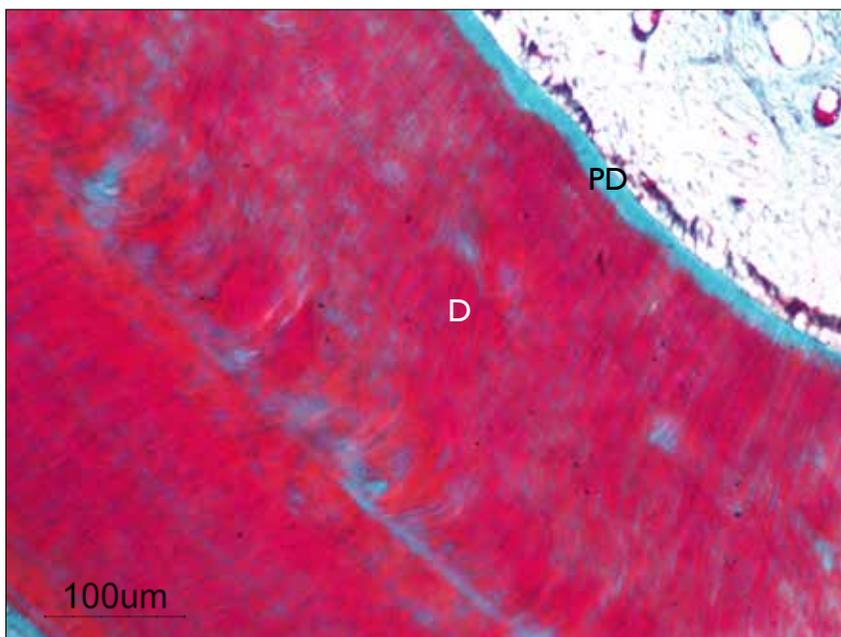


Figura 102. Maior ampliação de uma zona representada na figura 101B, mostrando de uma camada de células odontoblásticas e de pré-dentina (PD), adjacente a uma zona de dentina (D) recém formada. (TM).

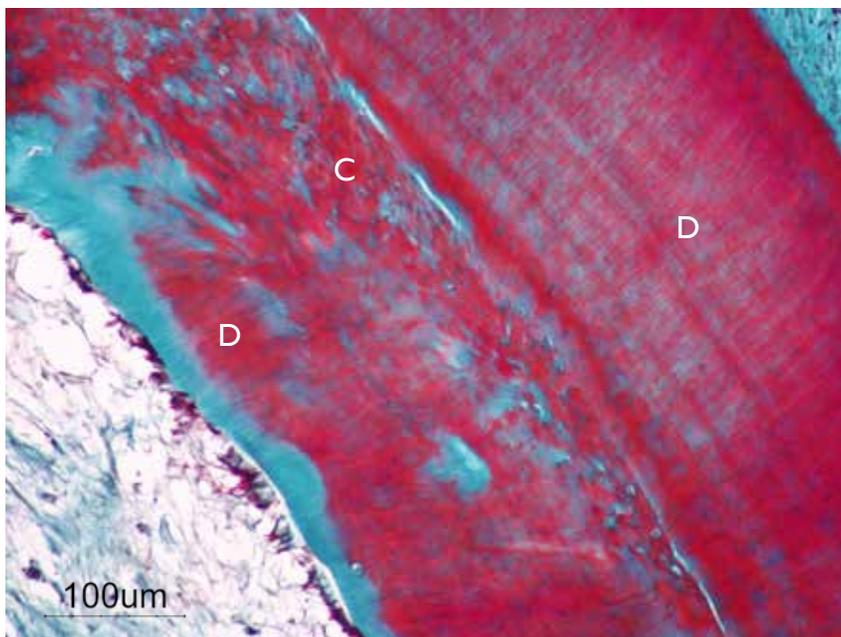


Figura 103. Aspeto da transição entre dentina (D) e cimento (C) observada na parede dentinária oposta à da figura anterior. (TM).

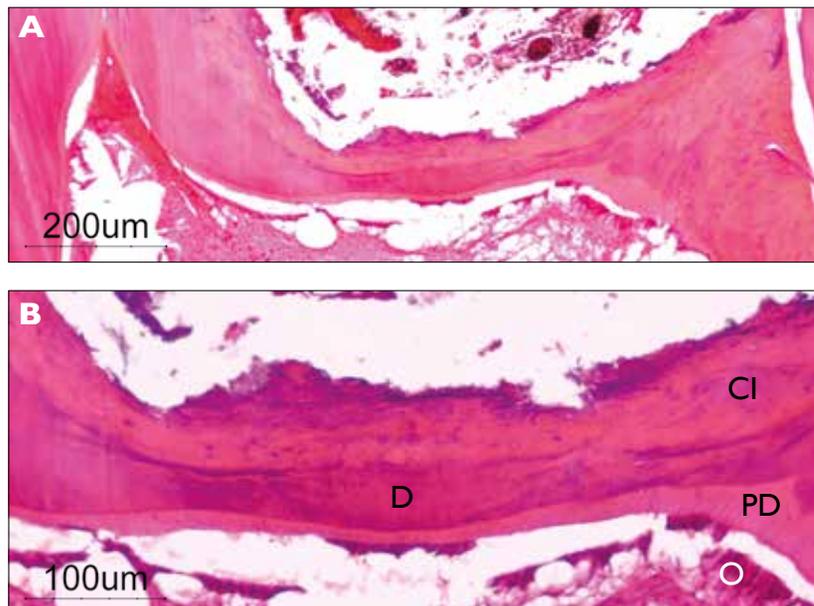


Figura 104. **A)** Presença de uma ponte subjacente ao MTA, ligando a dentina da parede radicular (à esquerda) ao cimento intracanal da parede radicular (à direita). **B)** Maior ampliação de uma zona representada na figura 104A, mostrando com mais pormenor a constituição histológica desta ponte: cimento celular (CI), Dentina (D), pré-dentina (PD) e odontoblastos (O) adjacentes. (HE).

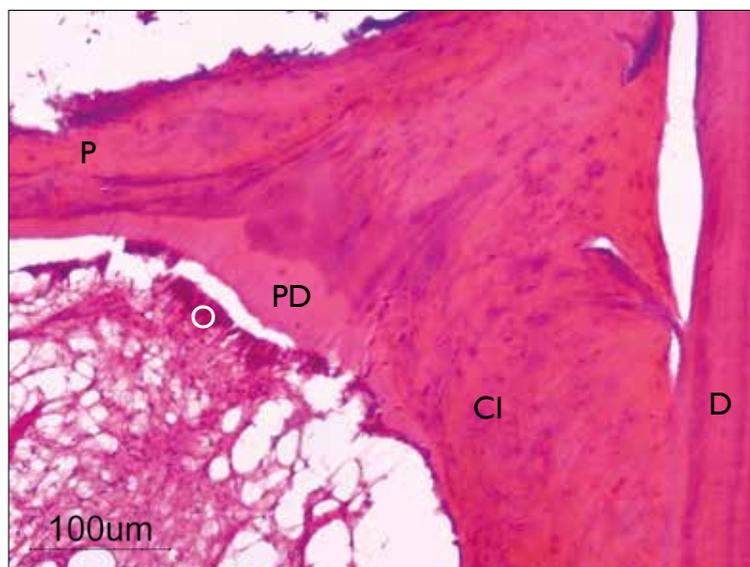


Figura 105. Aspeto de uma área de perfeito contacto e continuidade entre a ponte (P) formada junto ao MTA e o cimento celular (CI) formado em aposição à dentina radicular. É ainda visível na zona de transição uma região constituída por dentina (D), pré-dentina (PD) e odontoblastos(O). (HE).

### 3.3.4.2. Grupo 3 – Hialuronato de sódio/quitosano (N=19)

Este grupo experimental apresenta aspectos básicos comuns ao grupo anterior, mas com menor eficácia e exuberância, revelando algumas particularidades decorrente da aplicação da matriz de hialuronato de sódio/quitosano (HA:CS) utilizada.

As imagens radiográficas correspondentes a este grupo experimental (Figura 106) demonstraram também na grande maioria dos casos, 79% (15 em 19 das raízes), um aumento da espessura das paredes radiculares e resolução das lesões periapicais radiotransparentes em 47% (9 em 19) dos casos. Em termos de encerramento apical apenas 21% das raízes apresentaram encerramento completo, observando-se encerramento parcial em 42 % das situações em estudo.

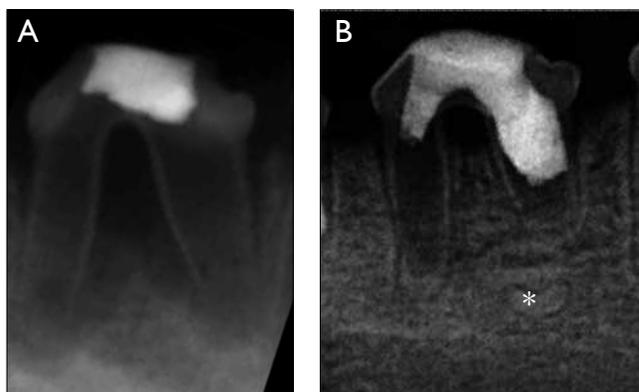


Figura 106. Imagens radiográficas de um dente (3°PM Inferior, 3° quadrante, animal com o n° 2) do grupo 3, mostrando em A) um ápice aberto e lesões periapicais (fase inicial do período experimental). B) Imagem radiográfica do mesmo dente (no final do período experimental) apresentando um encerramento apical. É também visível a presença uma estrutura radiopaca (\*) localizada para apical do ápice da respectiva raiz, correspondendo a uma estrutura histológica mineralizada representada na figura 86.

Nas observações histológicas foi facilmente identificável (Figura 107) a presença de grandes áreas ocupadas pela matriz atrás referida (HA:CS). Foi frequente também encontrar tecidos mineralizados semelhantes a cimento, rodeando as áreas de matriz. Neste âmbito pareceu-nos também interessante apresentar algumas imagens histológicas em paralelo com as imagens radiográficas. Com efeito, a região ocupada por grandes áreas de matriz rodeadas de cimento, visível na figura 107, parece corresponder a uma zona radiograficamente mais opaca observada na figura 108 B.

É de salientar a existência na cavidade pulpar de grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo, muito vascularizado e com um certo grau de hiperemia, apresentando ainda um certo reforço de células inflamatórias, considerado como moderado em 42% dos casos.

Relativamente à formação de novos tecidos mineralizados, temos a considerar a presença de cimento celular em íntima aposição à dentina e ainda em redor de áreas de matriz de HA:CS

(Figura 42 e 43). Foi mesmo possível detectar áreas de contacto e continuidade entre estas duas regiões. Com efeito, tal como a Figura 44 mostra, existe uma perfeita continuidade entre o cimento adjacente à dentina e o cimento que envolve certas zonas da matriz.

É ainda visível no canal radicular a presença de um tecido conjuntivo e restos epiteliais de Malassez com características semelhantes ao ligamento periodontal, verificando-se também uma continuidade com esta estrutura. Relativamente à espessura do ligamento periodontal importa referir um moderado aumento da sua espessura em 47% dos casos.

Foram frequentemente detetadas áreas de tecido mineralizado, com características de tecido ósseo (Figura 45), com intensos processos de remodelação, mostrando muitas zonas de continuidade com as trabéculas ósseas da parede alveolar.

É também impossível deixar de chamar a atenção para a presença de regiões de cimento celular reparando áreas de reabsorção de dentina. Com efeito, como a figura 46 A e B pode demonstrar, é facilmente identificável a presença de áreas de cimento celular ocupando áreas de dentina previamente reabsorvidas. De realçar na figura 46 A, a existência de zonas de reabsorção localizadas tanto na vertente externa como na interna da parede dentinária, reparadas por cimento celular. Nas zonas de reabsorção e posterior reparação parece existir uma melhor interação entre estes dois tecidos não se verificando com tanta frequência, nas lâminas histológicas, a sua separação.

De registar ainda em alguns casos o facto da matriz ocupar grande parte da cavidade pulpar (Figura 47), parecendo impedir a sua revascularização e a formação e manutenção de outros tecidos no espaço canal. Nestas situações (em que a matriz preenche a maioria do espaço canal) pode observar-se a formação de pontes de cimento celular (Figura 24 B e 47) semelhantes, tanto em constituição como em localização, às pontes formadas, aquando dos processos de apexificação com MTA.

Finalmente, algumas imagens de situações (Figuras 48 e 49) em que consideramos verificar-se um encerramento apical completo.

Em síntese, do conjunto de imagens apresentado facilmente se verifica a presença de grandes áreas ocupadas pela matriz (HA:CS), frequentemente rodeadas por cimento celular, bem como grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo bastante vascularizado, mas apresentando um certo reforço inflamatório. Neste contexto importa referir que nos casos em que a matriz ocupou a grande maioria da cavidade pulpar foi possível observar a formação de pontes em tudo semelhantes às verificadas aquando dos processos de apexificação pelo MTA.

Para além da existência de cimento celular em íntima aposição à dentina (com menor espessura do que o grupo anterior), foi possível observar com frequência regiões de cimento celular reparando áreas de reabsorção de dentina, tanto na sua vertente externa como na interna.

De registar também a existência de áreas de tecido ósseo (ainda que em menor quantidade que no grupo 2) e algumas zonas de tecido conjuntivo, com características semelhantes ao ligamento periodontal com restos epiteliais de Malassez.

O encerramento apical completo verificou-se apenas em quatro casos.

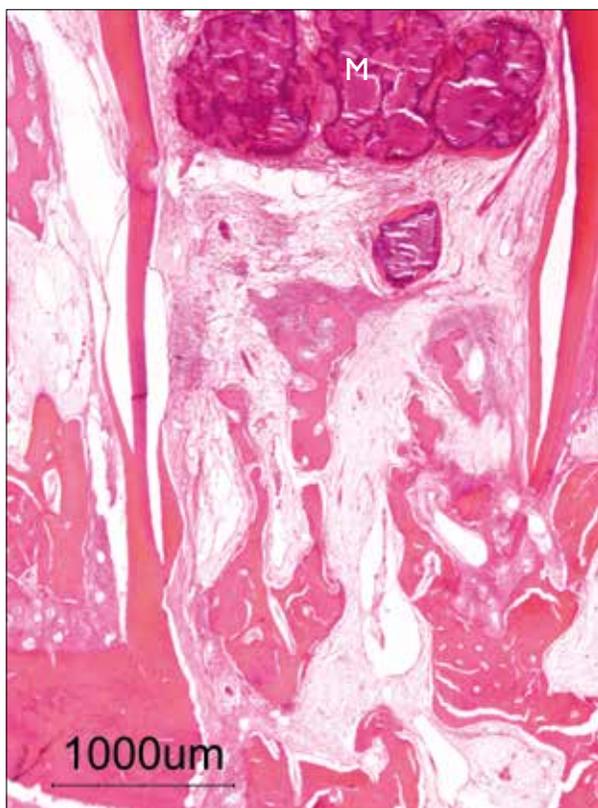


Figura 107. Presença no espaço canal de grandes áreas de matriz de HA:CS (M) frequentemente rodeadas por tecido mineralizado, subjacente ao qual podemos encontrar tecido conjuntivo laxo, muito vascularizado, cimento celular em íntima aposição à dentina e grandes quantidades de tecido ósseo. (HE).

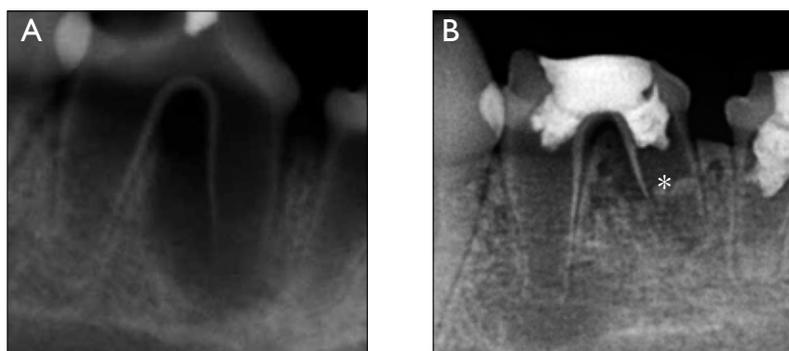


Figura 108. Imagens radiográficas de um dente (4°PM inferior; 4° quadrante, animal com o n°1) do grupo 3, mostrando em A) um ápice aberto e lesão periapical na fase inicial do período experimental. B) Presença de uma área mais radiopaca (\*) na raiz mesial certamente correspondente a uma zona ocupada por matriz rodeada de cimento representada histologicamente na figura 107.

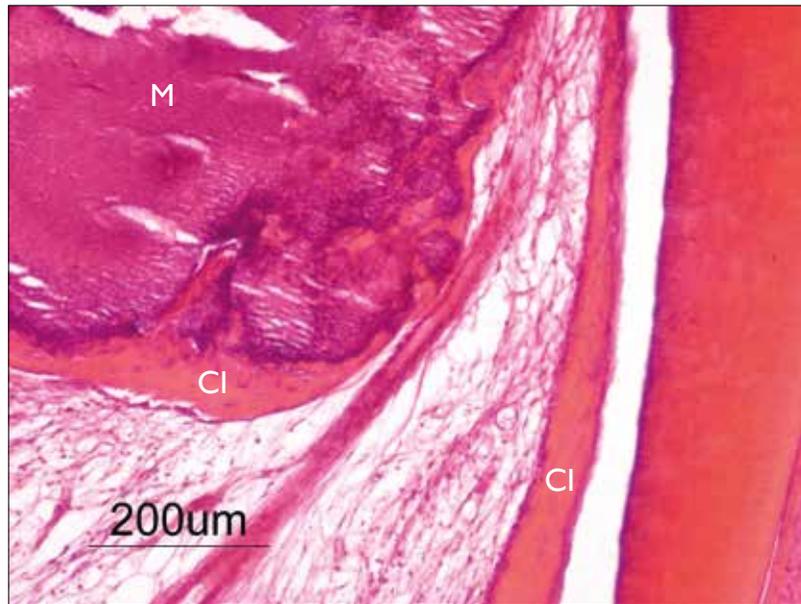


Figura 109 . Presença de zonas de cimento celular (CI) que rodeando uma grande área de matriz de HA:CS (M) que em aposição à dentina. É também visível na cavidade pulpar a existência de tecido conjuntivo laxo vascularizado. (HE).

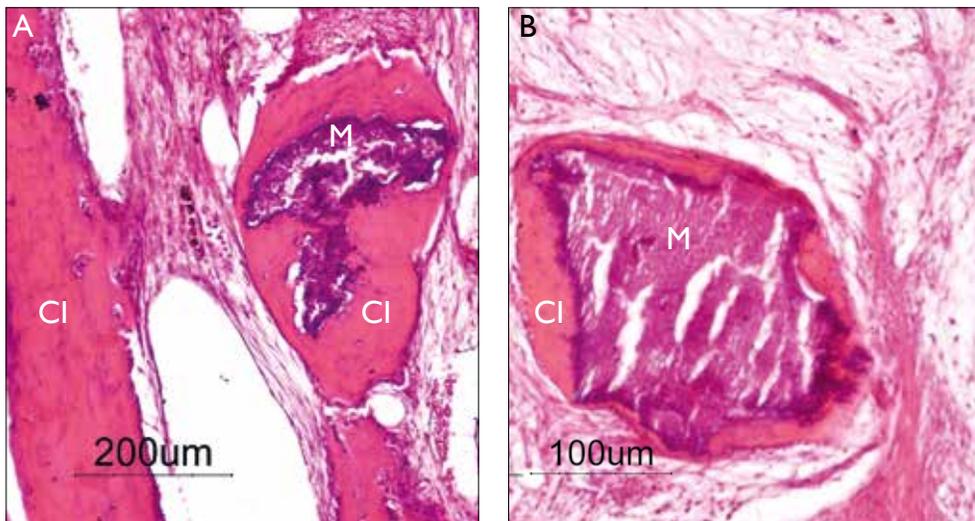


Figura 110. Existência de pequenas áreas de matriz de HA:CS (M) dispersas no lúmen do canal rodeadas por cimento celular (CI). (HE).

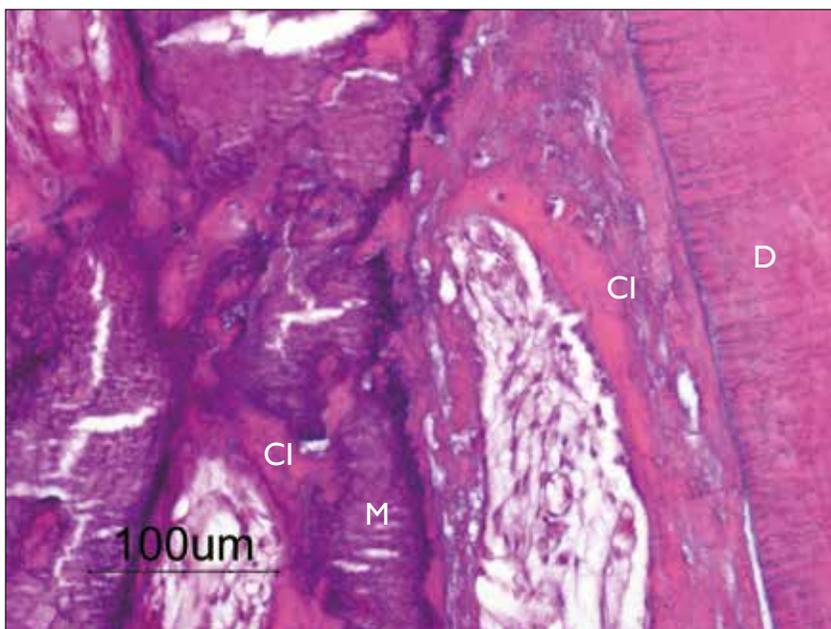


Figura 111. Aspeto histológico de uma área de continuidade entre o cimento (CI) adjacente à dentina (D) e o cimento que envolve certas zonas da matriz de HA:CS (M). (HE).

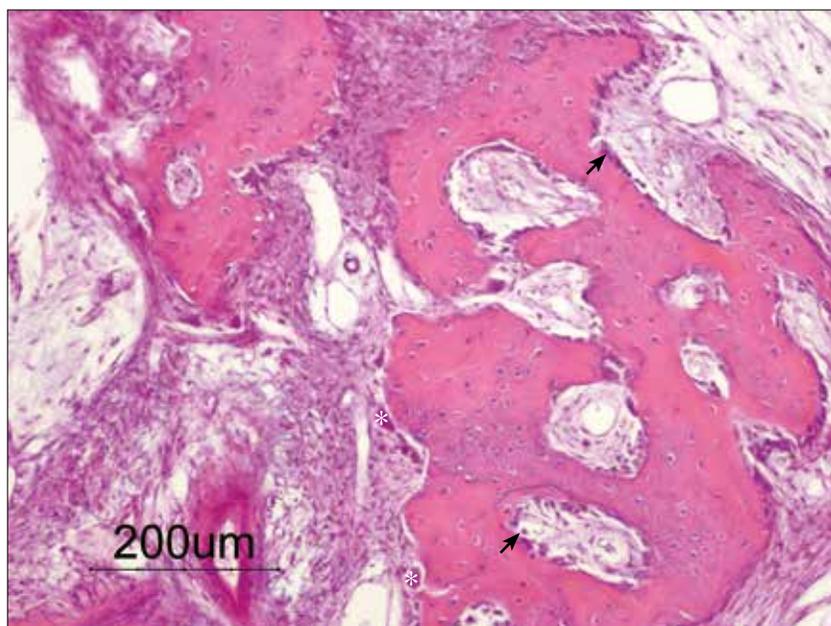


Figura 112. Presença de trabéculas de tecido ósseo, no lúmen da cavidade pulpar, com intensos e visíveis processos de remodelação óssea, caracterizados por uma reabsorção osteoclástica (\*) e formação osteoblástica (seta). (HE)

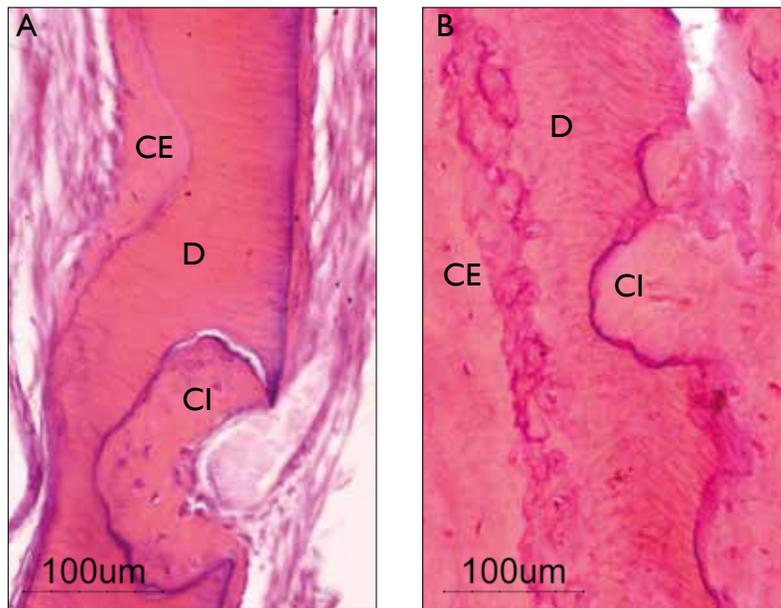


Figura 113. Presença de áreas de cimento celular reparando zonas de reabsorção dentinária: **A**) localizadas tanto na vertente externa (CE) como na interna (CI) da parede dentinária, **B**) situadas apenas na face interna da parede dentinária. Cimento periodontal (CE), dentina (D), cimento intracanal (CI). (HE).

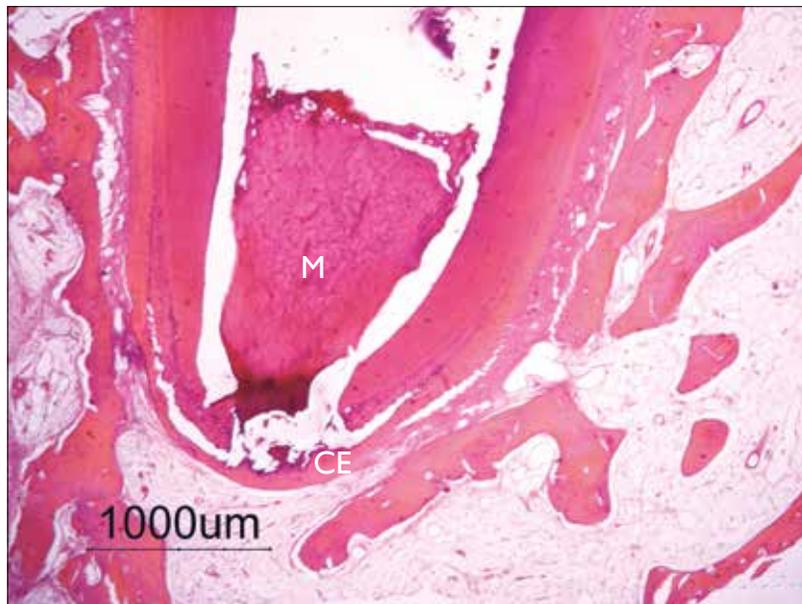


Figura 114. Imagem de uma raiz do grupo 3 mostrando um encerramento apical completo mas com a presença de matriz (M) ocupando grande parte da cavidade pulpar e ausência de formação de novos tecidos no seu interior. De notar, ainda, a existência de uma camada de cimento celular (CE) rodeando por completo o ápice. (HE).

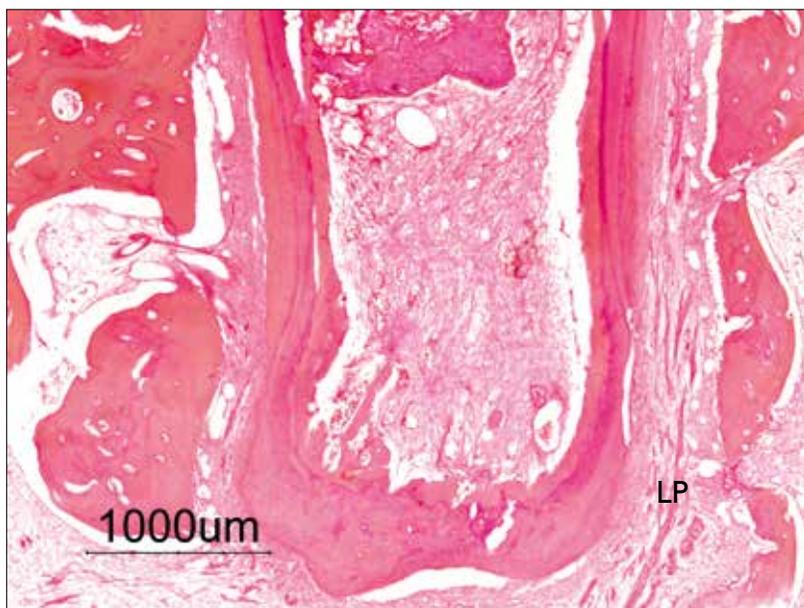


Figura 115. Imagem de uma raiz do grupo 3 mostrando um encerramento apical completo. É de notar na cavidade pulpar a existência de grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo, muito vascularizado, com um certo reforço de infiltrado inflamatório. É também visível um aumento da espessura do ligamento periodontal (LP). (HE).

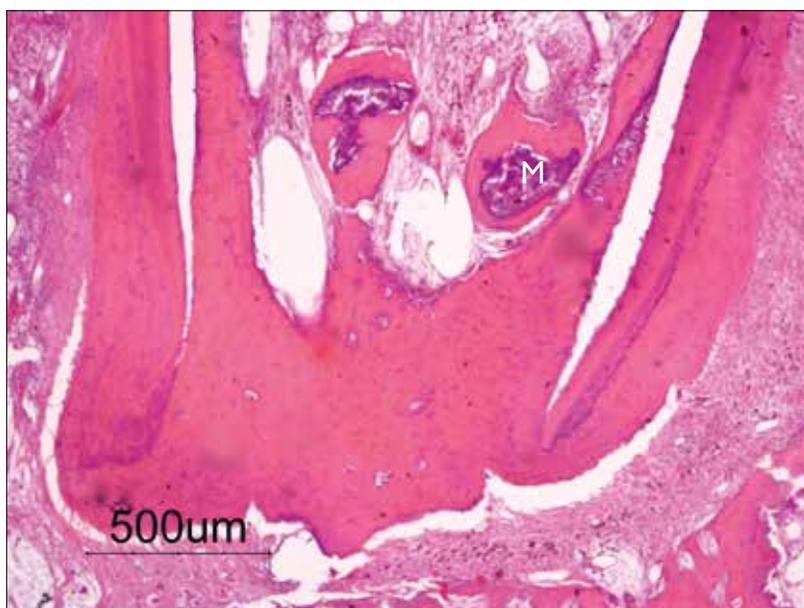


Figura 116. Aspeto de uma raiz do grupo 3 apresentando um encerramento apical completo e presença de cimento celular localizado na face interna da dentina, bem como rodeando pequenas áreas de matriz de HA:CS (M). De notar, algumas zonas de continuidade entre as diferentes localizações deste tecido. (HE).

### 3.3.4.3. Grupo 4 – Pectina/quitosano (n=19)

Este grupo com aspetos semelhantes aos já descritos, revelou também algumas particularidades decorrentes (Figura 117), certamente, da presença da matriz de pectina/quitosano (P:CS).

As imagens radiográficas correspondentes a este grupo experimental demonstraram também na grande maioria dos casos, 79% (15 em 19,) um aumento da espessura das paredes radiculares. Foi ainda possível identificar em 58% das raízes (11 em 19) a resolução das lesões periapicais radiotransparentes, no final do período experimental. O encerramento apical completo verificou-se em 37% dos casos, observando-se um encerramento parcial também em 37 % das raízes e ausência nas restantes.

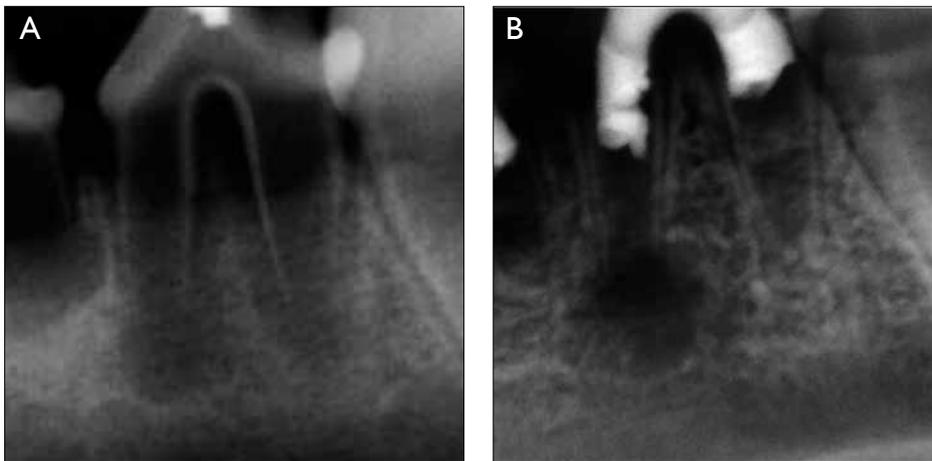


Figura 117. Imagens radiográficas de um dente (4°PM inferior, 3° quadrante, animal com o n° 4) do grupo 4. A) Ápice aberto e lesão periapical observado na fase inicial do período experimental. B) Imagem do mesmo dente no final do período experimental mostrando a persistência de uma zona radiotransparente, correspondente a uma lesão periapical crónica, na raiz mesial e um encerramento apical completo na raiz distal.

Nas lâminas histológicas foi também facilmente identificável a presença no espaço canal de grandes áreas ocupadas por matriz de P:CS (Figuras 118 e 119), estando no entanto escassamente rodeadas por tecidos mineralizados. De facto, só muito raramente se consegue observar a existência de tecido mineralizado adjacente às áreas de matriz (P:CS) e quando presente (Figura 119) mostra uma pequena espessura.

Na cavidade pulpar é visível a existência de grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo, rico em vasos e nervos (Figura 125) e com raras zonas de infiltrado inflamatório.

Relativamente à formação de novos tecidos mineralizados temos a considerar a presença, em 15 dos 19 casos estudados, de grandes áreas de cimento celular em íntima aposição à face interna da dentina. Também na figura 118 facilmente se identifica a existência de zonas de cimento celular formadas em aposição à dentina (face interna), particularmente evidentes na porção apical.

Nas figuras 120 e 122 é possível observar a existência de uma grande área de dentina terciária, caracterizada pela presença de menor número de túbulos, com maior desorganização, fazendo protrusão para a cavidade pulpar. Esta dentina terciária apresenta uma perfeita continuidade (Figuras 123 e 124) com a camada de cimento celular intracanal anteriormente referida. De notar que, no lado oposto e ao mesmo nível, a parede dentinária encontra-se revestida por cimento celular intracanal, vindo desde a zona apical.

Foram também detetadas áreas de tecido ósseo (Figuras 118B, 120) mas com muito menor frequência e em menor quantidade do que em qualquer um dos grupos anteriores tratados com matrizes.

Em relação ao encerramento apical, a frequência de encerramento total e parcial não foi significativamente diferente dos demais grupos. Neste âmbito e do mesmo modo que no grupo 3, foi possível observar também a formação de pontes de cimento celular (Figura 85 C) muito semelhantes, às pontes formadas aquando dos processos de apexificação com MTA.

Por último importa referir, também neste grupo, a existência de estruturas mineralizadas, circundadas por ligamento periodontal (Figuras 126 e 127) situadas a uma certa distância, das raízes dentárias correspondentes. Estas formações são essencialmente constituídas por cimento celular e dentina, mostrando uma composição em tudo idêntica as paredes da região apical de qualquer raiz, incluindo a presença de *foramina*.

Em síntese, do conjunto de imagens há a assinalar a existência no espaço canal de grandes áreas ocupadas por matriz de P:CS, embora escassamente rodeadas por tecido mineralizado.

Na cavidade pulpar encontramos grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo, muito vascularizado e com raras zonas de infiltrado inflamatório, para além de áreas de cimento celular em aposição à face interna da dentina.

Foi possível identificar, também, a existência de pontes de cimento celular semelhantes, tanto em constituição como em localização, às pontes formadas pelo MTA, aquando dos processos de apexificação, situação que se verificou apenas quando a matriz preencheu a quase totalidade do espaço canal.

As áreas ocupadas por tecido ósseo, foram detetadas com muito menor frequência e quantidade do que nos grupos 2 e 3.

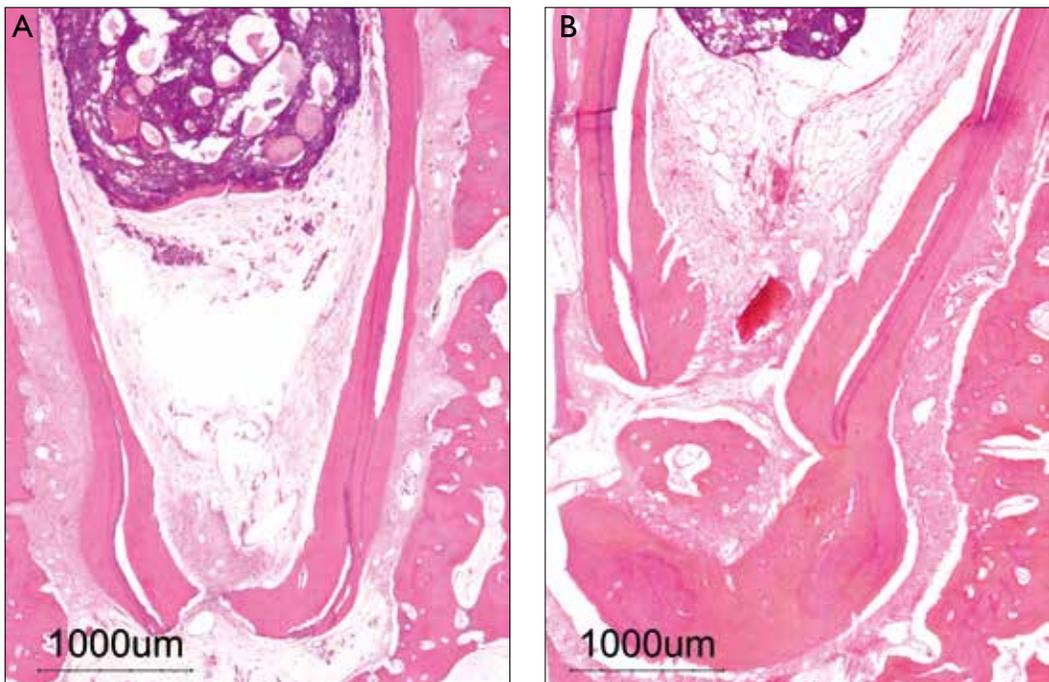


Figura 118. Aspetto de uma raiz do grupo 4, mostrando em A) áreas de matriz residual, grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado e zonas de cimento formadas em aposição à dentina. B) Imagem semelhante a anterior (mas correspondente a outra raiz) sendo mais visível a localização dos tecidos mineralizados, presentes no lúmen, na parede e no ápice radicular. (HE) .

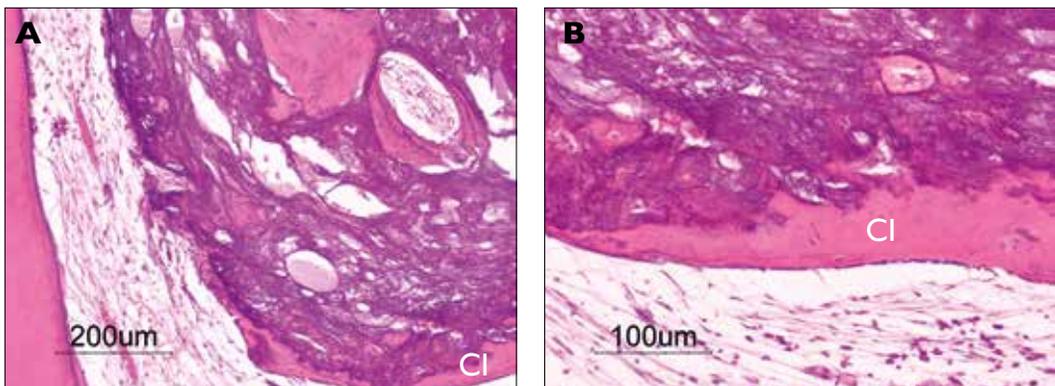


Figura 119. Maiores ampliações de zonas representadas na figura 118A, pondo em evidência a reduzida quantidade de cimento adjacente às áreas de matriz de P:CS. (HE) .

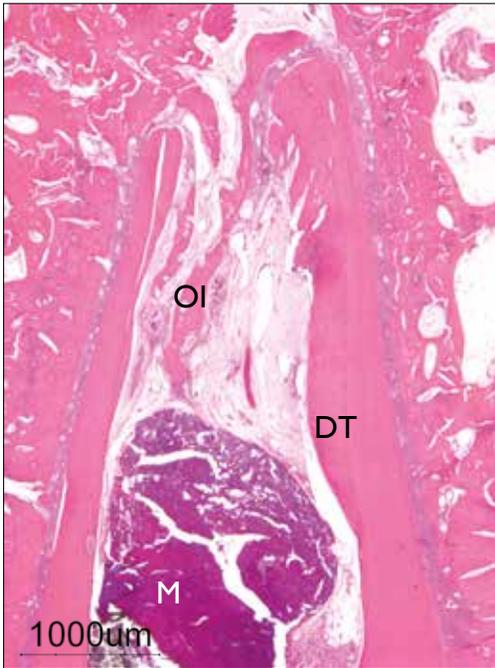
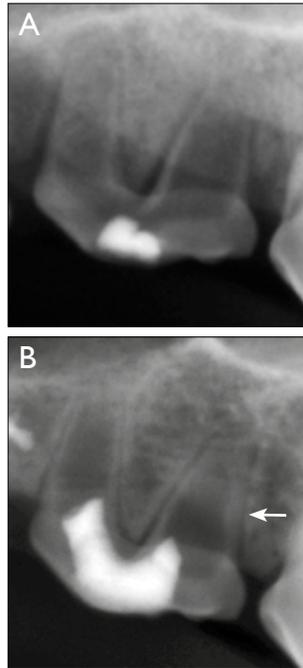


Figura 120. Corte proximal da raiz distal do 3ºPM superior (2º quadrante, animal com o nº 3) do grupo 4 (no final do período experimental) pondo em evidência no espaço canal, uma grande área de matriz de P:CS (M), junto ao MTA, bem como tecido conjuntivo laxo e algumas regiões de tecido ósseo (OI). É ainda possível observar (DT) a presença de uma grande área de dentina terciária, fazendo protrusão



para a cavidade pulpar. (HE).

Figura 121. Imagens radiográficas do mesmo dente representado na figura 120. A) Aspecto inicial às 3 semanas, mostrando ápice aberto e finas paredes radiculares. B) Imagem no final do período experimental, evidenciando aumento da espessura das paredes radiculares (seta).

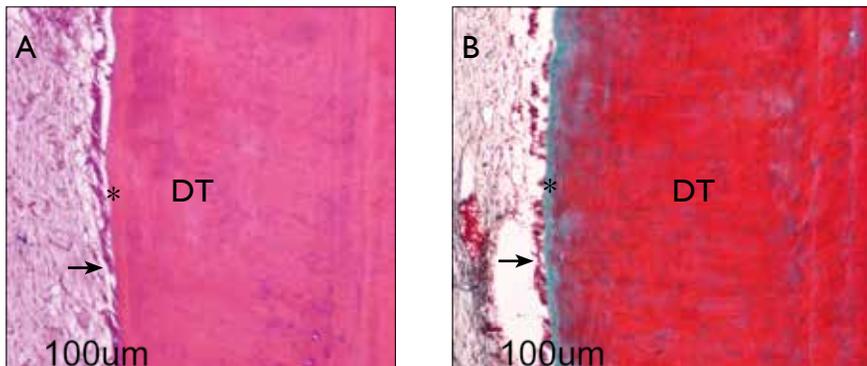


Figura 122. Maior ampliação de uma zona representada na figura 120 mostrando a constituição histológica da dentina terciária (DT), de uma área de pré-dentina (\*) e da camada odontoblástica (seta) adjacente. A) HE e B) TM.

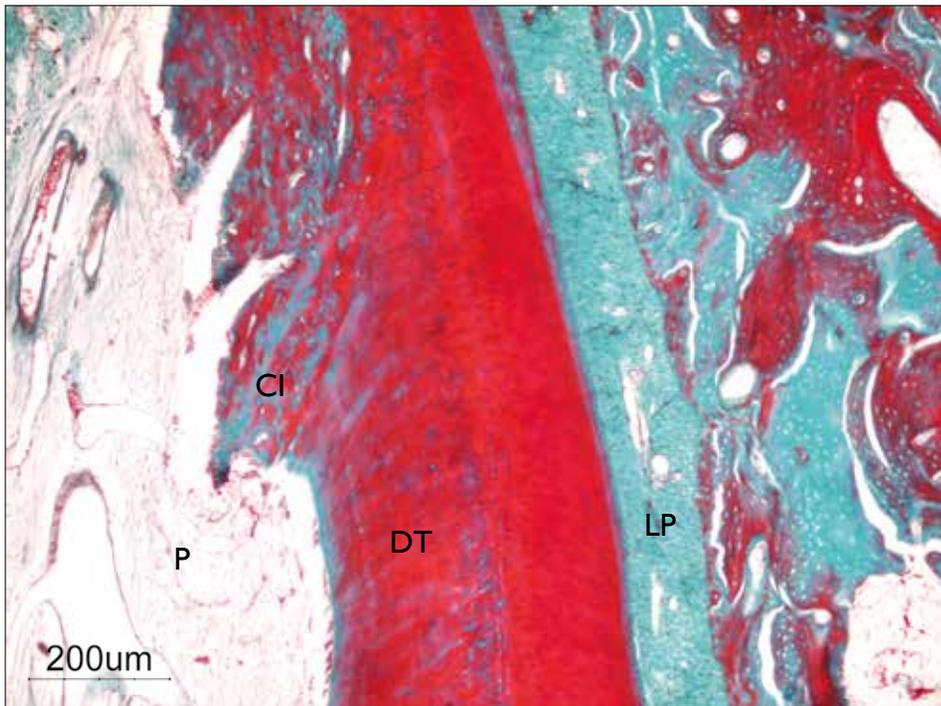


Figura 123. Continuidade e justaposição da camada de dentina terciária (DT) com o cimento celular intracanalhar (CI), localizado na zona apical. Cavidade pulpar (P) e ligamento periodontal (LP). (TM).

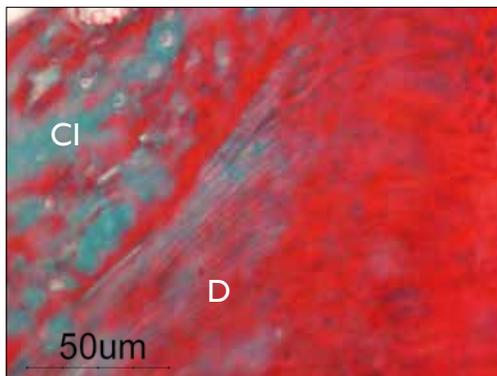


Figura 124. Maior ampliação de uma zona representada na figura anterior, mostrando com mais pormenor o cimento intracanalhar (CI) e dentina (D). (TM).

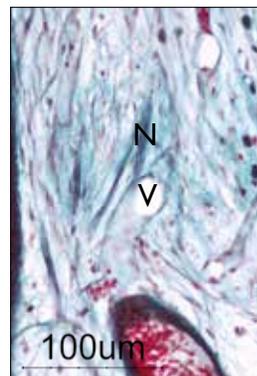


Figura 125. Maiores ampliações de zonas representadas na figura 120 mostrando a presença de estruturas nervosas (N) e vasculares (V) na porção mais coronal da cavidade pulpar. (TM).

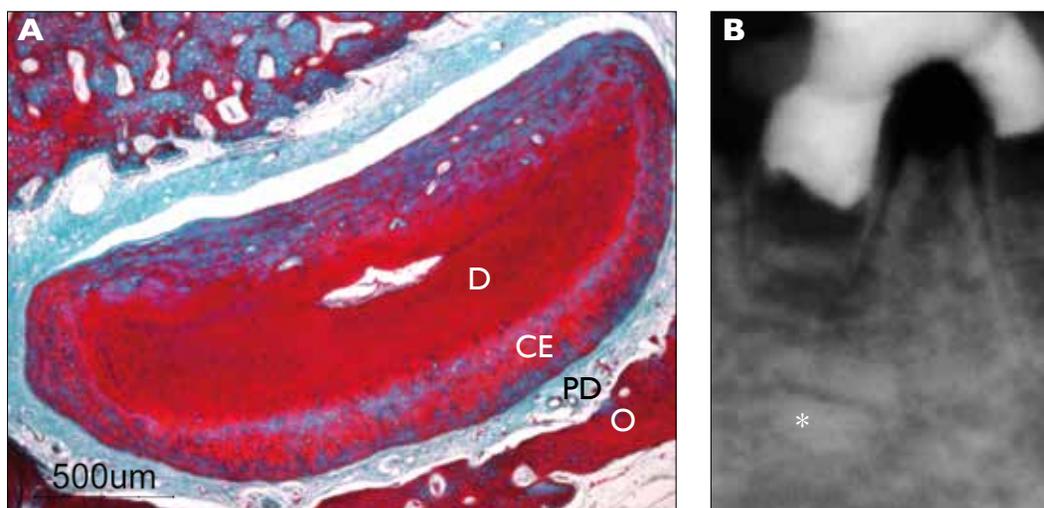


Figura 126. Aspeto de uma formação constituída por cimento celular (CE) e dentina(D), circundada por ligamento periodontal (LP) e osso alveolar (O), localizada para apical da raiz distal do 3°PM inferior direito do grupo 4. **A)** Imagem histológica, (TM). **B)** Imagem de radiológica (\*).

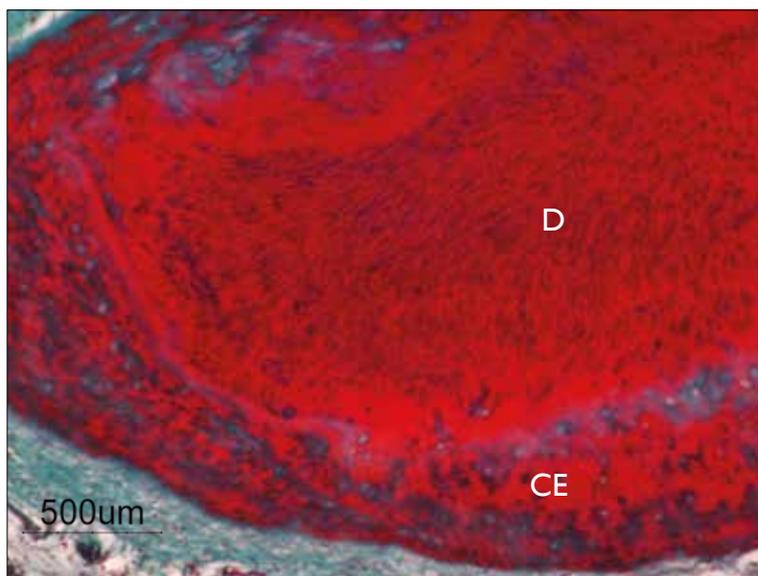


Figura 127. Maiores ampliações de zonas representadas na figura 126A pondo em evidência a sua constituição histológica: cimento celular (CE) e dentina (D). (TM).

### 3.4. Análise estatística univariada

#### 3.4.1. Avaliação radiológica

A análise radiográfica permitiu demonstrar (Tabela 6), na maioria dos casos pertencentes aos quatro grupos experimentais (1 a 4), uma diminuição e/ou resolução da radiotransparência periapical, um aumento da espessura das raízes e encerramento apical.

##### 3.4.1.1. Resolução de lesões periapicais radiotransparentes

Após o período experimental, 69,3 % das raízes dos quatro grupos experimentais não apresentavam evidência radiográfica de lesão periapical. De referir que 18,7% das restantes raízes mostravam sinais radiográficos de melhoria, ou seja redução do tamanho da lesão inicial. Relativamente a esta variável, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 11,768$ ;  $p=0,008$ ) entre os grupos 1 a 4. As diferenças foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U, sendo significativas entre os grupos 1 e 3 ( $p=0,002$ ), 1 e 4 ( $p=0,009$ ), assim como entre o grupo 2 e 3 ( $p=0,044$ ).

O grupo que apresentou melhor desempenho para esta variável foi o 1, sendo por ordem decrescente seguido dos grupos 2, 4 e 3 (ver tabela 6 e gráfico 1).

Tabela 6. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação à lesão periapical radiotransparente.

Lesão periapical radiotransparente	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	17 (94,4%)	15 (78,9%)	9 (47,4%)	11 (57,9%)	52 (69,3%)
Diminuição (1)	1 (5,6%)	3 (15,8%)	6 (31,6%)	4 (21,1%)	14 (18,7%)
Manutenção (2)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (10,5%)	3 (15,8%)	5 (6,7%)
Aumento (3)	0 (0,0%)	1 (5,3%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)	4 (5,3%)

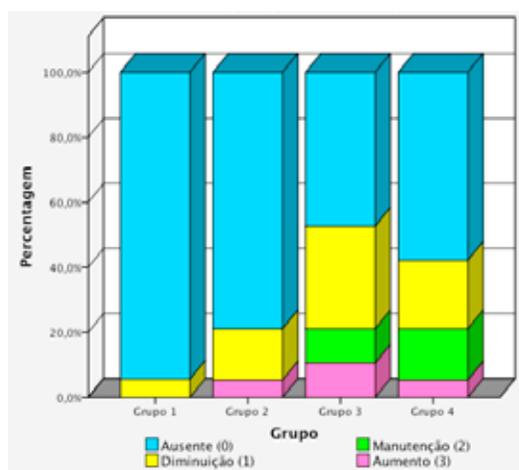


Gráfico 1. Lesão periapical radiotransparente.

### 3.4.1.2. Aumento da espessura das paredes radiculares

Da avaliação dos quatro grupos experimentais, ficou evidente que 77,3% das raízes mostravam radiograficamente, um aumento da espessura das paredes radiculares, não se registando diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 0,200$  ;  $p=0,978$ ) entre grupos (1 a 4), relativamente a esta variável (ver tabela 7 e gráfico 2).

Tabela 7. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação ao aumento da espessura das paredes radiculares.

Novos tecidos mineralizados	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	4 (22,2%)	5 (26,3%)	4 (21,1%)	4 (21,1%)	17 (22,7%)
Presente (1)	14 (77,8%)	14 (73,7%)	15 (78,9%)	15 (78,9%)	58 (77,3%)

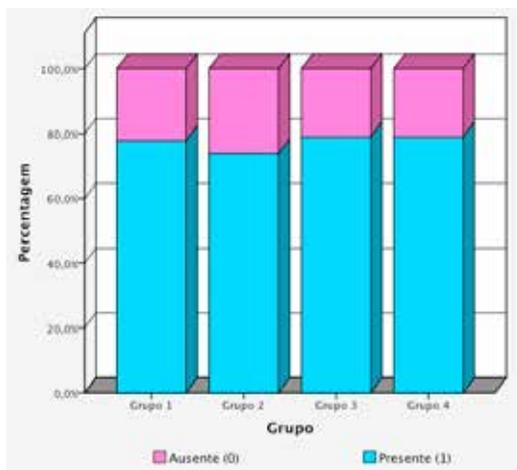


Gráfico 2. Aumento da espessura das paredes radiculares.

### 3.4.1.3. Encerramento apical radiográfico

Globalmente, 32% das raízes, dos grupos experimentais, mostraram evidência radiográfica de encerramento apical completo (ver tabela 8 e gráfico 3). No entanto, na comparação entre grupos (1 a 4) para esta variável, não existiram diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 0,200$  ;  $p=0,978$ ).

Tabela 8. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação ao encerramento apical.

Encerramento Apical	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	6 (33,3%)	5 (26,3%)	7 (36,8%)	5 (26,3%)	23 (30,7%)
Parcial (1)	7 (38,9%)	6 (31,6%)	8 (42,1%)	7 (36,8%)	28 (37,3%)
Completo (2)	5 (27,8%)	8 (42,1%)	4 (21,1%)	7 (36,8%)	24 (32,0%)

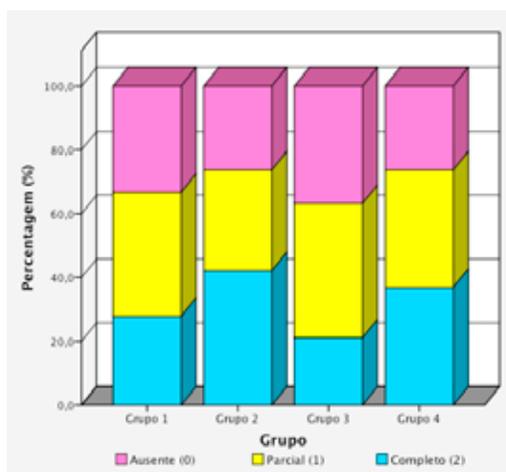


Gráfico 3. Encerramento apical.

### 3.4.2. Histomorfometria

#### 3.4.2.1. Preenchimento canalar

Por preenchimento canalar considera-se o espaço ocupado por quaisquer tecidos (tecidos conjuntivos mineralizados e tecidos conjuntivos não mineralizados) presentes na cavidade pulpar disponível (aproximadamente os 4 mm apicais).

Nos grupos experimentais (1 a 4) a presença tecidos vitais no interior da cavidade pulpar foi de 66,7% (em 50 dos 75 casos).

Como se pode verificar na tabela 9 e no gráfico 4, o grupo 2 apresentou em cerca de 52,6% dos casos um preenchimento total da cavidade pulpar disponível. Pela negativa destacou-se o grupo 1.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{\text{KW}}(3) = 37,009$ ;  $p < 0,001$ ) entre os vários grupos. As diferenças foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U, verificando-se significância estatística entre todos os grupos experimentais, ou seja, entre 1 e 2 ( $p < 0,001$ ), 1 e 3 ( $p = 0,001$ ), 1 e 4 ( $p < 0,001$ ), grupo 2 e 3 ( $p = 0,010$ ), 2 e 4 ( $p = 0,014$ ), e 3 e 4 ( $p = 0,012$ ).

Tabela 9. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação ao preenchimento canalar.

Preenchimento canalar	Grupos				N° total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	16 (89,9%)	1 (5,3%)	6 (31,6%)	2 (10,5%)	25 (33,3%)
Ligeiro (1)	1 (5,6%)	4 (21,1%)	12 (63,2%)	10 (52,6%)	27 (36,0%)
Parcial (2)	0 (0%)	4 (21,1%)	1 (5,3%)	4 (21,1%)	9 (12,0%)
Total (3)	1 (5,6%)	10 (52,6%)	0 (0%)	3 (15,8%)	14 (18,7%)

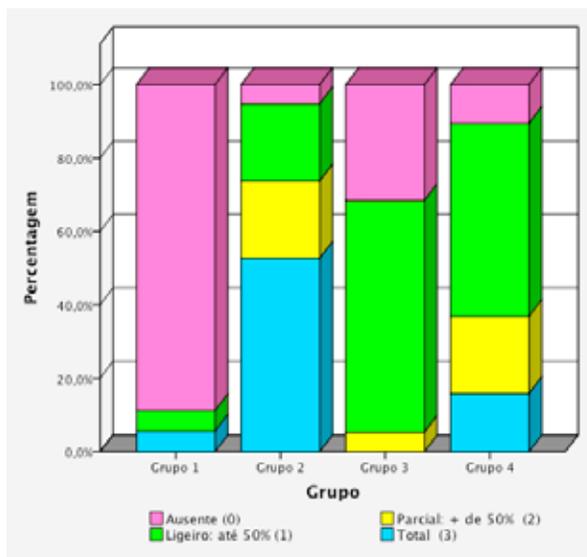


Gráfico 4. Preenchimento canal

### 3.4.2.2. Vascularização

De acordo com a tabela 10 e gráfico 5, o grupo 2 destaca-se mais uma vez pela positiva, apresentando maior porcentagem de casos com uma vascularização normal (78,9%) na cavidade pulpar. O grupo 3 apresenta maior porcentagem de hiperémia (57,9%). O grupo 1 destaca-se pela quase ausência de vascularização.

Existem diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 32,961$  ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 2 a 4, relativamente a esta variável. As diferenças encontradas pelo teste de Mann-Whitney U verificaram-se entre o grupo 1 e os restantes grupos experimentais ( $p < 0,001$ ), observando-se ainda, entre o grupo 2 e 3 ( $p < 0,001$ ) e grupos 2 e 4 ( $p = 0,019$ ). Por outro lado, estas diferenças não apresentavam significância entre o grupo 3 e 4 ( $p = 0,092$ ).

Tabela 10. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação à vascularização.

Vascularização	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	16 (88,9%)	1 (5,3%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)	28 (37,3%)
Presente com hiperémia (1)	1 (5,6%)	3 (15,8%)	11 (57,9%)	5 (26,3%)	20 (26,7%)
Presente normal (2)	1 (5,6%)	15 (78,9%)	2 (10,5%)	9 (47,4%)	27 (36,0%)

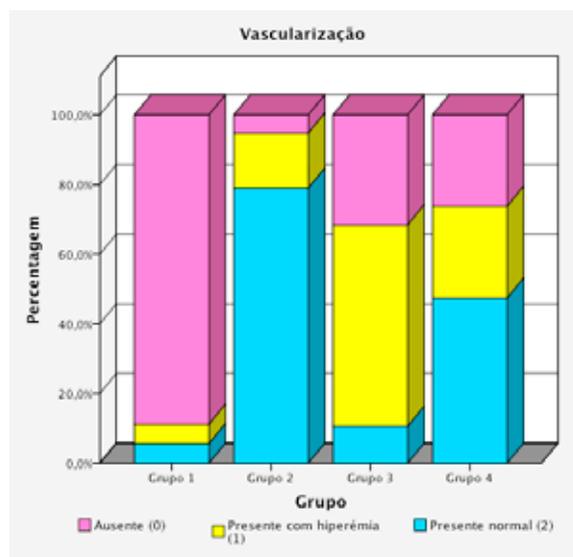


Gráfico 5. Vascularização.

### 3.4.2.3. Tecidos mineralizados presentes na cavidade canalar

A presença de tecidos mineralizados na cavidade canalar está representada na tabela II e gráfico 6.

O grupo 2 apresentou o melhor desempenho para esta variável e o grupo 1 o pior. Assim, para os grupos 1 a 4, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 27,362$ ;  $p < 0,001$ ), relativamente a esta variável. As diferenças foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U, verificando-se significância estatística entre o grupo 1 e 2 ( $p < 0,001$ ), 1 e 3 ( $p < 0,001$ ), 1 e 4 ( $p < 0,001$ ) e grupo 2 e 3 ( $p = 0,013$ ).

Tabela II. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação a presença de tecidos mineralizados formados na cavidade pulpar.

Tecidos mineralizado presentes na cavidade canalar	Grupos				N° total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	16 (88,9%)	2 (10,5%)	9 (47,4%)	4 (21,1%)	31 (41,3%)
Presente (1)	2 (11,1%)	17 (89,5%)	10 (52,6%)	15 (78,9%)	44 (58,7%)

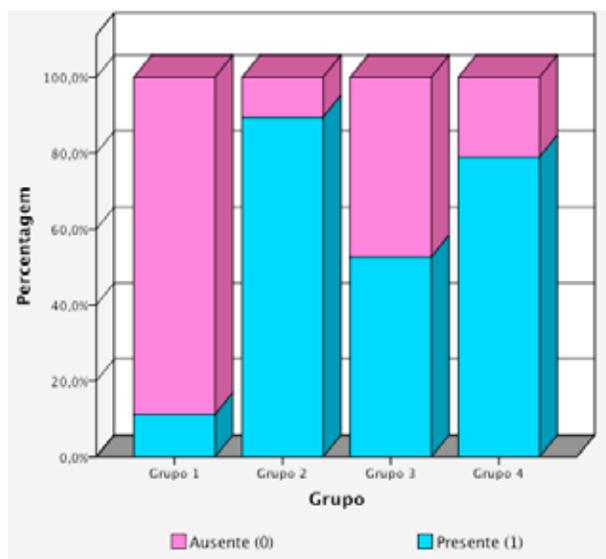


Gráfico 6. Presença de tecidos mineralizados no interior do canal.

#### 3.4.2.4. Quantificação dos tecidos mineralizados e da matriz no canal radicular

Dado que o interior dos canais radiculares correspondente ao grupo 1 estava praticamente preenchido por MTA, nos 4 mm apicais, este (grupo 1) não foi por este motivo incluído nestas análises.

Deste modo, apenas foi efetuada a quantificação das áreas ocupadas pelos tecidos mineralizados e pela matriz residual presentes na cavidade pulpar dos grupos grupo 2, 3, e 4.

#### **Tecidos mineralizados presentes no lúmen do canal (%)**

Os tecidos mineralizados dispersos no interior do canal são essencialmente constituídos por trabéculas de tecido ósseo, que designámos por ilhéus ósseos (IO).

O grupo 4 apresentou valores percentuais inferiores aos outros dois grupos, sendo o grupo 2 o que apresentou os melhores resultados referentes a esta variável (ver tabela 12 e gráfico 7).

Relativamente a este parâmetro existem diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(2)=9,114$ ;  $p=0,010$ ) entre os grupos 2 a 4. As diferenças entre os vários grupos com matrizes foram analisadas recorrendo ao teste de Mann-Whitney U, tendo-se verificado diferenças entre os grupos 2 e 4 ( $p=0,006$ ) e grupos 3 e 4 ( $p=0,025$ ).

#### **Tecido mineralizados adjacentes à dentina (%)**

Os tecidos mineralizados formados por aposição à dentina (TMAD) são essencialmente constituídos por cimento celular, que denominamos como cimento intracanal (CI).

O grupo que apresentou melhor desempenho para esta variável foi, mais uma vez, o grupo 2 sendo pior o grupo 3 (ver tabela 12 e gráfico 7).

De referir que relativamente a esta variável existem diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(2) = 21,422$  ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 2 a 4. As diferenças encontradas pelo teste de Mann-Whitney U verificaram-se entre os grupos 2 e 3 ( $p < 0,001$ ), grupos 2 e 4 ( $p = 0,019$ ) e grupos 3 e 4 ( $p = 0,013$ ).

### **Total de tecidos mineralizados formados no interior canal (%)**

A quantificação total do tecido mineralizado (%) recém formado (TM) na área do canal foi efetuada através do somatório das percentagens das áreas de tecidos mineralizados aposicionados à face interna da dentina (TMAD/CI) com as áreas ocupadas pelos tecidos mineralizados dispersos no lúmen do canal (IO).

Foi novamente no grupo 2 que obtivemos os melhores resultados relativamente a este parâmetro (ver tabela 12 e gráfico 7).

Relativamente a esta variável, existem diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(2) = 24,146$  ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 2, 3 e 4. As diferenças foram estatisticamente significativas entre o grupo 2 e o grupo 3 ( $p < 0,001$ ) e entre o grupo 2 e 4 ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, não houve diferença estatística entre o grupo 3 e o 4 ( $p = 0,085$ ).

### **Matriz (%)**

Dado que no final do período experimental foram ainda observadas áreas ocupadas por matriz (HA:CS e P:CS), foi realizada a sua contabilização, apenas para os grupos 3 e 4 (ver tabela 12 e gráfico 7).

Da análise realizada não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(1) = 3,069$  ;  $p = 0,080$ ) entre estes dois grupos, relativamente a esta variável.

### **Percentagem total de tecidos mineralizados e matrizes presentes no canal (%)**

Relativamente à percentagem de preenchimento canal, convém referir que no grupo 2 este valor é igual ao da percentagem total de tecidos mineralizados, pois não apresentava qualquer matriz no final do período experimental.

De acordo com tabela 12 e gráfico 7, constatou-se que o grupo 3 apresentava uma maior percentagem de tecidos mineralizados e matrizes presentes no canal. Contudo verifica-se que apesar de existirem diferenças, estas não apresentam significado estatístico ( $C^2_{KW}(2) = 1,861$  ;  $p = 0,394$ ) entre os grupos.

O valor encontrado para o grupo 3 está intimamente ligado à quantidade de matriz residual presente no interior do canal (ver tabela 12).

Tabela 12. Análise histomorfométrica efetuada aos grupos 2, 3 e 4, referente à percentagem total de tecidos mineralizados e de matriz residual presentes no interior do canal radicular.

%	Tecidos mineralizados dispersos no lúmen do canal (IO)	Tecidos mineralizados apositionados à dentina (TMAD)	Total dos tecidos mineralizados formados /TM = (TMAD + IO)	Matriz (S)	Percentagem total dos tecidos mineralizados e matrizes = (TM+S)
<b>Grupo 1</b>	-	-	-	-	-
<b>Grupo 2</b>	21,77±11,7	32,55±20,2	39,43±16,8	-	39,43±16,8
<b>Grupo 3</b>	18,8±16,3	7,55±5,9	11,09±9,7	37,26±18,0	46,59±16,9
<b>Grupo 4</b>	2,35±2,8	16,58±11,19	17,36±11,3	27,56±17,7	41,26±13,1

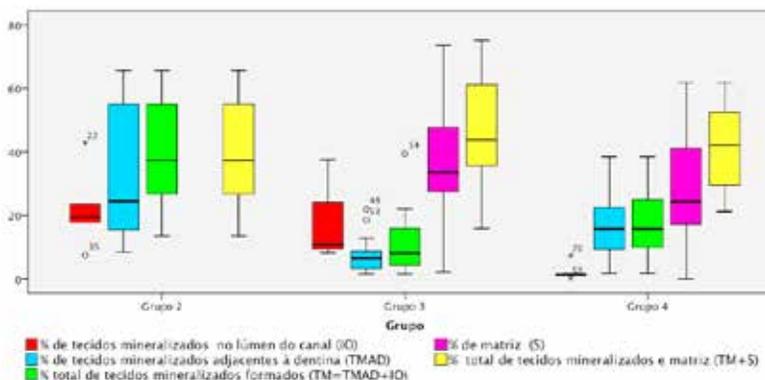


Gráfico 7. Análise histomorfométrica efetuada aos grupos 2, 3 e 4, referente à percentagem total de tecidos mineralizados e de matriz residual presentes no interior do canal radicular.

### 3.4.2.5. Cimento formado na parede externa da raiz

O cimento formado na parede externa da raiz contribuiu para o crescimento tanto em espessura, como em comprimento da raiz.

Este crescimento verificou-se em 45,3 % do total de raízes dos grupos experimentais de 1 ao 4 (ver tabela 13 e gráfico 8). Relativamente a este parâmetro o grupo 2 foi o que apresentou a percentagem mais elevada neste parâmetro, apesar das diferenças não serem estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 3,922$  ;  $p = 0,270$ ) entre os grupos 1 a 4.

Tabela 13. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) referente ao cimento formado na parede externa da raiz.

Cimento formado na parede externa da raiz	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	1 (5,6%)	0 (0%)	4 (21,1%)	3 (15,8%)	8 (10,7%)
Presente, com aumento da espessura radicular (1)	7 (38,9%)	7(36,8%)	7 (36,8%)	9 (47,4%)	30 (40%)
Presente, com aumento do comprimento radicular (2)	2 (11,1%)	1 (5,3%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (4%)
Presente, com aumento da espessura e comprimento radicular (3)	8 (44,4%)	11 (57,9%)	8 (42,1%)	7 (36,8%)	34 (45,3%)

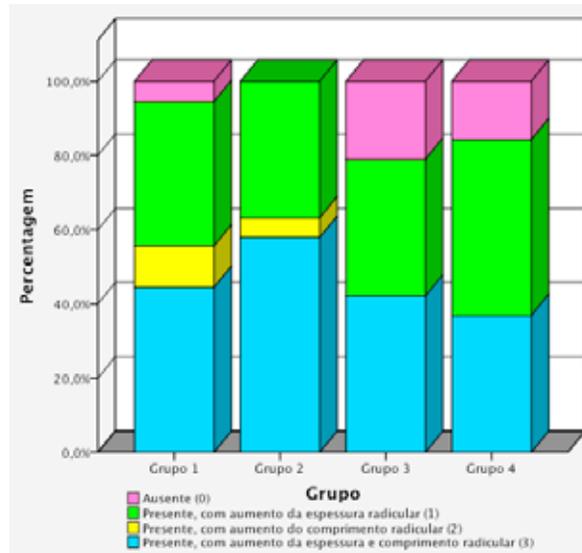


Gráfico 8. Cimento formado na parede externa da raiz

#### 3.4.2.6. Tecidos mineralizados adjacentes ao MTA (Ponte)

A ponte constituída por tecidos mineralizados adjacentes ao MTA estava praticamente ausente para nos grupos 3 (0%) e 4 (5,3%). Porém no grupo 1 verificou-se a sua presença em 83,3% dos casos e no grupo 2 em 57,9% (ver tabela 14 e gráfico 9).

Relativamente a esta variável, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 37,227$ ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 1 a 4. As diferenças foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U, verificando-se significância estatística entre os grupos 1 e 3 ( $p < 0,001$ ), 1 e 4 ( $p < 0,001$ ), 2 e 3 ( $p < 0,001$ ), 2 e 4 ( $p < 0,001$ ).

Tabela 14. Número de casos e percentagens de pontes adjacentes ao MTA observados nos grupos experimentais (1 a 4).

Ponte de tecidos mineralizados adjacentes ao MTA	Grupos				N° total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	3 (16,7%)	8 (42,1%)	19 (100%)	18 (94,7%)	48 (64%)
Incompleta (1)	9 (50%)	3 (15,8%)	0 (0%)	1 (5,3%)	13 (17,3%)
Completa (2)	6 (33,3%)	8 (42,1%)	0 (0%)	0 (0%)	14 (18,7%)

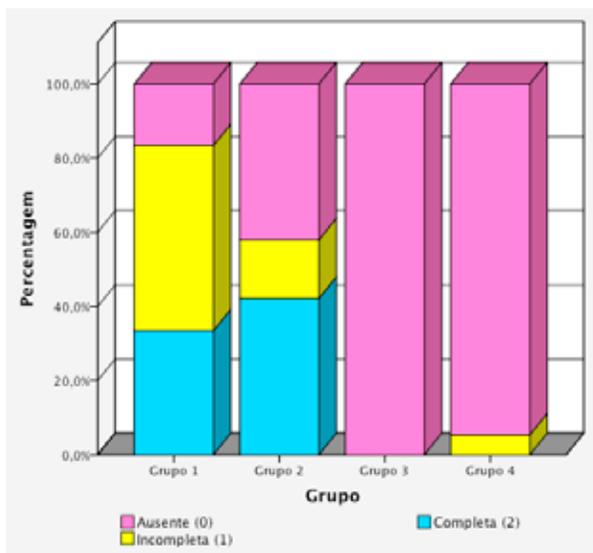


Gráfico 9. Pontes de tecidos mineralizados junto ao MTA.

### 3.4.2.7. Encerramento apical

Nos grupos experimentais atrás descritos, verificou-se em cerca de 70,7% dos casos a presença de encerramento apical parcial ou mesmo total.

De acordo com a tabela 15 e gráfico 10 e em termos de encerramento apical completo, o grupo 2 foi o que apresentou a maior valor (47,4%), seguido do grupo 1 (33,3%), grupo 4 (31,6%) e por último o grupo 3 (26,3%). Contudo, as diferenças observadas entre os grupos não foram estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 1,506$  ;  $p=0,681$ ).

Quando se procedeu ao somatório de casos de encerramento parcial e total, observou-se no grupo 1 um total de 83,3%, grupo 2 de 68,5%, grupo 3 de 57,3 % e grupo 4 de 68,4%.

Tabela 15. Número de casos e percentagens de encerramento apical observados nos grupos experimentais (1 a 4).

Encerramento apical	Grupo				Nº total dos casos (%)
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	
Ausente (0)	3 (16,7%)	6 (31,6%)	7 (36,8%)	6 (31,6%)	22 (29,3%)
Parcial (1)	9 (50%)	4 (21,1%)	7 (36,8%)	7 (36,8%)	27 (36%)
Completo (2)	6 (33,3%)	9 (47,4%)	5 (26,3%)	6 (31,6%)	26 (34,7%)

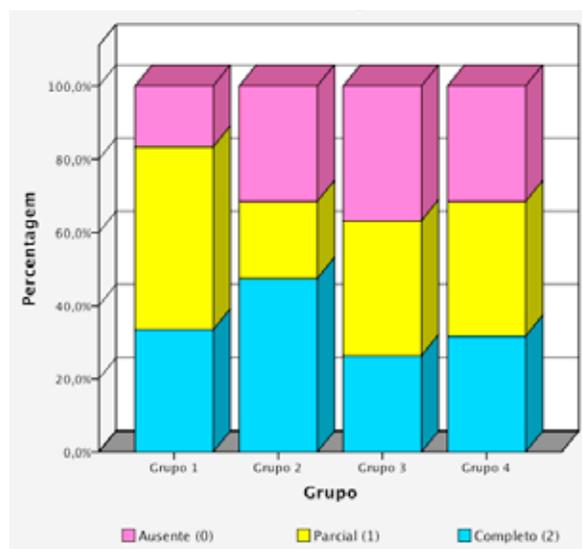


Gráfico 10. Encerramento apical.

#### 3.4.2.8. Reabsorção/ reparação de tecidos mineralizados da parede radicular

Dos casos analisados (ver tabela 16 e gráfico 11) referentes ao parâmetro de reabsorção/ reparação de tecidos mineralizados (dentina e cimento) constituintes da parede radicular, um total de 65,3 % das raízes apresentava ausência de áreas de reabsorção ou a sua completa reparação.

Relativamente à ausência de processos de reabsorção ou com reparação total das áreas reabsorvidas, os grupos 1 e 2 apresentaram os melhores resultados, sendo o grupo 3 o que apresentou valores mais baixos. No entanto, é de referir que este grupo (3) apresenta um predomínio (em 47,4%) de áreas reabsorvidas mas parcialmente reparadas,.

Apesar das diferenças encontradas não existem diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 6,871$  ;  $p=0,076$ ) entre os grupos 1 a 4, relativamente a esta variável.

Tabela 16. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) relativamente à reabsorção/ reparação de tecidos mineralizados da parede radicular.

Reabsorção de tecidos mineralizados da parede radicular (cimento e dentina)	Grupo				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausência de reabsorção ou com reparação total da áreas reabsorvidas (0)	14 (77,8%)	15 (78,9%)	8 (42,1%)	12 (63,2%)	49 (65,3%)
Reparação parcial da zonas reabsorvidas (1)	2 (11,1%)	4 (21,1%)	9 (47,4%)	6 (31,6%)	21 (28%)
Reabsorção sem reparação (2)	2 (11,1%)	0 (0%)	2 (10,5%)	1 (5,3%)	5 (6,7%)

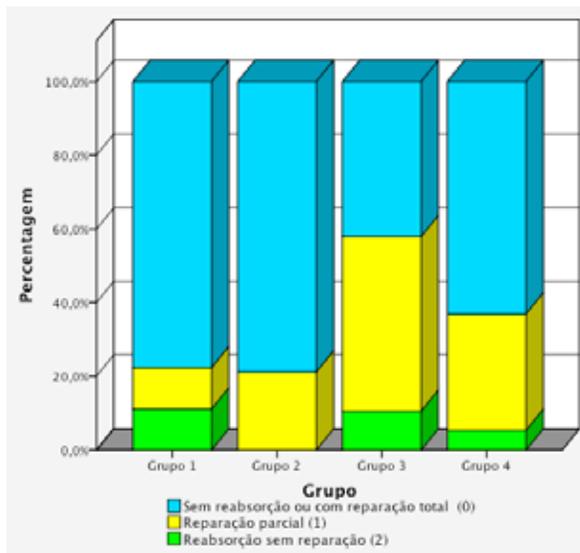


Gráfico 11. Reabsorção/ reparação de tecidos mineralizados da parede radicular.

### 3.4.2.9. Infiltrado inflamatório

O grupo 1 destaca-se pela quase ausência de infiltrado inflamatório, nos tecidos radiculares e periapicais. Por outro lado, o grupo 3 distinguiu-se pela negativa apresentando 57,9% das raízes com infiltrado inflamatório nos parâmetros moderado e grave (ver tabela 17 e gráfico 12).

Relativamente a esta variável, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 23,981$ ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 1 a 4, particularmente entre o grupo 1 e 3 ( $p < 0,001$ ), 1 e 4 ( $p = 0,004$ ) e entre grupo 2 e 3 ( $p < 0,001$ ).

Tabela 17. Número de casos e percentagens de infiltrado inflamatório observados nos grupos experimentais (1 a 4).

Infiltrado inflamatório	Grupos				Nº total dos casos (%)
	1	2	3	4	
Ausente (0)	14 (77,8%)	11 (57,9%)	2 (10,5%)	7 (36,8%)	34 (45,3%)
Ligeiro (1)	4 (22,2%)	6 (31,6%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)	21 (28,0%)
Moderado (2)	0 (0%)	2 (10,5%)	8 (42,1%)	5 (26,3%)	15 (20,0%)
Grave (3)	0 (0%)	0 (0%)	3 (15,8%)	2 (10,5%)	5 (6,7%)

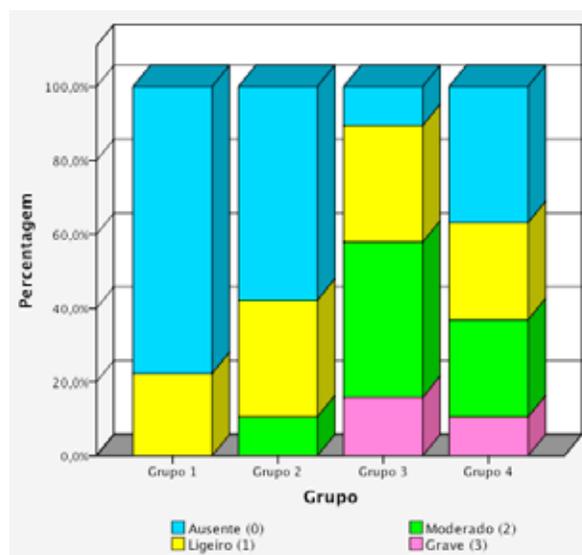


Gráfico 12. Infiltrado inflamatório.

#### 3.4.2.10. Espessura do ligamento periodontal

Relativamente a esta variável, foram observadas diferenças estatisticamente significativas ( $C^2_{KW}(3) = 26,351$ ;  $p < 0,001$ ) entre os grupos 1 a 4. As diferenças foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U, verificando-se significância estatística entre os grupos 1 e 3 ( $p < 0,001$ ), 1 e 4 ( $p = 0,012$ ), 2 e 3 ( $p < 0,001$ ), 2 e 4 ( $p = 0,002$ ).

O grupo 2 apresentou os melhores resultados, tendo-se registado 89,5% das raízes com uma normal espessura do ligamento, enquanto o grupo 3 se destacou pela negativa com valores relativamente mais altos para a espessura do ligamento (ver tabela 18 e gráfico 13).

Tabela 18. Número de casos e percentagens observados nos grupos experimentais (1 a 4) em relação à espessura do ligamento periodontal.

Espessura do ligamento periodontal	Grupos				Nº total de casos (%)
	1	2	3	4	
Normal (0)	14 (77,8%)	17 (89,5%)	4 (21,1%)	8 (42,1%)	43 (57,3%)
Ligeiramente aumentado (1)	4 (22,2%)	1 (5,3%)	3 (15,8%)	5 (26,3%)	13 (17,3%)
Moderadamente aumentado (2)	0 (0%)	1 (5,3%)	9 (47,4%)	3 (15,8%)	13 (17,3%)
Severamente aumentado (3)	0 (0%)	0 (0%)	3 (15,8%)	3 (15,8%)	6 (8%)

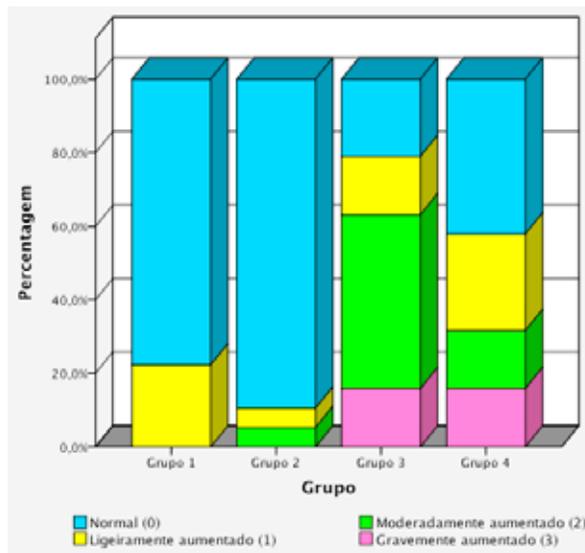


Gráfico 13. Espessura do ligamento periodontal.

### 3.4.2.11. Extrusão do MTA

Esta variável foi calculada apenas para o grupo I (ver tabela 19 e gráfico 14).

Nos casos em que não houve extrusão do MTA(10 casos), verificaram-se seis casos com formação de ponte apical completa e em quatro casos incompleta.

Tabela 19. Número de casos e percentagens observados no grupo I para a extrusão do MTA e para tecidos mineralizados adjacente ao MTA .

Extrusão do MTA	Grupos
	I
Ausente (0)	10 (55,6%)
Presente (1)	8 (44,4%)

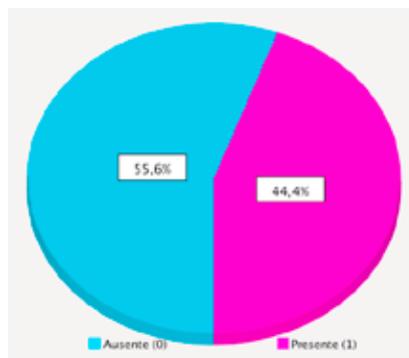


Gráfico 14. Extrusão do MTA.

### 3.5. Análise Estatística Multivariada

Dado a número de variáveis e com carácter exploratório procedeu-se à realização de uma análise estatística multivariada, com o objetivo de obter uma melhor compreensão da interação entre as diferentes variáveis em estudo e sua relação com as técnicas e materiais endodônticos utilizados.

A análise de componentes principais é associada à ideia de redução de dados, com menor perda possível da informação.

Com esta análise, verificou-se ser possível reduzir a informação a apenas uma dimensão, que se interpretou como traduzindo o resultado da intervenção endodôntica.

Um médico dentista experiente tendo por base o seu conhecimento clínico, analisou a evidência de sucesso clínico (presente ou ausente) com base em imagens radiográficas dos casos em questão.

Nos critérios utilizados para esta avaliação, foi considerado como sucesso a ausência de lesão periapical radiotransparente, a presença encerramento apical e/ou aumento da espessura das paredes.

Os casos representativos de sucessos (verde) e de insucessos (vermelho) encontram-se registados no gráfico 15.

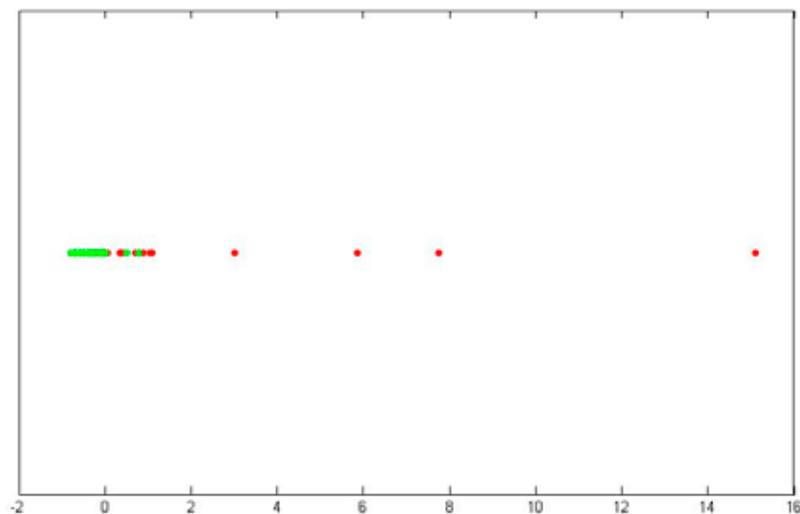


Gráfico 15. Distribuição espacial da informação relacional entre as variáveis em apenas uma dimensão, após análise dos componentes principais (PCA).

Com vista à validação da avaliação inicial, obtiveram-se duas observações adicionais do sucesso dos procedimentos clínicos por parte de mais dois médicos dentistas experientes, segundo

os critérios utilizados e já descritos anteriormente. Verificou-se uma grande coincidência entre as avaliações dos especialistas, que foi comprovada por um teste *Kappa*, descritos na tabela 20.

Tabela 20. Nível de concordância entre os observadores.

Observadores	1	2	3
1	---	K=0,797**	K=0,696**
2		---	K=0,802**
3			---

\*\* p < 0,01

Na tabela 21 reproduzem-se os pesos de cada componente tem na dimensão representada.

Tabela 21. Pesos relativo dos componente na dimensão encontrada.

<b>Pesos dos componentes</b>	Dimensão I
% de tecido ósseo	,124
% total dos tecidos mineralizados formados	-,248
% do total de tecido mineralizados e matriz	-,132
% de Tecido mineralizado aposicionado à dentina	-,229
% de Matriz	,053
<b>Encerramento apical</b>	<b>-,367</b>
<b>Preenchimento canal</b>	<b>-,350</b>
<b>Vascularização</b>	<b>-,345</b>
<b>Reabsorção/reparação de tecidos mineralizados</b>	<b>2,801</b>
<b>Infiltrado inflamatório</b>	<b>,970</b>
<b>Espessura do ligamento periodontal</b>	<b>,938</b>
Cimento formado na parede externa da raiz	-,220
Tecidos mineralizados adjacentes ao MTA	-,234

Com base nesta tabela 21 escolheram-se como variáveis de trabalho aquelas que apresentaram um valor absoluto de contribuição para a dimensão superior a 0,300. Utilizaram-se de seguida estas variáveis como preditores do sucesso da intervenção endodôntica numa regressão logística. O modelo ajustado pelo método *Enter* é estatisticamente relevante (Nagelkerke  $R^2=0,701$ , Teste de *Hosmer and Lemeshow*:  $C^2_{HL}(7) = 8,505$ ;  $p=0,290$ ), apresentando uma exatidão de 90,1%, sendo a probabilidade de uma previsão correta obtida aleatoriamente de 73,6%. Apesar de apenas uma variável mostrar significância estatística (encerramento apical), verifica-se que um modelo *forward LR* baseado apenas numa única variável preditora diminui a sua exatidão do modelo (para 85,7%), pelo que se optou por manter a totalidade das variáveis preditoras.

Os valores da variável da dimensão 1 encontrada, estão representados para cada grupo, nos gráficos seguintes (gráfico 16 e 17).

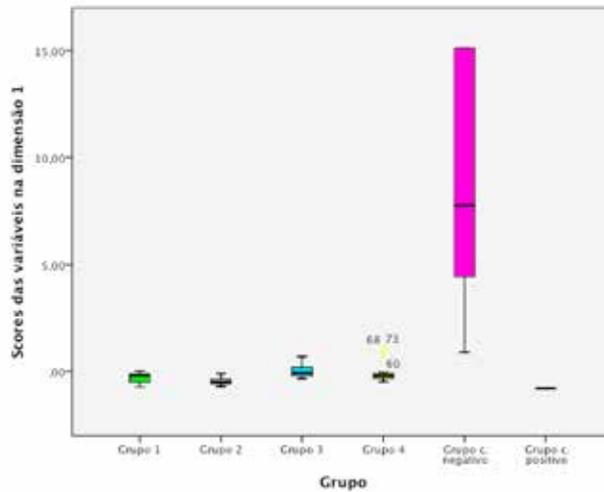


Gráfico 16. Valores das variáveis na dimensão 1, de todos os grupos experimentais (1, 2, 3 e 4) e grupo controle (negativo e positivo).

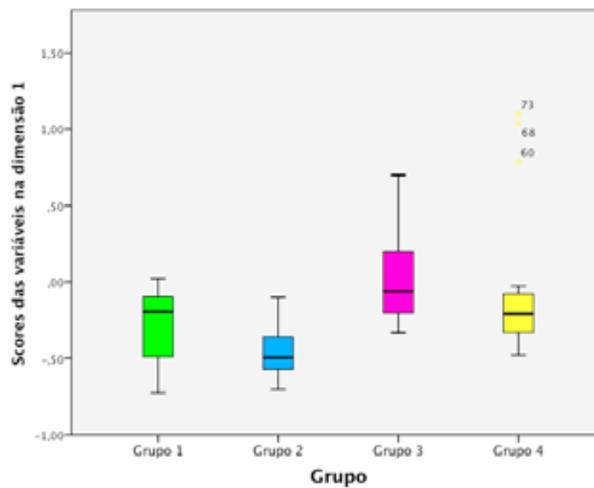


Gráfico 17. Valores das variáveis na dimensão 1, dos grupos experimentais (1, 2, 3 e 4).

Nota-se desde logo na análise do gráfico 16 que os controlos se destacam dos restantes grupos experimentais. Os controlos positivos como o melhor resultado e os controlos negativos com o pior resultado.

Verificou-se, com o teste de Kolmogorov-Smirnov, que a distribuição da variável indicativa dos valores dos objetos na dimensão I não pode ser ajustada por uma distribuição normal. Recorreu-se assim a um teste de Kruskal-Wallis para confirmar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 1 a 4 ( $C^2_{KW}(3) = 26,024; p < 0,001$ ).

As diferenças entre as várias técnicas clínicas foram analisadas com o teste de Mann-Whitney U (gráfico 17), apresentando significância estatística entre os grupos 1 e 2 ( $p = 0,034$ ), 1 e 3 ( $p = 0,008$ ), 2 e 3 ( $p < 0,001$ ) e 2 e 4 ( $p < 0,001$ ).

Por outro lado, as diferenças existentes entre os grupos 1 e 4 ( $p = 0,563$ ) e entre os grupos 3 e 4 ( $p = 0,091$ ) não foram estatisticamente significativas.

Dos grupos experimentais, o grupo 2 foi o que apresentou os melhores resultados e o grupo 3 os piores. Convém referir que o grupo 4 apresentou alguma inconsistência nos seus resultados, representada nos valores extremos.

#### 4. Discussão

Quando o tecido pulpar sofre necrose num dente imaturo o seu prognóstico fica deveras comprometido. Na verdade, a necrose pulpar num dente imaturo trás, desde logo, inúmeras complicações, representando o seu tratamento um enorme desafio.

A terapia endodôntica convencional com um protocolo de instrumentação e irrigação com recurso a limas e irrigantes está hoje desaconselhada, evitando fragilizar ainda mais um dente que, já por si, apresenta paredes dentinárias finas e frágeis.

De igual modo a antiga filosofia da “*extension for prevention*” conduz, ao contrário do que se pensava, a um aumento da agressão ao tecido lesado, particularmente durante as tentativas de controlo dos processos infecciosos e inflamatórios, com efeitos nefastos para a preservação da vitalidade pulpar e para o seu potencial de regeneração<sup>154</sup>. Atualmente a terapia endodôntica regenerativa em casos de dentes com necrose pulpar, tem despertado cada vez maior interesse e atenção, considerando os resultados encorajadores, recentemente publicados, decorrentes de estudos de investigação experimental<sup>19, 25, 95, 98, 153, 201, 208, 211, 216, 419-427</sup> e clínica<sup>9-13, 16, 17, 45, 103-112, 114-116, 119, 120, 360, 428-434</sup>. Com efeito, as novas perspetivas terapêuticas a par de técnicas minimamente invasivas podem contribuir para diminuir ou atenuar os efeitos secundários de diversas intervenções, permitindo uma melhor capacidade regeneradora e, deste modo, um melhor prognóstico para dentes imaturos com necrose pulpar ou mesmo com periodontite apical<sup>388</sup>.

As doenças de natureza infecciosa constituem, de longe, a principal etiologia dos processos inflamatórios da polpa (pulpites) e das zonas periapicais (periodontites apicais). Assim o controlo da infeção é considerado o primeiro objetivo a atingir, constituindo um processo chave no sucesso dos tratamentos endodônticos<sup>180</sup>.

Por outro lado, as infeções desencadeiam respostas imunoinflamatórias que podem não ser apenas de defesa (permitindo aos tecidos ultrapassar as agressões) mas conduzir, de acordo com a intensidade e extensão do processo, a uma importante destruição destes mesmos tecidos, o que normalmente vai diminuir a sua capacidade de regeneração<sup>180</sup>.

Neste contexto, importa salientar a interação entre as células e fatores constituintes do sistema imunitário e as células estaminais presentes na polpa e nos tecidos periapicais. Na verdade, o balanço entre as células de natureza imunológica e as moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias presentes no local da lesão vai influenciar o resultado a favor da persistência da inflamação, ou a favor de um processo de reparação/regeneração do tecido lesado, situação a que não é alheia a densidade e a capacidade de resistência e de proliferação das células estaminais<sup>386</sup>. Assim, uma resposta inflamatória descontrolada associada a uma pulpite irreversível irá comprometer as hipóteses de regeneração tecidular, relativamente à funcionalidade do complexo pulpo-dentinário. Com efeito, a erradicação atempada da infeção e o controlo da inflamação associada, abrem inúmeras possibilidades de obtenção de sucesso<sup>386</sup>.

Por sua vez, importa referir que, como é evidente, qualquer processo de cicatrização deverá resultar no máximo de regeneração e no mínimo de reparação, de modo a que a biologia e fisiologia do tecido lesado, não seja comprometida. No entanto, verifica-se que a maioria dos mecanismos de cicatrização de pulpites e periodontites apicais, resulta quase sempre numa reparação tecidual ou, quando muito, numa combinação de reparação e regeneração. Esta situação parece ficar a dever-se não só à destruição causada pela dimensão da lesão, como ao facto de as células somáticas pós-natais, constituintes da polpa e dos tecidos periapicais, terem um limitado potencial de cicatrização. Deste modo, a resolução de processos de pulpite irreversível, necrose pulpar e periodontite apical, após tratamentos endodônticos adequados pode não levar, necessariamente, a uma completa regeneração destes tecidos, uma vez que estão formados por células somáticas pós-natais e que, por sua vez, podem também estar significativamente diminuídas pela agressão. Por outro lado, a maioria das células estaminais existentes na polpa dentária de dentes permanentes, para além de constituírem uma pequeníssima percentagem das células pulpares, têm também uma capacidade de divisão e diferenciação limitada, uma vez que apresentam atividade telomerásica pouco significativa<sup>25,388,390</sup>.

Este cenário é bastante importante nas terapias endodônticas regenerativas, em que o sucesso alcançado está depende não só de uma eficaz vascularização, como da idade do paciente e da fase de desenvolvimento da raiz. Assim, considerando a capacidade regenerativa dos tecidos em causa e da gravidade (temporal e espacial) dos processos infecciosos e inflamatórios a que foram sujeitos, o mecanismo de cicatrização dos tecidos lesados pode conseguir restaurar a sua integridade, mas conduzir a uma potencial perda da sua funcionalidade biológica<sup>180</sup>.

A este respeito importa recordar que células como os odontoblastos são células pós-mitóticas terminais, incapazes de se dividir<sup>24,127,163</sup>. Com efeito, quando os odontoblastos primitivos são destruídos serão as células estaminais/progenitoras presentes nos nichos pulpares que se vão diferenciar em odontoblastos (secundários), quando induzidas por estímulos apropriados. Neste âmbito, convém referir que a matriz dentinária contém uma panóplia muito heterogênea de fatores de crescimento e citoquinas, constituindo importantes moléculas sinalizadoras que vão dar um grande contributo para uma eficaz resposta regenerativa, traduzida normalmente na formação de dentina reparadora<sup>24,163,209,305,325</sup>. Porém, a baixa densidade de células estaminais pós-natais e o seu limitado potencial proliferativo e regenerativo, já atrás descritos, podem não ser suficientes para conseguir regenerar grandes áreas de tecido danificado, como é o caso das grandes lesões inflamatórias pulpares e periapicais. De facto, a cicatrização destas lesões apresenta-se como um processo biologicamente muito complexo que, com frequência, necessita do recrutamento e migração de células estaminais presentes noutros locais, como a papila apical, ligamento periodontal, endósteo, medula óssea e periósteo. Nestas condições predominam geralmente os processo de reparação, não se conseguindo o restabelecimento da histofisiologia pulpo-dentinária, mas apenas uma revitalização do espaço canal<sup>388</sup>.

Por outro lado, e como é do conhecimento geral, os processos de regeneração pulpar não podem ser levados a cabo sem um mecanismo de revascularização prévio, que consiste numa indução angiogénica efectuada no espaço canalar através de um procedimento endodôntico. No entanto, a revascularização pulpar representa, apenas, o restabelecimento da vascularização e não necessariamente a repopulação das células odontoblásticas. Ainda que os vasos sanguíneos sejam elementos essenciais da polpa dentária, a regeneração pulpar é considerada incompleta se não se verificar a formação de uma camada odontoblástica. De facto, a regeneração pulpar deverá integrar não só um mecanismo de revascularização como também a restauração funcional do complexo pulpo-dentinário. Compreende-se deste modo que uma regeneração do complexo pulpo-dentinário englobe: a) existência de um tecido pulpar bem vascularizado e innervado, b) presença de uma nova camada de odontoblastos recém diferenciados e c) formação de nova matriz dentinária, adjacente à dentina primária e secundária, sintetizada pelos odontoblastos neoformados<sup>15</sup>. Todavia este objetivo é bem mais difícil de alcançar do que se pode pensar. A este respeito Mao *et al.*<sup>33</sup>, num dos seus trabalhos publicados já em 2012, chega mesmo a afirmar que 16 anos após a introdução destes conceitos e tecnologias, “*regenerative endodontics remains a scientific exercise rather than a clinical reality*”.

Com efeito, apesar de *a priori* serem muito promissores os mecanismos de regeneração endodôntica, com recurso à engenharia de tecidos e sobretudo à transplantação de células estaminais pulpares, encontram, no entanto, na prática clínica grandes barreiras e limitações<sup>33,211</sup>. Para além de representarem técnicas muito complexas e onerosas, as dificuldades na colheita, isolamento, cultura, manipulação e amplificação das células estaminais são exemplos adicionais das inúmeras complexidades a ultrapassar, antes de se tornarem uma realidade<sup>33</sup>.

Considerando tudo o que atrás foi dito, a maioria dos resultados obtidos neste trabalho experimental, após um processo de revascularização do espaço canalar não apresentaram na generalidade, características biológicas e funcionais específicas do complexo pulpo-dentinário, não podendo chamar-se-lhe, por isso mesmo, um processo regenerativo, mas sim reparativo, ou seja uma revitalização e não uma regeneração. Com efeito, o cimento e o tecido ósseo neoformados no interior dos canais radiculares não são componentes normais do tecido pulpar, representando apenas uma revitalização e uma boa vascularização do espaço pulpar. Estes tecidos formados no interior do espaço canalar parecem constituir uma extensão e invasão das estruturas periodontais para o interior do espaço canalar, certamente facilitada por um ápice aberto e amplo<sup>8,428,435</sup>. De qualquer forma, pode afirmar-se que a presença destes tecidos no espaço canalar é indicador da erradicação bacteriana e da reação inflamatória associada, o que por si só deve ser considerado como um resultado muito positivo. De registar ainda que, embora não se verifique com frequência a formação de matriz dentinária, observou-se, no entanto, o aparecimento de grandes áreas representativas de tecido pulpar, bastante bem vascularizado e innervado ocupando a maioria do espaço canalar.

Por sua vez, os resultados por nós observados, nas zonas periapicais, ao contrário do que se verificou na cavidade pulpar, podem ser interpretados mais como processos regenerativos, do que reparativos.

É importante recordar aqui que tanto o periodonto como a polpa dentária, são ambas estruturas com origem no ectomesênquima<sup>388</sup>. Estas duas regiões parecem desempenhar uma importância fundamental nos mecanismos de formação, reparação e regeneração dentária constituindo as principais regiões anatómicas onde estão localizados os nichos de células estaminais com maior atividade e potencialidade nestes processos<sup>127, 128</sup>.

De salientar também que os mecanismos de dentinogénese, osteogénese e cementogénese são muitos semelhantes entre si e que odontoblastos, osteoblastos e cementoblastos apresentam muitas características morfofuncionais em comum<sup>53</sup>. As suas vias de diferenciação são determinadas maioritariamente pelos componentes do microambiente em que se encontram. As diferenças mais significativas entre estas três linhas celulares residem em pequenas particularidades morfológicas e sobretudo na relação anatómica entre as células e a matriz calcificada por elas sintetizada<sup>53</sup>. Nesta hierarquia o mecanismo de diferenciação odontoblástica parece requerer um maior grau de exigência, compreendendo-se pois que nos processos de regeneração, levados a cabo no espaço canal, seja sempre mais difícil de atingir uma reconstituição eficaz do complexo pulpo-dentinário.

Todavia, como fica demonstrado neste trabalho é possível, em raízes imaturas necrosadas e com periodontite apical, revascularizar e revitalizar o espaço pulpar. Os tratamentos inovadores aplicados permitiram a revascularização de dentes imaturos e a recuperação de um estado vital no canal pulpar, possibilitando um desenvolvimento radicular para apical da restauração coronorradicular, traduzido por um aumento, ainda que mais significativo em espessura do que em comprimento, das paredes radiculares a par de um frequente encerramento apical.

Anteriormente a regeneração do tecido pulpar num dente infetado com necrose pulpar e periodontite apical, era considerada impossível. Atualmente se conseguirmos uma desinfeção efetiva e atempada do sistema canal, a criação de um microambiente que permita o crescimento dos tecidos e um eficaz selamento coronário<sup>10, 102, 436</sup>, podemos verificar, como no presente estudo, a efetivação de mecanismos de reparação e/ou revitalização do espaço canal ou mesmo a regeneração de grandes áreas de tecido pulpar, sem recorrer a técnicas muito dispendiosas e demasiado sofisticadas.

Considerando os princípios básicos em que assenta a engenharia de tecidos, entendemos que os procedimentos efetuados neste trabalho experimental, incluem a) a presença de células estaminais (libertadas para o interior do espaço canal aquando da disrupção do tecido periapical e indução do coágulo), b) uma matriz (constituída pelo coágulo de fibrina, matrizes poliméricas e paredes dentinária) e finalmente c) a presença de fatores de crescimento/morfogénicos (provenientes quer da parede dentinária, quer das plaquetas e outros constituintes do coágulo sanguíneo). A grande desvantagem desta tecnologia para além da dificuldade em debelar eficazmente os processo

infeciosos/inflamatórios é a falta de capacidade de controlo dos elementos que constituem a tríade regenerativa.

Preservar a integridade estrutural da papila apical (evitando também o seu destacamento da raiz correspondente) e da bainha radicular epitelial de Hertwig (ou dos seus derivados), bem como efetuar um diagnóstico atempado e controlo da infeção, a par de um eficaz mecanismo de revascularização, são condições essenciais que, à partida, podem proporcionar o desenvolvimento e maturação das células estaminais, adequadas à diferenciação fenotípica dos tecidos a regenerar, o que pode fazer toda a diferença na reconstituição do complexo pulpo dentinário e crescimento radicular.

Na prática clínica, o método de avaliação do desempenho biológico da resposta aos materiais aplicados e às técnicas de apexificação e de revascularização é representado pelos sinais e sintomas clínicos, bem como pelos controlos radiográficos da região apical e periapical. Contudo, a formação de tecidos pulpares e periapicais em resposta ao tratamento endodôntico, só poderá ser avaliada na plenitude por meio de um exame histológico<sup>437,438</sup>. No entanto, fundamentalmente por aspetos éticos e médico-legais, a biopsia dos tecidos pulpares e periapicais em seres humanos não é recomendada. Desta forma, torna-se essencial a utilização de um modelo animal que possibilite a análise histopatológica dos tecidos pulpares e periapicais neoformados na sequência das técnicas/materiais testados<sup>439</sup>.

### **Seleção do modelo animal e protocolo experimental**

Num trabalho de investigação relacionado com processos de regeneração tecidual, a escolha de um modelo animal apropriado deve basear-se sempre numa seleção criteriosa e eficiente dos objetivos a atingir. De facto, a seleção do modelo animal mais adequado é o primeiro passo crítico no desenho de um procedimento experimental, devendo ter-se em consideração diversos fatores, nomeadamente a disponibilidade e custo dos animais, bem como a existência de instalações que cumpram a legislação de saúde e bem-estar animal.

Assim, neste trabalho experimental foi selecionado como modelo animal o cão *Beagle*, considerado o modelo mais apropriado para estudos de regeneração endodôntica, tendo sido também utilizado por inúmeros investigadores na área da Endodôncia e Dentistaria Operatória com bons resultados<sup>10, 19, 105, 201, 211, 421, 425, 426, 440-444</sup>.

De registar ainda a vantagem decorrente da nossa experiência anterior e processos de otimização efetuados com este modelo animal, já realizadas por um grupo de investigação na área da Medicina Dentária<sup>440,442</sup> da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. No decurso destes estudos pôde constatar-se que os procedimentos experimentais aqui aplicados não provocavam quaisquer perturbações funcionais ou etológicas nos animais. Por sua vez, este modelo revelou-se

muito útil para uma avaliação da resposta tecidual (especificamente pulpar e periapical) a diferentes protocolos de tratamento endodôntico<sup>440,442</sup>. Com efeito estes animais possuem um grande número de dentes passíveis de tratamento, possuindo na sua maioria canais retos de fácil acesso e que, de um modo geral, apresentam em relação aos seres humanos uma grande semelhança nos processos de reparação/regeneração dos tecidos apicais e periapicais em tratamentos dentes imaturos<sup>445</sup>. Para além disso, a sua rápida velocidade de crescimento permite a obtenção de resultados, tendo por base períodos experimentais relativamente curtos<sup>446</sup>. A escolha deste animal teve também em consideração a existência de estudos prévios, que estabeleceram uma equivalência entre as idades do cão e do homem. Nesta escala, um animal com 6 meses corresponde à idade de um homem de 7,5 anos, o de 1 ano a um homem de 15 anos e um animal de 2 anos a um homem de 24 anos. A partir daqui, cada aumento de um ano na idade do cão equivale a quatro anos no homem<sup>447</sup>.

A idade do animal reveste-se também de particular importância, pois os 1º, 2º, 3º e 4º pré-molares erupcionam por volta do 125º e 150º dia de vida e o último dente, o 3º molar, por volta do 175º<sup>448,449</sup>. Daí em diante o desenvolvimento radicular continua, completando-se o processo de apexogénese nos meses seguintes. A deposição de dentina e cimento secundário prolongam-se por toda a vida. Assim, tal como nos seres humano, vai ocorrendo uma diminuição progressiva do diâmetro do canal radicular e da área de comunicação com o ligamento periodontal, através de múltiplos *foramina*.

Deste modo, e considerando os objetivos em questão, o conhecimento da fase de erupção dos dentes, nestes animais, apresenta-se de importância crucial para este estudo, pelo que tiveram de ser sujeitos a um controlo rigoroso, de forma a que a intervenção ocorresse no tempo certo, isto é, aquando da erupção dos dentes na cavidade oral e com cerca de  $\frac{2}{3}$  a  $\frac{3}{4}$  do comprimento radicular estimado já formado (classe II e III de Patterson)<sup>cit in<sup>59</sup></sup>.

Por sua vez, o cão é uma espécie com grande diversidade de raças, razão pela qual os cães de laboratório utilizados, em trabalhos experimentais, devem pertencer à mesma raça, ser de origem pura e do mesmo sexo, de modo a apresentarem as mesmas características anatómicas e fisiológicas e a reagirem de forma semelhante a um determinado estímulo, permitindo assim a reprodutibilidade dos resultados. De facto, neste projeto todos os animais utilizados pertenciam à raça *Beagle* do sexo masculino, com uma linhagem pura, nascidos e criados num laboratório credenciado e com uma idade aproximadamente de 6 meses no início do estudo.

A duração total do período experimental foi de 18 semanas, tendo decorrido 3 semanas desde a indução das lesões até à realização do primeiro tratamento visando a antisepsia intracanal. Ao fim de 2 semanas de medicação intracanal executaram-se os processos de apexificação ou de revascularização com a aplicação de matrizes. Desde o final do tratamento até à colheita das amostras decorreram 13 semanas.

O aparecimento de lesões radiotransparentes ao fim de aproximadamente 3 semanas confirmaram a eficácia do protocolo utilizado para indução das lesões periapicais em dentes imaturos, num curto espaço de tempo. A indução de lesões periapicais em dentes com ápice fechado é muito mais morosa<sup>440, 450, 451</sup>.

Por sua vez e tendo por base os controlos históricos nos dentes com ápices imaturos, bem como a salvaguarda do bem estar animal optou-se pela inclusão de apenas 8 pré-molares monorradiculares como controlo negativo, permanecendo apenas 4 (um dente por cada animal) até ao final do período experimental.

Para melhor compreendermos a situação em que se encontravam os tecidos pulpares aquando do início do processo de antisepsia canal, ou seja, às três semanas optámos pela extração de 4 dentes, um de cada animal, pertencentes ao controlo negativo pulpar (CNP). De facto as observações histológicas, parecem demonstrar que a disrupção pulpar associada à contaminação bacteriana em cavidade fechada, desencadeou, a nosso ver, uma resposta muito exuberante, sobretudo para estes tecido, destruindo praticamente todo o conteúdo pulpar, deixando apenas algumas áreas ocupadas por fibras de colagénio.

### **Irrigação e Medicação intracanal**

Dado que a instrumentação mecânica deve ser minimizada ou eliminada<sup>109</sup>, no nosso protocolo experimental foi praticamente inexistente, para evitar a fragilização das paredes dentinárias já de si muito finas. Deste modo, a obtenção de um ambiente adequado para o desenvolvimento radicular ficou enormemente dependente da irrigação e da medicação intracanal aplicada<sup>12, 102, 103, 109, 428</sup>.

A utilização de hipoclorito de sódio (NaOCl) é rotineira nos tratamentos endodônticos, devido à sua ação efetiva como agente antimicrobiano, associado às suas propriedades de dissolução dos tecidos orgânicos<sup>452</sup>. O NaOCl também tem sido utilizado de forma generalizada por estes motivos nos processos de revascularização, de modo a facilitar um posterior restabelecimento da vitalidade/regeneração pulpar<sup>104</sup>.

No nosso protocolo foi utilizada uma irrigação com hipoclorito de sódio a 2,5% aquecido a 30°C, em dois momentos distintos. O primeiro, às três semanas, recorrendo a uma irrigação canal abundante, com intuito de maximizar a atividade antimicrobiana desta solução. O segundo momento, às 5 semanas, aquando da realização dos procedimentos de apexificação ou de revascularização com colocação das matrizes, através de uma irrigação camarál, visando apenas uma antisepsia na câmara pulpar, evitando deste modo danificar as células estaminais remanescentes. Tal como defende Lovelace *et al.*<sup>96</sup>, nesta segunda fase, os canais radiculares foram apenas irrigados com uma solução salina.

A este respeito Essner *et al.*<sup>453</sup> recomendam a utilização de concentrações muito mais baixas (0,04%–0,33%) de hipoclorito com o objetivo de manter o máximo número de células viáveis no

interior do canal. Porém, Huang e Trevino<sup>234,454</sup> chegam a aplicar concentrações de 5,25% registrando, no entanto, o seu efeito deletério nas células estaminais.

A concentração de NaOCl a 2,5% parece-nos conseguir um bom equilíbrio entre a tentativa de controlo da infeção e a preservação celular, tal como é recomendado também por diversos investigadores<sup>16, 110, 275</sup>.

A medicação intracanal utilizada para os casos de apexificação (grupo 1) foi o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), sendo nos casos de revascularização (grupo 2, 3 e 4) aplicada uma pasta triantibiótica de ciprofloxacina, metronidazol e minociclina.

A utilização do hidróxido de cálcio como medicação intracanal nos processos de apexificação, é o procedimento mais comum em dentes imaturos necrosados<sup>16, 84, 87, 88, 90, 110, 455-457</sup>. Apesar de um possível enfraquecimento da dentina, quando sujeita a uma exposição prolongada ao  $\text{Ca(OH)}_2$ <sup>75, 79, 458</sup>, a sua aplicação por curtos períodos de tempo apresenta-se vantajosa dada a sua atividade antimicrobiana<sup>459</sup>. Devido à anatomia radicular apical divergente, típica de ápices imaturos, a aplicação de hidróxido de cálcio pode complementar a ação do hipoclorito de sódio na remoção de restos necrosados.

O  $\text{Ca(OH)}_2$  para além de, em curtos períodos de tempo (7 dias), possuir uma atividade antimicrobiana, sendo eficaz na maioria das infeções canulares<sup>460</sup>, tem ainda a capacidade de elevar o pH intracanal, possibilitando a criação de um ambiente mais favorável à reação de presa do MTA. Lee *et al.*<sup>461, 462</sup> demonstraram que um ambiente ácido com um pH de 5 afeta as propriedades físicas e de hidratação do MTA, reduzindo deste modo a sua microdureza. De realçar ainda, que a utilização da medicação intracanal com  $\text{Ca(OH)}_2$  não parece afetar a capacidade de selamento apical do MTA<sup>463-466</sup>, podendo mesmo melhorá-la<sup>467</sup>.

Bose *et al.*<sup>84</sup> num estudo retrospectivo com dentes sujeitos a procedimentos endodônticos regenerativos, verificaram que os casos tratados com medicação intracanal de hidróxido de cálcio apresentavam melhores resultados relativamente ao aumento de espessura da parede radicular, quando o  $\text{Ca(OH)}_2$  foi colocado até à porção média do canal radicular, do que quando foi colocado para apical da porção média do canal.

A nossa preparação da pasta triantibiótica seguiu as instruções descritas no protocolo mencionado por Hoshino *et al.*<sup>413, 468</sup> e Trope<sup>436</sup>. A sua efetividade e eficácia na eliminação de agentes patogénicos endodônticos foi já demonstrada tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*<sup>468, 469</sup>. Hoshino *et al.*<sup>468</sup> verificaram que a combinação destes antibióticos aumentava a sua eficácia, em muitas situações em que isoladamente não eram capazes de eliminar por completo as bactérias. Neste âmbito, Sato *et al.*<sup>469</sup> conseguiram também com recurso a esta pasta triantibiótica eliminar bactérias presentes nos canaliculos dentinários. Com base nestes trabalhos, tem sido recomendada a utilização desta mistura triantibiótica para a desinfeção canal de dentes imaturos necrosados e/ou com periodontite apical<sup>10, 12, 13, 16, 44, 84, 96, 105, 441, 470</sup>. Recentemente, Ordinola-Zapata *et al.*<sup>471</sup> demonstraram a efetividade e

superioridade desta pasta triantibiótica na eliminação de bactérias em biofilmes, quando em comparação com um gel de clorhexidina a 2% ou com uma pasta de hidróxido de cálcio.

Por sua vez, as tetraciclina, para além de aumentam os níveis de IL-10 (interleucina anti-inflamatória), podem apresentar uma importante atividade anticolagenase, devido à sua forte ligação ao  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Zn}^{++}$  (catiões essenciais à atividade enzimática das metaloproteínas da matriz), levando a uma redução da desintegração da matriz conjuntiva. Em paralelo, diminuem a produção de algumas citocinas, ácido nítrico e prostaglandinas<sup>128</sup>. A ciprofloxacina e o metronidazol podem ainda estimular a formação de fibroblastos<sup>102, 412, 472</sup>. Esta combinação triantibiótica parece, deste modo, favorecer os procedimentos regenerativos.

Como preocupação de ordem clínica, permanece o facto de se verificar uma pigmentação dentária devido ao uso da minociclina<sup>13, 108, 120</sup>. Por este motivo, tem sido sugerido a substituição da minociclina por outro antibiótico, como a cefalosporina (Cefaclor) ou amoxicilina ou mesmo a sua exclusão<sup>269, 436</sup>. Por outro lado, Reynolds *et al.*<sup>106</sup> aconselham o selamento dos túbulos dentinários da câmara pulpar com a aplicação prévia de um sistema adesivo, antes da utilização da minociclina, para que não ocorra este efeito indesejado. Outro aspeto a ter em linha de conta é a colocação da pasta a cerca de 3 mm para apical da JAC, sem deixar resíduos nas paredes coronárias, o que se torna tecnicamente difícil devido à consistência atual da pasta.

Tal como foi referido para o NaOCl, está também a ser estudado o efeito dos componentes da pasta triantibiótica, bem como do hidróxido de cálcio, sobre a população de células estaminais presentes na polpa e na papila apical<sup>473, 474</sup>. A pasta triantibiótica pode afetar a integridade e funcionalidade das células estaminais em duas circunstâncias<sup>473</sup>. Uma delas verifica-se aquando da extrusão ou difusão da medicação para além do ápice, atingindo as células estaminais constituintes da papila apical (SCAPs). A outra verifica-se quando a medicação permanece residualmente no interior do canal podendo danificar as células estaminais que migram da papila apical para o interior dos canais, a indução da hemorragia que acompanha os mecanismos de revascularização.

Ruparel *et al.*<sup>473</sup> observaram a ação da medicação intracanal, utilizada em procedimentos regenerativos, sobre as SCAPs, verificando que concentrações muito elevadas de pasta triantibiótica exercem efeitos deletérios na sua sobrevivência das SCAPs. Por outro lado, concentrações mais baixas, bem como a utilização de hidróxido de cálcio não parecem alterar a sobrevivência e proliferação. Pode pois concluir-se que as concentrações recomendadas e aqui aplicadas não deverão ter exercido efeitos nefastos nestas células<sup>473, 474</sup>.

Uma nota final para o trabalho de Cohenca *et al.*<sup>426</sup> que procedeu a uma avaliação da antisepsia canalar através da comparação de dois protocolos com base na utilização de hipoclorito de sódio a 2,5%. Num dos grupos com recurso a um sistema de pressão apical negativa (sistema EndoVac) e no outro com irrigação convencional com pressão positiva e agulha 30G, seguida de medicação

intra canal com pasta triantibiótica. Cohenca *et al.*<sup>426</sup> concluíram através de estudos microbiológicos, que todos os canais estavam contaminados no início do tratamento e, após a utilização destes dois protocolos de irrigação, obtiveram uma grande redução da flora microbiana existente nos canais, na ordem dos 80%, não se verificando diferenças estatisticamente significativas entre ambos. Na sequência do mesmo estudo, agora com recurso a uma análise histológica, da Silva *et al.*<sup>421</sup> referem que a irrigação com hipoclorito em sistema de pressão negativa, quando comparado com a irrigação por pressão positiva seguida da pasta triantibiótica, conduziu à formação de uma maior quantidade de tecido mineralizado no interior do canal radicular, tecidos conjuntivos mais estruturados na zona pulpar e periapical e um processo de reparação mais avançado. Estes investigadores concluíram, por conseguinte, que o sistema de pressão apical negativa promove condições mais favoráveis à ocorrência de uma reparação apical, assim como uma adequada antisepsia canal sem irritação tecidual periapical significativa, dispensando a utilização adicional de antibióticos. Outra das vantagens apresentadas pela aplicação deste sistema é a minimização do risco de extrusão do hipoclorito de sódio para o periápice. No nosso estudo, esta preocupação esteve sempre presente, tendo sido definido um protocolo de irrigação com agulhas de saída lateral, de calibre 27G, com utilização de pressão suave e limitador de silicone colocado 3 milímetros aquém do comprimento de trabalho, de modo a reduzir ao mínimo o risco de extrusão, em conformidade com os resultados dos estudos de dinâmica de fluxo de irrigantes apresentados por Boutsoukis *et al.*<sup>475, 476</sup>.

### **Matrizes**

Dado que não existe crescimento celular em espaços vazios, facilmente se compreende a necessidade de aplicação de matrizes de sustentação de modo a criar uma estrutura tridimensional apropriada para o crescimento e diferenciação celular, promovendo também condições biológicas e físico-químicas favoráveis ao processo de adesão e migração celular. De facto, como já foi referido, as matrizes são muito mais que um simples meio de acomodação das células.

A utilização de matrizes para auxiliar a regeneração endógena de tecido pulpar e/ou facilitar a formação de dentina reparadora apresenta-se como um objetivo de primordial importância sobretudo nos casos de endodontia regenerativa.

Considerando que os constituintes das matrizes extracelulares controlam muitas vezes e mais favoravelmente a diferenciação das células estaminais, seleccionámos matrizes com uma constituição o mais próxima possível às matrizes extracelulares dos tecidos em questão.

Foi com este propósito que se utilizaram as matrizes de hialuronato de sódio e quitosano (HA:CS) e as de pectina e quitosano (P:CS), tentando encontrar uma matriz com melhores capacidades biomiméticas do que as do coágulo sanguíneo, que possibilitasse uma melhor regeneração e reabilitação morfofuncional do complexo pulpo-dentinário.

Já Thibodeau *et al.*<sup>18</sup> recorreram também, para além da indução de um coágulo sanguíneo, à colocação de matrizes. No entanto, estes autores referem que adição da matriz colagénica por eles

selecionada não melhorou a formação de novos tecidos. Provavelmente esta matriz foi reabsorvida muito rapidamente, fracassando na sua função de suporte e estabilidade. Nesta base, Yamanuchi et al.<sup>201, 425</sup> recorreram à utilização de um colagénio insolúvel para permitir uma melhor estabilização, obtendo melhores resultados. Contudo, Huang et al.<sup>217</sup> alerta para o facto de poder ocorrer uma contração das matrizes colagénicas, causada pela atividade das células pulpares, o que poderá afetar a regeneração do tecido pulpar.

Foi nesta ordem de ideias que no presente trabalho procurámos utilizar matrizes à base de quitosano, que para além da sua reconhecida eficácia nos processos de regeneração pulpar<sup>244</sup> e periodontal<sup>223</sup> e para além das suas propriedades antimicrobianas, apresenta também uma degradação mais lenta, levada a cabo de um modo natural, por sistemas enzimáticos.

A adição de hialuronato de sódio ou de pectina ao quitosano visou melhorar as suas propriedades de forma a proporcionar um microambiente em redor das células (particularmente das células mesenquimatosas indiferenciadas)<sup>199, 215, 247</sup>, capaz de melhorar o seu comportamento. Com efeito, estes complexos polielectrolíticos tinham por objetivo reunir um conjunto de variáveis que isoladamente têm reconhecidas atividades de regeneração tecidual<sup>215, 247</sup>. A sinergia resultante da combinação de hialuronato de sódio e quitosano (HA:CS) e pectina e quitosano (P:CS) poderiam estimular a adesão, proliferação e diferenciação celular, bem como os processos de angiogénese.

Contudo, como será abordado em parágrafos posteriores o comportamento destas matrizes e a sua manutenção no final do período experimental não parecem melhorar os resultados observados nos grupos 3 e 4 comparativamente com o grupo 2.

### **Presença de Bactérias**

No presente estudo experimental, a utilização da técnica de coloração *Brown & Brenn* aplicadas nos cortes histológicos das raízes que constituíram o controlo negativo permitiu demonstrar a presença de bactérias na cavidade pulpar, particularmente junto às paredes dentinárias, bem como nos túbulos dentinários. Em relação aos outros grupos, no final do período experimental não foi possível detectar, com base na mesma técnica de coloração, a existência de bactérias em quaisquer deles, com exceção de dois cortes pertencentes ao grupo 3.

Esta constatação constitui um resultado positivo, que demonstra a eficácia do hipoclorito de sódio, hidróxido de cálcio e da pasta triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) na antisepsia canalar. Não obstante, ressaltamos o facto desta técnica de coloração apresentar reconhecidamente uma significativa taxa de falsos negativos cit in 440, 442, 477.

### **Período experimental**

A escolha do período de *follow-up* deste trabalho baseou-se para além de publicações anteriores acerca deste tema, Thibodeau et al.<sup>18</sup>, Silva et al.<sup>421, 426</sup>, Wang et al.<sup>19</sup>, Zhu et al.<sup>211</sup> e Tawfik et

*al.*<sup>427</sup>, nas recomendações das normas ISO 7405/2008<sup>478</sup>, para estudos deste tipo que aconselham a eutanásia dos animais ao fim de 90 dias após o tratamento experimental.

Todavia, no final do período experimental, a maioria das raízes apresentavam um preenchimento tecidual incompleto do espaço canalar, assim como áreas residuais de matriz. Provavelmente com mais tempo e considerando os resultados dos estudos clínicos retrospectivos já publicados<sup>13, 17, 84</sup>, seria de supor que os tecidos presentes no interior da cavidade pulpar ocupassem uma maior área e não seriam certamente já detetados restos de matrizes. Do mesmo modo, seria de esperar também uma maior percentagem de encerramentos apicais. Por outro lado, com essa opção aumentaríamos o risco de aparecimento de fraturas coronárias e a presença de acentuadas perdas ósseas associadas ao aparecimento e desenvolvimento de doença periodontal, tão característica destes animais, o que poderia comprometer a avaliação do resultado dos tratamentos efetuados. Porém, Yamauchi *et al.*<sup>201, 425</sup> com utilização de um período experimental ligeiramente maior (14 semanas) não observaram diferenças significativas relativamente ao nossos resultados.

### **Histomorfometria**

A histomorfometria foi efectuada tendo por base um *software* para análise de imagem da Bioquant Osteo® 2012 Bioquant™ - Image Analysis Corporation, Nashville, Estados Unidos da América. Este programa tem a capacidade de distinguir as diferentes afinidades tintoriais dos tecidos e componentes da amostra, convertendo essa informação em quantificação de áreas, reproduções tridimensionais, determinação de densidades e outros parâmetros mais especializados. Este sistema de avaliação permite uma maior objetividade e precisão comparativamente com outros sistemas de avaliação, como a radiomorfometria<sup>479</sup> ou sistemas com escalas de graus<sup>480</sup>.

Embora o *software*, atrás referido, tenha sido concebido inicialmente para utilização em estudos de tecido ósseo, foi possível adaptar e otimizar este sistema visando quantificar áreas de quaisquer tecidos mineralizados presentes no interior do canal radicular. Este processo de quantificação histomorfométrica é de longe bastante mais rigoroso e preciso, quando comparado com os resultados descritos nos primeiros estudos efetuados neste âmbito<sup>18, 19, 421</sup>. Mesmo em relação ao trabalho realizado por Yamauchi *et al.*<sup>201</sup> os resultados morfométricos aqui apresentados parecem-nos mais completos e minuciosos.

### **Análise estatística**

A seleção dos inúmeros parâmetros por nós utilizados, baseou-se na literatura consultada para este tipo de estudos<sup>18, 19, 201, 421, 425, 440, 442, 481, 482</sup>, tendo-se constituído uma tabela de observações completa e pormenorizada. Mas, infelizmente, a elaboração de uma vasta lista de parâmetros de ava-

liação, traduz-se numa dificuldade acrescida de interpretação e de comparação com outros estudos, tendo-se recorrido a uma análise univariada.

Na literatura que tenhamos conhecimento até a data, não existem parâmetros histológicos bem definidos que avaliem com rigor este tipo de intervenção procurámos, pois, clarificar este ponto. Assim, com este intuito decidimos recolher o máximo de informação e além de utilizarmos as variáveis dos estudos já publicados nos trabalhos anteriores sobre revascularização<sup>18, 44, 421</sup>, complementámos com outros parâmetros adicionais<sup>440, 442, 481, 482</sup>. A realização de uma estatística multivariada, embora no nosso caso com carácter exploratório, possibilitou-nos saber de entre as inúmeras variáveis estudadas conhecer quais as que contribuíram mais para os resultados observados. Deste modo, permitiu-nos saber e aconselhar quais os parâmetros que nos transmitem mais informação, assim como a sua correlação, ou seja se possuem uma contribuição positiva ou negativa. Este assunto será abordado mais à frente.

Tewary *et al.*<sup>483</sup> consideraram a interpretação das imagens radiológicas como subjetiva, independentemente de serem efetuadas em sistemas convencionais ou digitais. Segundo estes autores, e na nossa opinião, os fatores que parecem ter maior impacto estão quase sempre relacionados com os anos de experiência do clínico e com a familiaridade do operador com o sistema radiológico em questão.

No nosso estudo, foi possível obter entre os operadores, após uma calibração inicial, um elevado consenso entre a interpretação radiográfica inicial dos três avaliadores e a avaliação radiográfica do sucesso/insucesso do procedimento regenerativo.

Com esta interpretação radiográfica foi possível reduzir a informação da distribuição das variáveis a uma só dimensão, assim como os seus pesos.

Com a análise multivariada, além da determinação das variáveis com valor preditivo no resultado (encerramento apical, preenchimento canal, vascularização, reabsorção/reparação de tecidos mineralizados, infiltrado inflamatório e espessura do ligamento periodontal), foi também possível determinar qual o seu modo de influência (positivo ou negativo). Assim, através da análise destas seis variáveis poderemos prever com um grande grau de exatidão de 90,1%, o sucesso, ou não da intervenção. Deste modo, facilmente se compreende a correlação demonstrada entre estas variáveis predictoras. Porém a presença de encerramento apical por si só dá um grau de exatidão de 85,7%.

Em síntese, com este modelo animal e metodologia aplicada, foi possível suportar uma correta análise estatística dos resultados recorrendo a um reduzido grupo de animais, uma vez que pôde ser utilizado um elevado número de raízes por cada animal. Para além disso, permitiu-nos estabelecer muitas comparações com os trabalhos já publicados que tiveram por base a utilização de modelos experimentais semelhantes.

Este tipo de análise multivariada parece dar um contributo importante para o prognóstico destas situações.

## **MTA e Apexificação**

A técnica de apexificação com MTA é considerada uma técnica de eleição, muito eficaz para casos de tratamentos endodônticos de dentes com necrose pulpar e com ápices abertos.

Têm sido atribuídas ao MTA, algumas propriedades importantes, particularmente a capacidade de indução (estímulo) e condução (suporte) de tecidos mineralizados, para além de uma atividade antibacteriana, resultante do seu alto valor de pH<sup>415,416,484,485</sup>. O MTA é pois considerado um material bioativo com grande atividade dentinogénica, cementogénica ou mesmo osteogénica, sendo inquestionáveis os bons resultados decorrentes da sua aplicação<sup>486,487</sup>. Também no presente estudo, acentuamos os bons resultados obtidos e atribuídos ao MTA, de forma dominante e consistente, e o facto de se verificar uma boa tolerância dos tecidos periapicais a este material.

Sob um ponto de vista técnico pode afirmar-se que as obturações canalares com MTA apresentaram uma densidade e homogeneidade compatíveis com um elevado padrão de qualidade preconizado para esta etapa do tratamento. Não obstante, no presente trabalho foram registados alguns casos com uma ligeira extrusão deste material para os tecidos periapicais. Nas situações em que houve extrusão do MTA (em 44 % dos casos, ou seja, 8 dos 18 casos do grupo I), somente três raízes (16,7%) não apresentaram formação de tecidos mineralizados na proximidade do MTA.

As situações de extrusão de material, ainda que ocorram com alguma frequência devem, no entanto, ser evitadas, pois podem prejudicar as reações químicas de presa do material, tornando menos previsível as qualidades biológicas do produto final, o que pode interferir com a cicatrização dos tecidos periapicais ou com o encerramento apical completo<sup>491, 495</sup>.

Nos casos em que se verifique extrusão do MTA será recomendado a realização de controlos a longo prazo, de modo a avaliar o processo de cicatrização<sup>491, 493, 495</sup>. Hachmeister *et al.*<sup>466</sup> referem ainda que a aplicação da barreira apical pelo canal (ou seja, não cirúrgica) é bem mais sensível que por via cirúrgica, exigindo por isso maiores cuidados e atenção.

Ainda que não fosse o objetivo deste estudo, não verificámos uma correlação estatística significativa entre a presença de extrusão de MTA e a ausência de formação de pontes mineralizadas. No entanto, quando a extrusão está presente não se observa a formação de pontes completas na porção apical. Estes aspetos vão, de certo modo, de encontro aos estudos de Felipe *et al.*<sup>482</sup> e Holland *et al.*<sup>481</sup> que referem que o material quando colocado dentro dos limites canalares apresenta melhores resultados do que quando ocorre extrusão.

De facto, Felipe *et al.*<sup>482</sup> descreveram um estudo de apexificação com MTA, tendo por base dois grupos diferentes. O primeiro só com MTA e o segundo sujeito a uma aplicação prévia de medicação intracanal com uma pasta de hidróxido de cálcio/ propilenoglicol, antes da utilização do MTA. Estes autores referem a ocorrência de extrusão do MTA em 7,7% dos casos observados no primeiro grupo e 75% no segundo, concluindo a existência de uma forte correlação entre o uso

de hidróxido de cálcio e a taxa de extrusão de MTA. Na nossa opinião, os piores resultados observados no segundo grupo ficaram à dever-se mais a características intrínsecas do propilenoglicol do que propriamente ao hidróxido de cálcio, pelo que deverá ter-se em conta as propriedades físicas (oleosas/lubrificantes) do veículo utilizado. No entanto, não é também de descurar a atividade de dissolução do hipoclorito de sódio e do hidróxido de cálcio sobre os tecidos vitais ou mesmo necrosados existentes na porção apical, provocando uma destruição dos tecidos periapicais capazes de exercer resistência e oposição à progressão do MTA. De referir ainda que já em 1999, Shabahang *et al.*<sup>73</sup> observaram a extrusão deste material em duas situações num total de 14 casos, sendo que um deles não apresentava formação de tecidos mineralizados.

Também têm sido relatados diversos casos clínicos de extrusão do MTA, durante a técnica de apexificação<sup>491-495</sup>. Neste âmbito, Mente *et al.*<sup>494</sup> num primeiro estudo retrospectivo, não destacaram as situações de extrusão apical de MTA, não lhe atribuindo qualquer importância nos resultados clínicos observados, uma vez que não foram estatisticamente significativas as diferenças entre os casos obturados no limite ideal ou sobreobturados. Posteriormente, os mesmos autores<sup>83</sup>, avaliando um maior número de casos e com mais tempo de *follow-up*, constataram um prognóstico menos favorável nos casos com extrusão de MTA.

Por sua vez, Lopes e Siqueira<sup>496</sup> recomendam, na execução da técnica de apexificação, a utilização prévia de certos materiais reabsorvíveis (pó de hidróxido de cálcio, sulfato de cálcio ou matrizes) tentando criar uma barreira apical mais eficiente visando impedir o extravasamento do MTA para fora do canal radicular, sobretudo em casos de ápices com paredes muito divergentes para apical. Do mesmo modo, Castellucci<sup>497</sup>, Vanka *et al.*<sup>498</sup>, Sood *et al.*<sup>499</sup> e Rudagi *et al.*<sup>500</sup> referem que a utilização de matrizes reabsorvíveis (como a membrana de colagénio reabsorvível ou plasma enriquecido com plaquetas) não apresenta qualquer contraindicação, apesar de geralmente a resistência dos tecidos apicais ser suficiente para a prevenção da extrusão. De referir ainda, que após completar a colocação do MTA em apical, deve realizar-se um controlo radiográfico e caso o resultado não seja satisfatório, Castellucci<sup>497</sup> recomenda a remoção do MTA, recorrendo a uma irrigação com uma solução salina e a repetição do procedimento para criação da barreira apical.

De igual modo e a este respeito não podemos deixar de referir que no presente trabalho a utilização de matrizes, nos grupos 3 e 4, facilitou o processo de colocação e estabilização do MTA, em cervical, formando uma barreira muito eficaz e homogénea, capaz de prevenir a microinfiltração coronária. Por outro lado, a colocação do MTA diretamente sobre o coágulo, no grupo 2, revelou-se tecnicamente mais difícil, tendo-se verificado algumas vezes a sua disseminação para o interior do canal, interferindo deste modo com o processo de formação dos novos tecidos. De facto, podemos constatar que a utilização de matrizes pode contribuir para tornar a técnica de criação de uma barreira com MTA mais previsível<sup>201, 425</sup>.

Relativamente aos resultados de natureza histológica, observados no grupo I (apexificação), o facto de todo o lúmen do canal radicular estar preenchido com MTA impossibilitou, desde logo,

a hipótese de formação de novos tecidos em aposição à parede interna da dentina. Esta situação constitui uma das grandes limitações da técnica de apexificação ou seja, apesar de se conseguir a criação de uma barreira apical dura, mantiveram-se as paredes dentinárias muito finas e fragilizadas, o que torna o dente muito suscetível à fratura<sup>22</sup>. Porém, observámos em muitos dos casos analisados (83,3%) uma considerável deposição de cimento celular na porção externa da raiz.

É de realçar, todavia, que a característica histológica mais importante deste grupo de raízes (sujeitas à técnica de apexificação), foi a presença de áreas de tecidos mineralizados neoformados, adjacentes ao MTA, maioritariamente associadas ao encerramento apical. De facto, é visível em cerca de 83% dos casos a existência de um tecido mineralizado que caracterizámos como cimento celular, adjacente ao MTA, formando uma ponte, entre as paredes radiculares. Shabahang *et al.*<sup>73</sup> refere que 13 dos 14 casos tratados, nos seus estudos, evidenciaram também a presença de tecidos mineralizados em redor do MTA. Do mesmo modo, Felipe *et al.*<sup>482</sup> referem ainda que todos os casos tratados com MTA, apresentaram formação de uma barreira apical.

Estas observações histológicas estão subjacentes à resolução radiográfica das lesões periapicais verificadas na maioria dos casos por nós estudados (94%), bem como a um aumento da espessura das paredes radiculares (77,8%) e encerramento apical (67%).

Importa ainda assinalar que o tecido mineralizado neoformado está envolvido por ligamento periodontal e apresenta uma perfeita continuidade com o cimento celular presente nas restantes zonas periodontais. Este resultado é similar ao descrito por Felipe *et al.*<sup>482</sup>. Por outro lado, Holland *et al.*<sup>481</sup> referem que na maioria dos casos com extrusão de MTA, havia desorganização do ligamento periodontal, parcial ou mesmo total, com presença de infiltrado inflamatório associado à presença de macrófagos, que continham partículas de MTA no seu citoplasma. Este aspeto foi também por nós observado em algumas situações, sendo de registar a presença habitual de grupos de macrófagos contendo partículas que julgamos ser de MTA, localizados no ligamento periodontal quer mesmo nos espaços medulares entre as trabéculas ósseas.

A libertação de iões cálcio, a partir do MTA, e a sua ligação aos fosfatos presentes nos fluidos tissulares leva à formação de um camada de hidroxiapatite que funciona como uma barreira mineralizada e cristalina de alta qualidade, com grande capacidade de selamento que vai também estimular e suportar a proliferação e diferenciação de cementoblastos e osteoblastos<sup>415,416,485-488</sup>. Por sua vez, o óxido de cálcio existente no MTA, reagindo com o dióxido de carbono presente nos tecidos periapicais dá origem à formação de um carbonato de cálcio, sob a forma de cristais de calcite, que promove uma elevada concentração local de fibronectina, estimulando a migração, adesão e diferenciação celular e conseqüente formação e mineralização de uma matriz, induzindo deste modo processos de cementogénese e de encerramento apical<sup>486,489</sup>. Com efeito, o MTA estimula a síntese de tecidos mineralizados com um alto grau de integridade estrutural, tanto na interface dentina-material como no interior dos túbulos dentinários<sup>486</sup>, constituindo por isso um material de excelência na técnica de apexificação. Para além disso, os iões hidroxilo resultantes da reação do

MTA com a água, responsáveis pela elevação local do pH, vão muitas vezes provocar uma necrose celular, com conseqüente irritação dos tecidos em redor, geralmente decorrente da libertação de mediadores pró-inflamatórios<sup>487,490</sup>. Assim, a presença localizada de certas citoquinas e quimioquinas provenientes das células necrosadas, em combinação com fatores libertados pela matriz dentinária adjacente, podem exercer um papel preponderante na diferenciação, síntese e mineralização de tecidos, tendo por base um processo de natureza inflamatória envolvendo células imunológicas e células estaminais<sup>154,487</sup>.

De registar ainda, a presença frequente de grande número de estruturas constituídas por dentina e cimento situadas em estreita proximidade e continuidade com as pontes atrás referidas. Estas formações, certamente derivadas da diferenciação das células da papila apical, parecem contribuir para um nítido crescimento e reforço radicular em comprimento, facto raramente associado aos procedimentos de apexificação com MTA<sup>73,482,501</sup>, assumindo-se como um caso de sucesso no âmbito da apexificação. Situações deste tipo, não foram, tanto quanto é do nosso conhecimento, até agora referidas na literatura.

### **Tecidos mineralizados subjacentes ao MTA formando pontes interdentinárias**

Ainda relativamente à utilização de MTA e antes de proceder a uma análise dos resultados obtidos nos grupos 2, 3 e 4, em que foram aplicadas diferentes matrizes, pareceu-nos vantajoso apresentar algumas considerações a respeito da formação de pontes de tecidos mineralizados subjacentes ao MTA normalmente localizadas na porção cervical, observadas em algumas casos.

O MTA, quando aplicado nas técnicas de protecção pulpar, pode induzir a formação de pontes de dentina reparativa, quer de um modo indirecto, através da libertação dos factores atrás referidos presentes na matriz dentinária, quer de uma forma directa pela estimulação da expressão de factores de transcrição (como o Runx2) responsáveis pela activação em células mesenquimatosas indiferenciadas de genes como o da osteocalcina, fosfatase alcalina e sialoproteínas dentinárias, associados à diferenciação odontoblástica e à formação de dentina<sup>502,503</sup>.

Importa sublinhar, no entanto, que estas pontes subjacentes ao MTA, ou relacionadas com processos de apexificação, são maioritariamente formadas por um tecido semelhante a cimento celular, sendo raramente observados túbulos dentinários na sua constituição. De facto, foi já demonstrada a capacidade do MTA para promover mecanismos de cementogénese<sup>73,481,482,501</sup>. Neste âmbito, gostaríamos de chamar à atenção para o facto de alguns investigadores<sup>127,128,442</sup> descreverem muitas das pontes dentinárias formadas em situações de protecção pulpar, como sendo constituídas por osteodentina, mas que na nossa opinião se trata maioritariamente de cimento celular, sem excluir no entanto, a presença de algumas áreas de dentina. No conjunto de imagens apresentadas na secção de resultados, é fácil observar muitas vezes um perfeito contacto e continuidade destas pontes, formadas por cimento celular, com a dentina das paredes radiculares.

Com efeito, nos grupos 2, 3 e 4 em que foram utilizadas diversas matrizes visando melhorar os processos de reparação/regeneração, foram observadas na cavidade pulpar algumas pontes de cimento celular, a unir as paredes dentinárias, muito semelhantes às encontradas nos casos de apexificação<sup>19, 484</sup>. Estas observações, não nos surpreendem considerando que o cimento celular é um tecido com funções reparadoras, muito menos exigente que a dentina, que se forma com mais facilidade em condições adversas.

### **Grupos experimentais com Matrizes (grupos 2, 3 e 4)**

A vantagem dos tratamentos endodônticos regenerativos em relação à apexificação reside na possibilidade de um espessamento e alongamento das paredes radiculares resultante da revascularização e revitalização/regeneração do espaço canal. Este facto é particularmente animador em pacientes jovens com dentes imaturos, considerando o seu ápice aberto e raízes ainda curtas.

A indução de uma hemorragia apical e a formação do coágulo, associada a uma antisepsia canal com pasta triantibiótica ou hidróxido de cálcio e a um selamento coronário eficaz representou um importante passo, senão o mais significativo, na área da endodontia regenerativa de dentes imaturos com ápices abertos. Com efeito o coágulo sanguíneo representa não só uma matriz de suporte para a migração celular como constitui também uma grande fonte de fatores de crescimento<sup>310, 325</sup> capaz de estimular a diferenciação e maturação de grande número de populações celulares. A retenção, organização e riqueza do coágulo é considerado como um pré-requisito essencial para a migração das células, proporcionando os componentes estruturais e bioquímicos responsáveis pelo início, desenvolvimento e controlo do processo de cicatrização/regeneração<sup>504</sup>.

A par desta metodologia a utilização de novos materiais com reconhecidos efeitos pró-regenerativos poderá também oferecer significativos avanços nesta área. Foi com este propósito que foram utilizados neste estudo para além do coágulo sanguíneo um conjunto de matrizes (HA:CS, P:CS) tentando criar um microambiente, que possibilitasse uma mais fácil capacidade de revascularização e revitalização ou mesmo uma regeneração pulpar.

Nos grupos experimentais 2, 3 e 4, foi possível confirmar radiograficamente, uma evolução positiva no sentido da resolução da maioria das lesões periapicais (84%). Destas situações, 61,4% apresentavam uma completa ausência de manifestações radiográficas de patologia. Foi também possível verificar um espessamento das paredes radiculares em 77,2% dos casos e encerramento apical (parcial ou completo) em 70,2%.

A análise dos resultados em microscopia de luz revelou no espaço canal, adjacente ao MTA, e na generalidade dos casos (84,2% das raízes analisadas) a existência de áreas de tecido conjuntivo bastante vascularizado, bem como a presença de tecidos mineralizados com diferentes características e localizações.

Na verdade, é visível, com frequência, a presença de zonas de tecido mineralizado com uma organização histológica de cimento celular formado em aposição à parede dentinária. Este facto será

responsável pelo aumento da espessura das paredes radiculares, situação que observámos em 85,6% dos casos em estudo. De acentuar, no entanto, que na maioria das lâminas histológicas observadas as camadas de cimento intracanal e de dentina se encontravam, por vezes, afastadas uma da outra, verificando-se um pequeno espaço entre ambas. De sublinhar ainda a existência de uma perfeita continuidade entre o cimento intracanal e o cimento constituinte do periodonto já existente.

Adjacente ao cimento recém formado, sobretudo na região apical, é visível a presença de um tecido conjuntivo com características muito semelhantes ao ligamento periodontal, verificando-se também uma continuidade com esta estrutura. De registar, no entanto, que à medida que caminhamos para coronal, a densidade celular e fibrilar vai diminuindo, apresentando-se gradualmente como um tecido conjuntivo bastante laxo. De assinalar também, que foram encontrados restos epiteliais de Malassez nestas zonas do ligamento periodontal de localização intracanal, como maior frequência nas regiões mais apicais.

Um outro achado frequentemente observado na maioria dos grupos experimentais foi a presença de áreas com nítidas características de tecido ósseo, que muitas vezes apresentavam continuidade com as trabéculas ósseas que constituíam a parede alveolar da região periapical.

O conjunto das estruturas atrás descrito, presentes no espaço canal, parecem representar um processo de migração e invasão dos tecidos constituintes do periodonto para o interior do canal pulpar, situação certamente facilitada pela dimensão do ápice<sup>428</sup>. Com efeito o grande diâmetro do ápice imaturo (aberto), pode promover o crescimento de vasos e de tecidos para o interior do canal radicular, situação também verificada em diversos trabalhos experimentais<sup>8, 18, 108, 201, 421, 425, 426, 505</sup>.

Considerando que o cimento e o tecido ósseo neoformados no interior dos canais radiculares não são componentes normais do tecido pulpar, parece estarmos em presença de um processo de revitalização do espaço pulpar e não de uma verdadeira regeneração<sup>124</sup>.

Por sua vez, os resultados por nós observados, nas zonas periapicais, ao contrário do que se verificou na cavidade pulpar, podem ser interpretados mais como processos regenerativos, do que reparativos.

Neste contexto importa referir que, nos casos de lesões periapicais a velocidade e a capacidade de cicatrização (após um tratamento endodôntico) é geralmente de cerca de 80%<sup>506</sup>, enquanto que em situações de patologia pulpar a taxa de sucesso das proteções pulpares ou pulpotomias é mais imprevisível<sup>388</sup>. Apesar de na maioria dos estudos estas taxas serem mais baixas, situando-se entre 30 e 50%<sup>507-509</sup>, existem no entanto relatos de taxas de sucesso entre 70-90%, para o tratamento de proteção pulpar com MTA em exposições por cárie<sup>510</sup>. Estas diferenças de resultados parecem ficar a dever-se a diversas fatores, nomeadamente a variações nos procedimentos clínicos e experiência do operador. Contudo, a incapacidade de avaliar clinicamente o real estado inflamatório dos tecidos pulpares antes do tratamento, ou seja se estamos perante uma situação reversível ou irreversível, é também mais um elemento acrescentar para as diferenças nos resultados observados<sup>386</sup>.

Tendo em conta que os dentes extraídos às 3 semanas para controlo negativo pulpar não apresentavam, de um modo geral, quaisquer tecidos considerados viáveis, facilmente se compreende que a deposição de novas camadas de dentina seria altamente improvável. Assim, o aparecimento de novos tecidos no espaço canal (que foram observados na maioria dos casos) tiveram origem noutras áreas não tão gravemente afetadas e mais ricamente vascularizadas que conservaram ainda a sua capacidade de diferenciação e proliferação e que no caso presente atribuímos aos elementos constituintes do periodonto.

É de assinalar ainda, nos dentes extraídos às 3 semanas, a existência no espaço pulpar de extensas áreas constituídas por fibras de colagénio que podem funcionar como uma estrutura tridimensional de sustentação (matriz) contribuindo para suportar e guiar os mecanismos de migração e diferenciação celular e tecidual.

Em síntese, os tratamentos aplicados permitiram a revascularização de dentes imaturos e a recuperação de um estado vital no canal pulpar, possibilitando um desenvolvimento radicular para apical da restauração, traduzido por um aumento, ainda que mais significativo em espessura (85,6%) do que em comprimento (45,6%), das paredes radiculares a par de um frequente encerramento apical, observado em 66,7% dos casos.

De sublinhar ainda, que consideramos um verdadeiro crescimento radicular em extensão apenas quando a papila apical conseguiu sobreviver e desenvolver-se em perfeita continuidade e em estreita proximidade à raiz correspondente. Caso de verifique um afastamento ou lesão desta estrutura (papila apical) o crescimento em sentido vertical apresenta-se muito mais limitado e, quando presente, será devido quase exclusivamente à formação e crescimento de áreas de cemento celular em redor da extremidade apical do canal radicular.

Apesar da possibilidade teórica de uma maior eficácia nos processos de regeneração com aplicação de novas matrizes (grupo 3 e 4), veio a comprovar-se na realidade que o seu comportamento ficou aquém do esperado. De facto, foram encontrados melhores resultados apenas com a indução, formação e estabilização do coágulo (grupo 2) do que com a adição das matrizes (grupo 3 e 4). Com efeito, no grupo 2 obtiveram-se 52,6 % de casos com preenchimento total da cavidade pulpar disponível. No grupo 4 (P:CS) encontraram-se apenas 15,8% de casos de preenchimento total e no grupo 3 (HA:CS) não se observou preenchimento total em nenhum dos casos.

Relativamente à percentagem de tecidos mineralizados formados na cavidade pulpar, mais uma vez o grupo 2 (coágulo), se destaca dos restantes com 39,4% de áreas ocupadas com tecidos mineralizados, seguido do grupo 4 com 17,4% e do grupo 3 com 11,1%.

Por outro lado, a presença no final do período experimental de grandes áreas ocupadas por matrizes foi visível no grupo 3 e 4, sendo maior no grupo 3 (37,2%) do que no 4 (27,7%). Este facto, dever-se-á certamente, a uma lenta biodegradação das matrizes (mais para o HA:CS do que para a P:CS), associada a uma certo efeito de barreira à migração e desenvolvimento de células e tecidos para o interior do espaço pulpar.

Sabendo que o quitosano se caracteriza pela grande solubilidade em soluções ácidas, (devido à existência de grupos  $\text{NH}_2$  livres e facilmente protonáveis em pH inferior a 6 e insolubilidade em pH superior a 6,5, a redução da biodegradação das matrizes, poderá estar relacionada com a subida do pH<sup>215,247</sup>. Com efeito a alcalinização do meio associada à utilização do MTA poderá provocar uma certa insolubilidade do quitosano, elemento comum às duas matrizes.

Por sua vez, a baixa velocidade de degradação destas matrizes pode contribuir para a manutenção de um estímulo inflamatório mais prolongado, que pode justificar o infiltrado inflamatório encontrado (maior para o HA:CS do que para P:CS), bem como um atraso na resposta reparativa/regenerativa.

A este respeito importa referir que numa fase inicial o quitosano parece estimular a libertação de citocinas e quimioquinas inflamatórias pelas células fibroblásticas, bem como a migração de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos<sup>293</sup>. Este facto, poderá ter uma repercussão negativa se atendermos às condições em que se encontra o tecido pulpar, ou seja numa cavidade de paredes rígidas e sem irrigação colateral<sup>288</sup>. Mas, por outro lado, está também demonstrado<sup>293</sup> que numa fase final de cicatrização, apresenta uma grande atividade angiogénica e de reorganização da matriz extracelular e tecido de granulação, aspetos que nos pareceram favoráveis a processos de regeneração.

Eventualmente a introdução de períodos de avaliação mais longos permitir-nos-iam obter respostas mais favoráveis com estas matrizes.

Com base numa análise estatística multivariada, foi possível constatar e confirmar que a presença de áreas de reabsorção nos tecidos mineralizados constituintes da parede dentinária sem reparação, de infiltrado inflamatório e a maior espessura do ligamento periodontal representam, no seu conjunto, sinais de mau prognóstico. Importa alertar também para uma correlação direta entre a presença de infiltrado inflamatório e o espessamento do ligamento periodontal, facto este já anteriormente assinalado por Santos<sup>440</sup>. De referir que, no presente trabalho, para além de um grande número de casos em que não se registaram áreas de reabsorção na parede radicular, foram também observadas muitas situações em que se verificou uma reparação completa das áreas previamente reabsorvidas, num total de 69,3 % (49 em 75) de casos. Este mecanismo de reparação só se verifica em presença de um ambiente propício ao desenvolvimento de novos tecidos que ficará a dever-se a um controlo eficaz da infeção (através da antisepsia e medicação intracanal) assim como a um selamento coronário efetivo.

Por outro lado, o preenchimento canal, os sinais de vascularização e o encerramento apical quando presentes influenciam positivamente o resultado, sendo sinais favoráveis de sucesso. Estes três parâmetros estarão de certo modo correlacionados, uma vez que o preenchimento canal com tecidos conjuntivos (mineralizados ou não) a par de uma boa vascularização vão certamente resultar num melhor encerramento apical.

Por fim, apraz-nos registar que embora em escasso número, foi possível observar alguns casos em que se verificaram, em simultâneo, áreas de regeneração do tecido pulpar justapostas a regiões em que se formaram tecidos mineralizados característicos do periodonto. Na verdade, de entre os nossos resultados, verificaram-se cinco casos (4 casos no grupo 2 e 1 no grupo 4) em que foi possível observar a presença de uma extensa camada de células odontoblásticas, adjacente a uma zona de pré-dentina e dentina recém formada, que consideramos como uma área em que se verificou um verdadeiro processo de regeneração do complexo pulpo-dentinário. Este facto, foi quase sempre observado em apenas uma das paredes dentinária, nunca tendo sido encontrada uma cavidade pulpar completamente regenerada e revestida, na sua totalidade, por células odontoblásticas.

A formação desta nova matriz dentinária adjacente à dentina primária e secundária, sintetizada por odontoblastos neoformados pode ser da responsabilidade da diferenciação odontoblástica das células estaminais da papila apical (SCAPs). Nestes casos verificou-se também, um verdadeiro crescimento em comprimento da raiz. Assim, os odontoblastos recém formados provenientes da SCAPs, permitiram completar o processo de crescimento e maturação da raiz<sup>24, 98</sup>.

Por outro lado, também poderia ocorrer um mecanismo de diferenciação das células estaminais pulpares (DPSCs), existentes em áreas de tecido pulpar que resistiram às agressões ou mesmo à sobrevivência de odontoblastos primitivos, que continuaram a formar dentina na parede radicular<sup>24, 374</sup>. Qualquer destes processos resulta apenas no aumento da espessura das paredes dentinárias.

Embora num estado de pulpíte irreversível ou necrose parcial, é possível que num dente imaturo, os nichos de células estaminais da polpa e da papila apical, possam ter conseguido sobreviver e após um processo de antissepsia adequado encontrar condições que possibilitassem a regeneração de algumas zonas do espaço pulpar. Com efeito, Alongi *et al.*<sup>392</sup> confirmaram a existência de células estaminais viáveis em situações de pulpíte salientando o facto de apresentarem uma diminuição do seu potencial dentinogénico, certamente devido ao efeito de certas citocinas como o TNF- $\alpha$  e IL-1<sup>15, 392</sup>. Pelo contrário, Pereira *et al.*<sup>393</sup> afirmam que nestas condições as células estaminais não apresentam diferenças quanto à sua morfologia, taxa de proliferação e potencial de diferenciação.

Também os casos em que houve formação de dentina terciária e/ou de pontes de dentina resultaram provavelmente da sobrevivência e maturação de células pulpares indiferenciadas. De sublinhar ainda que a formação de pontes constituídas por cimento e dentina, mas sobretudo por dentina só se verificam em situações em que houve manutenção da camada odontoblástica.

Nos estudos até agora publicados, utilizando este modelo animal e metodologia semelhante, e que tenhamos conhecimento até à data, foi apenas possível observar a sobrevivência parcial de áreas de tecido pulpar com uma camada intacta de células odontoblásticas em apenas numa raiz<sup>19</sup>. Todos os outros estudos<sup>201, 211, 421, 425, 426</sup> não relataram quaisquer casos em que se observasse neoformação de dentina.

No presente trabalho foram alcançados resultados bastante semelhantes aos divulgados por quase todas as equipas de investigação nesta área<sup>18, 19, 201, 421, 425, 426</sup>.

Com efeito, estudos realizados por Thibodeau *et al.*<sup>18</sup> e mais tarde complementados por Wang *et al.*<sup>19</sup> tendo por base uma análise histológica mais aprofundada, concluíram que o processo de revitalização em dentes imaturos com polpa infectada e periodontite apical permitia o crescimento de tecidos para o interior do espaço canal. Os tecidos presentes no espaço pulpar eram constituídos por cimento, ligamento periodontal e tecido ósseo. Estes investigadores, referiram também que apesar da revitalização ser um tratamento mais favorável do que a apexificação, não poderia ser considerado como um mecanismo de regeneração.

Silva *et al.*<sup>421</sup> observaram também a existência de tecidos conjuntivos mineralizados e não mineralizados no interior do canal radicular com origem periodontal.

De referir ainda os trabalhos de Yamauchi *et al.*<sup>201</sup> que apesar de apresentarem algumas variações no sentido de melhorar a estabilização das matrizes de suporte e a interface com a matriz dentinária não conseguiram mesmo assim, regenerar o complexo pulpo dentinário, continuando a obter resultados idênticos aos anteriormente descritos. Mais tarde, Yamauchi *et al.*<sup>425</sup> tendo por base o mesmo estudo experimental, procederam à caracterização imunohistoquímica dos tecidos formados no interior da cavidade canalar valorizando pequenas diferenças na sua composição, sobretudo no que respeita à camada de cimento intracanal neoformado. Estes autores designaram este tecido, que consideramos cimento, como um tecido mineralizado com características únicas que não pode ser classificado como cimento, embora seja muito semelhante. Tendo em conta o seu aspeto histológico típico, a sua localização (intimamente adjacente ao ligamento periodontal) e a nítida continuidade com o cimento radicular, discordamos desta opinião.

Uma revisão recente feita por Andreasen e Bakland<sup>435</sup>, descreve para a cicatrização do espaço canal a possibilidade de ocorrência de quatro resultados diferentes: a) revascularização do tecido pulpar com uma formação acelerada de dentina, conduzindo a um obliteração canal; b) presença de cimento e ligamento periodontal; c) presença de cimento, ligamento periodontal e tecido ósseo e d) presença de tecido ósseo e medula óssea.

Paralelamente a estes estudos surgiram outros investigadores que desenvolveram trabalhos de identificação e deteção das populações celulares responsáveis pela diferenciação e crescimento dos tecidos formados no interior do espaço canal, bem como dos principais fatores de crescimento/citoquinas capazes de estimular o *homing* destas células para a cavidade pulpar.

É neste âmbito que destacamos o trabalho de Lovelace *et al.*<sup>96</sup> que demonstrou pela primeira vez e em humanos que a indução da hemorragia desencadeia uma significativa acumulação de células estaminais mesenquimatosas indiferenciadas (no espaço canal), envolvidas nos mecanismos de regeneração dos tecidos pulpares. Com efeitos estes autores, com recurso a técnicas de imunocitoquímica e de reação da polimerase em cadeia (PCR) em tempo real, demonstraram que a intensidade de células marcadas com CD105, CD73 e STRO-1, recolhidas do espaço canal (após a indução da hemorragia) era muito superior (na ordem das centenas) aos níveis encontrados na corrente sanguínea. Concluíram, pois, que a manipulação por disrupção mecânica das estruturas pe-

irradiculares, em paralelo com a indução da hemorragia deverá representar uma etapa importante e básica aos diferentes protocolos de endodontia regenerativa, responsável pela libertação, para o espaço canal, de células estaminais existentes nestes tecidos. Ainda que não esteja determinada com rigor a principal fonte de origem destas células, tudo indica que em condições ideais seriam as células estaminais residentes nos nichos na papila apical<sup>24</sup>. Porém, as células estaminais que invadem o canal, podem também ser provenientes de outros tecidos, adjacentes ao ápice radicular como o ligamento periodontal, osso alveolar/ medula óssea ou mesmo do folículo dentário<sup>163,511</sup>. Esta situação deverá ser bem mais frequente que o desejável uma vez que encontramos no espaço pulpar uma predominância de tecidos de origem e natureza periodontal. Por último, é importante referir que, a hemorragia que invade o espaço canal irá certamente facilitar o transporte destas células para o interior da cavidade pulpar e que a utilização de matrizes com efeitos pró-regenerativos poderá ajudar a criar um microambiente propício à regeneração do complexo pulpo dentinário.

O recurso ao transplante de células estaminais dentárias descrito e aplicado pela maioria dos investigadores com trabalhos nesta área<sup>15,211,216</sup>, raramente conduziu à neoformação de matriz dentinária com características semelhantes à dentina primária. Com efeito, o grupo de Huang *et. al.*<sup>15</sup> afirma que apesar de conseguir uma melhoria gradual no processo de regeneração do complexo pulpo-dentinário, (com base no transplante de várias linhas de células estaminais dentárias e diferentes tipos de matrizes), refere também a dificuldade na obtenção de um tecido como uma constituição estrutural e funcional semelhante à dentina. Na verdade, os melhores resultados observados na maioria dos seus estudos experimentais<sup>15</sup>, mostraram a formação de uma camada de dentina fina, descontínua, desorganizada e aparentemente pouco resistente<sup>15,216</sup>. O facto de Huang *et. al.*<sup>15</sup> terem utilizado células estaminais não só provenientes da polpa dentária, mas também da papila apical poderá justificar grande parte do seu êxito neste estudo.

Por sua vez, Zhu *et al.*<sup>211</sup> utilizando um modelo animal semelhante e um protocolo de pulpetomia, sem indução de periodontite apical mas com recurso ao transplante de células estaminais pulpares e plasma enriquecido com plaquetas (PRP), para além da indução do coágulo, obtiveram apenas a formação de cemento e ligamento periodontal. Estes autores concluíram que estes procedimentos (transplantação de células estaminais pulpares e PRP) não trouxeram nenhuma alteração nos tecidos recém formados quando em comparação com o coágulo sanguíneo.

Por outro lado, mesmo Wang *et al.*<sup>216</sup>, aplicando uma matriz colagénica(Gelfoam) à qual foram adicionadas células estaminais pulpares autólogas, referem um processo de regeneração pulpar e neoformação de matriz dentinária, mas muito residual.

Por fim importa referir alguns relatos de séries de casos de índole clínica assentes em protocolos de revascularização, confirmados essencialmente por análises radiográficas e avaliações clínicas<sup>9-13, 16, 17, 45, 103-113, 115, 118, 120, 360, 431</sup> afirmando que esta modalidade de tratamento será sempre preferível à apexificação tradicional. Porém e como é natural, são escassos os estudos

acompanhados de análises histológicas realizados em dentes humanos sujeitos a um procedimento de revascularização/regeneração visando esclarecer a natureza dos tecidos neoformados no espaço canal e regiões periapicais. Neste âmbito, convém salientar os trabalhos de Shimizu *et al.*<sup>432</sup> e Martin *et al.*<sup>433</sup> que incluem excepcionalmente uma análise histológica de dentes que após tratamento sofreram fraturas e que por este motivo foram extraídos<sup>432, 433</sup>.

Martin *et al.*<sup>433</sup> num dente com um diagnóstico inicial de necrose pulpar e periodontite apical e com dois anos de evolução após um procedimento de revascularização (utilizando plasma enriquecido com plaquetas para além de coágulo), descrevem também a presença de tecidos mineralizados similares a cimento e tecido ósseo no interior do canal. Registraram ainda a ausência de qualquer camada de células odontoblasticas ou HERS no ápice radicular. Este estudo permite antever uma correta extrapolação dos resultados obtidos em modelos animais para a espécie humana. A este respeito é impossível não deixar de referir o trabalho de Nygaard-Ostby e Hjortdal<sup>93</sup> realizado em humanos em 1971, que descreve a presença de cimento celular a revestir o interior das paredes dentinárias da maioria dos dentes sujeitos a um tratamento de bio/necropulpetomia, sobreinstrumentação com ou sem indução do coágulo sanguíneo e preenchimento parcialmente dos canais.

Por sua vez, Shimizu *et al.*<sup>432</sup>, observaram no interior do canal radicular, de um dente com pulpite irreversível mas sem lesão periapical, a presença de um tecido semelhante à polpa, uma camada de odontoblastos adjacente à pré-dentina e ausência de tecidos mineralizados no lúmen do canal, detetando ainda a presença de células semelhantes a HERS, em redor do ápice. Estes resultados foram observados apenas três semanas e meia após um procedimento de revascularização. Estas circunstâncias, ou seja uma polpa infectada, mas não totalmente necrosada, poderia ter possibilitado a obtenção destes resultados espantosos em tão curto espaço de tempo.

As imagens tão diferentes obtidas nestes dois casos<sup>432, 433</sup>, podem estar mais dependentes de fatores relacionados com o diagnóstico, *timing* da intervenção e controle da infeção e inflamação, do que propriamente com o tratamento regenerativo utilizado.

Para finalizar é importante referir que a prevenção, deteção precoce do estado pulpar e tratamento atempado dos processo infecciosos/inflamatórios poderá aumentar de sobremaneira a eficácia dos mecanismos de regeneração, minimizando os processo de reparação. Somos de opinião que a otimização e aperfeiçoamento destes passos técnicos aliada à indução e/ ou enriquecimento do coágulo e preservação da integridade estrutural dos tecidos periapicais (particularmente da papila apical) será mais eficaz do que propriamente investir nos processos em transplantação celular.

Sem perder uma perspetiva global dos resultados e dada a especificidade e variedade dos tecidos encontrados no espaço canal pareceu-nos vantajoso apresentar algumas considerações acerca de cada um deles individualmente, bem como algumas tentativas de interpretação da sua presença ectópica.

### **Cimento celular**

Enquanto o cimento acelular pode ser considerado um tecido único o cimento celular partilha grandes semelhanças morfológicas funcionais e bioquímicas com o tecido ósseo<sup>127, 512, 513</sup>.

Por sua vez, o cimento celular constitui um tecido de reparação por excelência, que pode ser encontrado não só no periodonto como também na cavidade pulpar, de que são exemplos certas calcificações intrapulpare, preenchimento de áreas reabsorvidas pelos odontoclastos durante os processos de exfoliação dos dentes decíduos e algumas pontes dentinárias, para além da presença fisiológica de cimento na face interna do *foramen* apical.

Por outro lado, o cimento celular apresenta-se como um tecido menos exigente quando comparado com o tecido ósseo ou com a dentina, que se forma com mais facilidade e maior rapidez em situações adversas, uma vez que é um tecido avascular e bastante desestruturado. Neste contexto é interessante salientar que independentemente das terapias regenerativas utilizadas em processos de regeneração/ reparação periodontais em seres humanos encontra-se sempre como resultado final a presença de um cimento celular<sup>514</sup>. Isto é, quaisquer que sejam as metodologias aplicadas, não parecem influenciar o tipo de cimento reparador neoformado<sup>514</sup>.

As células estaminais/progenitoras responsáveis pela formação e regeneração do cimento tem origem nos nichos pericapilares presentes no ligamento periodontal<sup>1378, 515</sup>. Com efeito, parece confirmar-se um fluxo contínuo de células capazes de se diferenciarem na linha fibroblástica, cementoblástica ou osteoblástica, a partir das células endoteliais e ou dos pericitos constituintes da parede vascular dos novos vasos sanguíneos formados no ligamento periodontal aquando dos processo de reparação /regeneração, recapitulando os mecanismos de desenvolvimento embrionário<sup>515</sup>.

Considerando ainda que a diferenciação das células estaminais está fortemente regulada por fatores extrínsecos às células, como as características do microambiente extracelular em que se encontram, facilmente se compreende que, a expressão final dos diferentes fenótipos celulares presentes no ligamento periodontal possa depender de um *cross-talking* entre as células estaminais/progenitoras e os componentes da matriz extracelular em seu redor<sup>516</sup>. Assim, quando em contacto com a matriz dentinária as células estaminais vão diferenciar em cementoblastos, situação a que não será alheia, a influência dos restos da bainha radicular epitelial de *Hertwig*, também visíveis no espaço canal. Deste modo parece-nos natural, a formação de cimento celular adjacente à dentina e/ou pré-dentina aquando da invasão do ligamento periodontal para o interior do espaço canal.

Uma outra hipótese possível para a presença de cimento no interior do espaço pulpar é defendida por Cotti *et al.*<sup>11</sup> que referem um crescimento direto da camada de cimento constituinte dos tecidos periapicais para o interior do espaço canal.

Por último, é necessário recordar que o preenchimento de áreas de dentina reabsorvida verifica-se sempre à custa da aposição de cimento celular. Esta situação, característica da superfície externa da dentina, pode também observar-se, como ficou demonstrado no capítulo de resultados, na sua face interna, se as condições assim o permitirem, uma vez que, como já foi referido, o cimento celular constitui no dente o principal tecido de reparação.

### Interface entre dentina e cimento intracanal

Na maioria das imagens histológicas, correspondentes à generalidade dos grupos 2, 3 e 4 as camadas de cimento intracanal e de dentina encontram-se, com muita frequência, destacadas uma da outra, verificando-se um pequeno espaço entre ambas. Este aspeto, poderá ficar a dever-se a artefactos decorrentes do processamento histológico, pois nota-se uma perfeita correspondência na interface entre estes dois tecidos. No entanto, não será de excluir uma certa fragilidade na sua coesão, resultante da diferente constituição histológica destes tecidos, bem como do facto de terem sido formados em diferentes períodos.

Tendo em conta os mecanismos de formação radicular, já descritos na introdução, esta separação poderá, com grande probabilidade, resultar da ausência de uma camada de cimento de ancoragem (cimento acelular de fibras extrínsecas), responsável em condições fisiológicas pela forte ligação entre cimento e dentina. Com efeito, durante a formação do cimento intracanal os cementoblastos sintetizam matriz cementária sobre uma dentina já mineralizada não permitindo a ancoragem e mineralização simultânea das fibras colagénicas constituintes das suas matrizes. Assim sendo, facilmente se compreende a ocorrência de um plano de clivagem na interface entre dentina e cimento. Este assunto tem constituído só por si objeto de várias publicações<sup>514, 517-520</sup>.

Por outro lado, se houver um processo de reabsorção prévio da superfície dentinária haverá uma probabilidade mais forte de coesão no complexo cimento/dentina, uma vez que ficou exposta a matriz colagénica da dentina, constituindo, deste modo, uma maior possibilidade de entrelaçamento entre as fibras e os cristais da matriz da dentina e da matriz do cimento neoformado em aposição. Este mecanismo, tenta recapitular o processo de cementogénese observado aquando da formação e mineralização da dentina do manto. Neste âmbito, importa referir os trabalhos de Yamanuchi *et al.*<sup>201, 425</sup> que antes da indução do coágulo e colocação de matrizes utilizaram EDTA, visando remover a *smear layer* e expôr a malha colagénica de dentina, para assim obter uma melhor coesão. Na verdade com aplicação de EDTA conseguiram menor número de separações entre dentina e cimento, mas mostram também um grande receio dos efeitos sobre as células pulpares e periapicais.

A este respeito interessa referir também que apesar de recomendado pela *American Association of Endodontists* com o intuito de remoção da *smear layer*, exposição da malha de colagénio e libertação dos fatores sequestrados na matriz dentinária, o EDTA apresenta uma citotoxicidade que vai de moderada a severa<sup>521</sup>. Além disso, quando presente nos tecidos periapicais, situação que pode ocorrer durante a preparação canal, parece inibir a atividade macrofágica alterando as respostas inflamatórias dos tecidos<sup>522</sup>. Do mesmo modo, a sua alta capacidade de tampão, requer uma grande quantidade de agentes químicos para neutralização alcalina<sup>523</sup>. Lee *et al.*<sup>462</sup> alertam ainda para a possibilidade do EDTA interferir na reação de hidratação do MTA, levando a uma diminuição da sua resistência e a uma fraca adesão celular.

Uma outra circunstância interessante por nós observada e ilustrada no capítulo de resultados foi o aparecimento de cimento celular (intracanal) adjacente à camada de pré-dentina, permitindo

talvez uma mais fácil ancoragem entre estes dois tecidos. Neste caso a aplicação de EDTA atrás referida seria desnecessária. Fica no entanto por esclarecer como se comportaram os odontoblastos nestas circunstância e como se desenvolveu a frente de mineralização. Esta questão só ficaria esclarecida com o sacrifício de animais em períodos de evolução mais curtos de modo a fazer um acompanhamento gradual e progressivo deste processo.

### **Ligamento periodontal**

Foi visível adjacente ao cimento recém formado, sobretudo na região mais apical, a presença de um tecido conjuntivo com características muito semelhantes ao ligamento periodontal(LP), verificando-se também uma continuidade com esta estrutura. Porém, é rara a presença de fibras de colagénio constituindo os característicos feixes de fibras do ligamento periodontal. De facto, à medida que caminhamos para coronal a densidade, distribuição e orientação das fibras de colagénio diminui drasticamente, apresentando-se este tecido quase como um tecido conjuntivo laxo, afastando-se cada vez mais da normal organização e composição do ligamento periodontal. De registar também, o menor número de fibras de Sharpey orientadas perpendicularmente ao cimento. De igual modo, na interface com o tecido ósseo (quando presente) é ainda mais escassa a existência de fibras de Sharpey dirigidas do ligamento para o tecido ósseo. Por todas estas razões, quanto mais nos dirigimos para o interior do espaço canal, mais difícil se torna identificar este tecido como ligamento periodontal.

Este facto resulta certamente das diferentes forças mecânicas existentes no espaço canal, quando comparadas com o que se verifica no periodonto. Com efeito, considerando a importância do binómio estrutura-função, alterando-se o ambiente biomecânico a que estão normalmente sujeitos os componentes do periodonto (ausência da participação na sustentação dos dentes) modificar-se-á também a sua estrutura e organização histológica<sup>127, 128</sup>.

Os processos de reparação do LP são semelhantes a quaisquer outros processos de cicatrização de tecidos conjuntivos. Porém, para um tecido conjuntivo, o ligamento periodontal apresenta-se excepcionalmente bem vascularizado, acompanhando o alto *turnover* dos seus constituintes celulares e extracelulares, traduzindo uma alta taxa de renovação<sup>127, 139</sup>.

Durante os mecanismos de reparação/regeneração do LP, novos fibroblastos derivados das células estaminais/ progenitoras presentes nos nichos perivasculares localizados nas regiões adjacentes à lesão migram para as áreas a reparar<sup>127, 128, 524</sup>. Com efeito, está já confirmado que as células com intensa atividade mitótica originam-se num raio de 200µm da margem da zona danificada, localizando-se primariamente, a 5µm dos vasos sanguíneos, necessitando em média de três dias para alcançarem o local da ferida<sup>376, 377, 525</sup>. São então rapidamente formadas novas fibras de colagénio, geralmente sem uma orientação funcional nem uma ligação aos tecidos mineralizados adjacentes<sup>127, 128</sup>. Com efeito foi já demonstrada a grande capacidade proliferativa das células estaminais do LP, quando

comparados com as células estaminais da medula óssea, bem como o seu potencial de diferenciação em cementoblastos, osteoblastos e adipócitos, para além de fibroblastos produtores de colagénio<sup>377</sup>.

Foi também possível identificar e isolar estas células em casos de periodontite<sup>399, 403</sup>. Por sua vez, Park *et al.*<sup>526</sup> ao compararem células estaminais presentes num ligamento periodontal considerado saudável, com células estaminais extraídas de ligamentos periodontais em situações de periodontite verificaram que não se observavam diferenças significativas, quanto à sua capacidade de diferenciação e potencial proliferativo e ainda que as células estaminais presentes nos tecidos inflamados apresentavam uma muito maior capacidade de migração. Esta constatação pode explicar, em parte, a facilidade e frequência com que se observa o desenvolvimento e crescimento desta estrutura para o interior da cavidade pulpar. Na verdade, já em 1993, Vojinovic e Vojinovic<sup>527</sup> com base em técnicas autorradiográficas demonstraram o aparecimento de processos de angiogénese e a migração das células do PL para a porção apical do canal radicular após pulpetomia em dentes imaturos.

Por outro lado, durante a agressão dos tecidos periapicais, podem ser libertados pelos tecidos lesados, moléculas sinalizadoras nomeadamente BMPs(BMP-7) e TGFs- $\beta$  que, juntamente com os processos angiogénicos, possam ser responsáveis pela regeneração do ligamento periodontal e pela indução de mecanismos de cementogénese e síntese de osso alveolar. O efeito sinérgico da BMP-7 e dos TGF- $\beta$  é crucial para a formação dos tecidos periodontais radiculares. Este processo parece também verificar-se na regeneração pós natal destas estruturas, uma vez que estas proteínas continuam a residir na matriz extracelular destes mesmos tecidos<sup>128</sup>.

É importante sublinhar também, o grande potencial das células mesenquimatosas indiferenciadas provenientes da medula óssea dada a frequência de locais de comunicação entre o LP e os espaços medulares existentes no osso alveolar adjacente, particularmente, ao longo das regiões laterais. Neste âmbito, é importante recordar que às BMMSCs com origem no estroma da medula óssea apresentam uma certa atividade telomérica<sup>25, 528</sup>.

Assim podem ser consideradas no ligamento periodontal duas diferentes fontes (*pools*) de células indiferenciadas, umas localizadas nos nichos perivascularares, outras no estroma da medula óssea<sup>127</sup>.

No presente estudo, após a resolução do processo infeccioso e inflamatório, as lesões periapicais apresentaram um grande potencial de regeneração, uma vez que estavam rodeadas por grandes áreas de LP normal e ricamente vascularizado, bem como por uma grande superfície de parede óssea, com canais de Volkman.

Em síntese, a grande vascularização do LP associado à existência de um grande número de possíveis nichos de células mesenquimatosas indiferenciadas (com uma localização perivascular ou provenientes da medula óssea) e a sua grande plasticidade, potencial proliferativo e capacidade migratória (tanto em condições fisiológicas como em situações de periodontite), podem justificar o eficaz processo de regeneração desta estrutura, bem como a sua invasão para a cavidade pulpar.

## **Tecido ósseo**

A organização do tecido ósseo intracanal mostra tratar-se de um tecido ósseo de domínio trabecular, a maioria das vezes imaturo, que muito frequentemente mostra a presença de osteoclastos, revelando mecanismos ativos de reabsorção.

A existência destas áreas de tecido ósseo foi também observada e descrita por diversos investigadores<sup>19, 201, 421, 425</sup>, tendo por base o mesmo modelo animal e metodologia aplicada.

A presença de tecido ósseo na cavidade pulpar pode resultar como decorrência da entrada, crescimento e diferenciação do ligamento periodontal e das suas estruturas adjacentes para o espaço canal. Por outro lado, ou em paralelo, tendo em conta a grande dimensão do ápice, o tecido ósseo intracanal pode apresentar-se como uma projeção, vinda diretamente do osso alveolar propriamente dito, de acordo com o que foi também referido por Skoglund e Tronstad<sup>23</sup>, da Silva *et al.*<sup>421</sup>, Yamauci *et al.*<sup>201</sup> e Srisuwan *et al.*<sup>208</sup>. De facto, verifica-se muitas vezes uma perfeita continuidade entre as áreas de tecido ósseo intracanal e o osso alveolar propriamente dito, sendo importante recordar aqui que esta camada de tecido ósseo é parte integrante do periodonto e como tal tem origem no folículo dentário ou seja é formado, tal como a polpa dentária, por ectomesênquima<sup>388</sup>.

A presença de tecido ósseo demonstra mais um vez a existência de uma rica vascularização no espaço pulpar, pré requisito essencial para a síntese de matriz óssea.

Por último, a formação de tecido ósseo na cavidade pulpar pode também ser considerada como um processo de diferenciação osteogénica das células estaminais da polpa (DPSCs)<sup>208, 351, 529-531</sup>. Com efeito, Laino *et al.*<sup>529</sup> isolaram uma sub população de DPSCs designadas por *stromal bone producing dental pulp stem cells* (SBP- DPSCs), constituindo 10 % do total de células estaminais pulpares, que apresentam uma maior capacidade de diferenciação em osteoblastos do que em odontoblastos<sup>529, 532</sup>. De facto as SBP-DPSCs, em estudos experimentais *in vitro*, sintetizam tecido ósseo e não dentina, observando-se uma alteração nos seus antigénios de superfície, durante os mecanismos de diferenciação. É interessante referir ainda que estas células mostram sempre uma reação negativa para a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), um marcador específico da dentina<sup>410, 529, 532</sup>. De registar também, que as SBP-DPSCs, durante os processos de ossificação dão origem tanto a osteoblastos como a células endoteliais, representando um modelo de diferenciação sinérgica evidenciando o *coupling* entre osteogénese e angiogénese<sup>410</sup>.

De notar ainda que, quando bem resolvidas as situações de infeção e inflamação dos tecidos periapicais são geralmente acompanhadas (como foi descrito na alínea dos resultados) por um notório reforço do tecido ósseo nestas regiões.

Liao *et al.*<sup>399</sup> confirmaram a presença de células estaminais nos tecidos periapicais inflamados (iPAPCs), demonstraram uma forte capacidade osteogénica destas células *in vitro* e *in vivo*. Neste âmbito interessa referir que as células das papila apical apresentam fortes potencialidade para se diferenciarem na linha osteoblástica, em detrimento da linha odontoblástica<sup>531</sup>. Com efeito, as células estaminais quer da polpa quer da papila quando cultivadas apresentam, após poucas passagens, uma restrição no seu potencial diferenciação, apresentando um desvio em favor de um fenótipo osteoblástica<sup>359, 533</sup>.

Finalmente, é interessante registrar no interior da cavidade canalar a manutenção da topografia e organização de todos os elementos constituintes do complexo periodontal, em muitos dos resultados apresentados, apesar de se modificarem as características anatômicas e funcionais em que normalmente se desenvolvem estas estruturas. Este facto parece pressupor a existência de uma pré-programação das células responsáveis pelo desenvolvimento final do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar<sup>127, 129, 138</sup>.

Apesar da importância exercida pela especificidade da matriz extracelular em redor das células indiferenciadas poder ser determinante para a regulação do seu processo de diferenciação, as características intrínsecas (pré-programação) de certas células podem também ter um efeito igualmente crucial no seu fenótipo final e definitivo. Este aspeto, já referido em parágrafos anteriores, é frequentemente observado nas células provenientes da crista neural como é o caso das células do ectomesênquima que formam o saco ou folículo dentário, responsável pela formação, diferenciação e regeneração do periodonto<sup>127, 129, 138</sup>.

A correta localização e manutenção da identidade regional de certas áreas (como o cimento, osso alveolar propriamente dito e organização e manutenção da espessura do ligamento) está dependente de proteínas codificadas maioritariamente por genes homeóticos (ativados em certas ocasiões nas células do ectomesênquima) que ajudam a selecionar o destino final de muitos grupos de populações celulares<sup>127</sup>.

Por outro lado, não poderá ser excluída também a influência direta das células epiteliais (no caso presente os restos epiteliais de Malassez, aliada à presença de certos fatores quimiotáticos), como relevantes elementos de regulação responsáveis pela ativação da expressão de diferentes genes homeóticos nas células do ectomesênquima adjacente envolvidos nos processos de regeneração/reparação das estruturas periodontais. Na verdade, a interação epitélio/mesênquima observada nas fases mais precoces do desenvolvimento dos germes dentários, já abordados na introdução, continuam a verificar-se nos mecanismos de reparação e regeneração dentária<sup>127</sup>.

### **Papila apical e HERS**

#### **Papila apical**

Um aspeto que nos parece importante registrar é a presença quase constante de formações mineralizadas, circundadas por ligamento periodontal, contendo restos epiteliais de Malassez, situadas a uma certa distância das raízes dentárias correspondentes. Estas áreas de tecido mineralizado são essencialmente constituídas por cimento celular e dentina, mostrando uma composição em tudo semelhante às paredes do ápice de qualquer raiz, incluindo a presença de *foramina*. Estas estruturas bastante idênticas às descritas no grupo do MTA, parecem posicionar-se ao nível do local estimado para a formação do ápice. O espaço entre estas formações e a porção mais apical da raiz correspondente está, na maior parte dos casos, ocupado por lamelas ósseas.

Estas estruturas parecem representar o desenvolvimento de um ápice radicular totalmente ou parcialmente separado da restante raiz correspondente, dependendo da sua ligação, ou não, a uma das paredes radiculares. De facto, foi possível observar na mesma raiz, uma tentativa de encerramento numa das paredes radiculares (com cimento, dentina e existência de *foramina*), enquanto a outra permaneceu aberta. Esta situação, parece ficar a dever-se a uma continuidade da parede radicular com a papila apical respetiva enquanto a outra perdeu este contacto. Deste modo não usufruiu da contribuição das células constituintes da papila apical para a formação da camada de dentina da parede radicular.

O aparecimento isolado destas estruturas, ou seja a sua separação da raiz correspondente, pode ficar a dever-se a traumatismos mecânicos ou fatores iatrogénicos, tendo em conta, que estas formações são facilmente destacáveis. Por sua vez o aumento da mobilidade dos dentes provocado pela infeção pulpar e o edema dos tecidos periapicais, podem contribuir para um excesso de mobilidade do dente atuando como uma força de separação, de forma semelhante a um traumatismo<sup>430</sup>.

A sobrevivência da papila apical poderá dever-se às suas características histológicas próprias e ao facto de estar rodeada pelo ligamento periodontal, beneficiando deste modo de uma circulação colateral, o que lhe confere uma maior resistência à infeção<sup>24</sup>.

Por outro lado, as células da papila apical podem mesmo ser estimuladas sob condições inflamatórias. A este respeito convém referir que a IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  apresentam um notável efeito na capacidade proliferativa e formação de matriz mineralizada das células da papila apical. Com efeito, foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  pode promover a proliferação da células da papila apical, assim como o aparecimento de uma matriz mineralizada<sup>534</sup>. Este facto é de grande relevância em dentes imaturos necrosados com periodontite apical, justificando a frequência com que encontramos estruturas mineralizadas constituídas por cimento celular e dentina, localizadas para apical da raiz correspondente.

De referir mais uma vez, que as células estaminais presentes na papila apical quando comparadas com as da polpa, apresentam maior número de células positivas para o marcador STRO-1, maior capacidade proliferativa, maior número de *population doubling*, maior capacidade de migração e maior capacidade de regeneração de dentina<sup>25</sup>. Por outro lado, as SCAPs apresentam grandes níveis de atividade telomérica, o que sugere um alto grau de imaturidade, bem próximo das células embrionárias<sup>25</sup>. Uma nota mais, para recordar as SCAPs como a principal fonte de odontoblastos primários, responsáveis pela formação, crescimento e maturação da dentina radicular<sup>98</sup>. Huang *et al.*<sup>98</sup> chega mesmo a designar a potencialidade e capacidade das células da SCAPs como *the hidden treasure in apical papilla*.

Por todas estas razões, é bastante surpreendente não ver descrito em nenhum artigo na área dos estudos de experimentação animal a presença destas formações, que nos parecem resultar da diferenciação da papila apical e que observamos com tanta frequência. É no entanto, importante referir três casos clínicos publicados que descrevem o desenvolvimento de um ápice radicular separado da raiz correspondente<sup>430, 535</sup>.

Consideramos estas estruturas como fundamentais e imprescindíveis para um crescimento radicular normal. A ausência de encerramento apical e de crescimento radicular em comprimento, registados em inúmeros casos tanto no presente estudo como nos trabalhos até hoje publicados parece-nos ficar a dever-se à separação entre a papila apical e a sua raiz correspondente ou então à sua destruição.

Importa referir por último que a diferenciação, desenvolvimento e maturação da papila apical não pode ser levado a cabo sem a influência da bainha radicular epitelial de Hertwig (HERS).

## HERS

A bainha radicular epitelial de Hertwig (HERS) desempenha um papel crucial no desenvolvimento radicular, quer na formação de dentina quer na formação de cimento. Do mesmo modo que se verifica na dentinogénese da coroa, a dentinogénese da raiz, necessita do contacto entre o folheto interno da HERS e as células do ectomesênquima da papila dentária<sup>24, 127, 151</sup>. Por sua vez, a diferenciação dos cementoblastos para além do contacto com a matriz dentinária, requer também a interação da HERS com as células do ectomesênquima do folículo dentário. Bosshardt e Nanci<sup>513</sup> e Zeichner-David<sup>178, 185</sup> chegam mesmo a referir que o desenvolvimento radicular é regulado pela HERS e não pela papila apical. Com efeito a HERS vai guiar e modular o desenvolvimento radicular.

Por outro lado, parece estar comprovado que a HERS consegue sobreviver a periodontites apicais em dentes permanentes imaturos com polpa infetada após procedimentos de apexificação. Ou seja, se a HERS ou os restos epiteliais de Malassez sobreviverem às lesões inflamatórias serão capazes de induzir as células estaminais do ligamento periodontal para um processo de diferenciação em cementoblastos promovendo o desenvolvimento da raiz e a regeneração das estruturas do periodonto<sup>177</sup>.

De facto, Dominguez *et al.*<sup>70</sup> e Heithersay<sup>181, 536</sup> afirmam que após apexificação de dentes permanentes imaturos a HERS é mais resistente que a própria papila apical a situações de periodontite ou abscessos apicais.

Por sua vez, os restos epiteliais de Malassez (ERMs) ao permanecerem no ligamento periodontal durante toda a vida, devem continuar a exercer um papel importante, certamente relacionado com os mecanismos de reparação e regeneração tanto do cimento como do ligamento periodontal<sup>178, 537</sup>. É cada vez maior a noção de que os ERMs possuem um papel decisivo nas diferentes funções do periodonto, quer na sua manutenção quer na sua reorganização, situação frequentemente traduzida pelo sucesso clínico da utilização dos extratos de proteínas derivadas da matriz do esmalte nos mecanismos de regeneração periodontal<sup>171, 537, 538</sup>.

Como já foi referido na introdução, importa sublinhar que a proliferação dos ERMs é evidente em aproximadamente 52% das lesões de periodontite apical<sup>183</sup>. Esta hiperplasia é causada pelo estímulo de fatores de crescimento e citocinas produzidas durante a resposta imunoinflamatória e estará certamente relacionada com os processo de resposta reparativa/regenerativa<sup>183, 184</sup>.

Por sua vez foi já demonstrado também que estes agregados de células epiteliais reagem a situações de stress mecânico aumentando o seu índice de proliferação durante a erupção dentária e durante os movimentos ortodônticos<sup>539</sup>. De facto, os ERMs parecem prevenir mecanismos de reabsorção radicular, mas ao mesmo tempo participam nos processos de remodelação do periodonto associados a movimentos dentários através da secreção de prostaglandinas E2<sup>537,540</sup>, bem como devido ao seu envolvimento direto com elementos nervosos<sup>538,541</sup>.

Como considerações a reter importa destacar o aparecimento de restos epiteliais de Malassez visíveis em zonas do ligamento periodontal de localização intracanal, que podem derivar da fragmentação da HERS que cresceu com o ligamento periodontal para o interior da cavidade pulpar, ou serem o resultado duma hiperplasia de origem inflamatória de localização periapical. A frequência destes achados, devido ao seu carácter inesperado e surpreendente, foram posteriormente confirmados por imunocitoquímica, com anticorpos anti-queratina, ficando assim demonstrado tratar-se, mesmo, da presença de restos epiteliais de Malassez no espaço pulpar. Esta observação não foi descrita em nenhum artigo relacionados com processos de endodontia regenerativa de que tenhamos conhecimento até à data. Andreasen e Bakland<sup>435</sup> chegam mesmo a afirmar a ausência destas formações epiteliais (ERMs) no interior do canal, embora se encontrem visíveis no ligamento periodontal.

Apesar da existência de restos epiteliais de Malassez no interior do canal radicular, este facto parece não ter sido suficiente para induzir a diferenciação das células mesenquimatosas indiferenciadas de origem pulpar em células odontoblásticas. Porém deverão exercer um papel de relevo nos mecanismos de diferenciação e regeneração da estrutura periodontal bem como na formação de tecidos mineralizados (também observados no interior do espaço pulpar). Dado o envolvimento dos restos epiteliais de Malassez em muitas situações de natureza fisiológica e patológica do periápice, este assunto merecia ser alvo de um estudo muito mais exaustivo. A este respeito, é interessante referir os trabalhos de Athanassiou-Papaefthymiou *et al.*<sup>542</sup> que alertam para a existência de células estaminais nos restos epiteliais de Malassez, que poderiam estar relacionadas com processos regeneração de esmalte, quando co-transplantadas com as DPSCs. Por outro lado, Xiong *et al.*<sup>179</sup> afirmam que as células epiteliais de Malassez são passíveis de um processo de transdiferenciação em células mesenquimatosas, representando deste modo uma população de células estaminais com características únicas, localizadas no ligamento periodontal.

## 5. Considerações finais e perspectivas futuras

A maioria dos resultados obtidos neste trabalho experimental, após procedimentos de revascularização do espaço canalar de raízes imaturas não apresentou, na generalidade, características biológicas e funcionais específicas do complexo pulpo-dentinário, não podendo chamar-se-lhe, por isso mesmo, um processo regenerativo, mas sim reparativo.

Com efeito, se conseguirmos uma antissepsia efetiva e atempada do sistema canalar, a criação de um microambiente que permita o crescimento dos tecidos e um eficaz selamento coronário podemos verificar, como no presente estudo, a efetivação de mecanismos de reparação e/ou revitalização do espaço canalar ou mesmo, nalguns casos, a regeneração de grandes áreas de tecido pulpar, sem recorrer a técnicas muito dispendiosas e demasiado sofisticadas.

Consideramos ainda que neste trabalho, estiveram presentes os quatro princípios básicos em que assenta a engenharia de tecidos e que englobam a) a presença de células estaminais libertadas para o interior do espaço canalar, aquando da disrupção do tecido periapical e indução do coágulo, b) uma matriz constituída pelo coágulo sanguíneo, matrizes de natureza polimérica e paredes dentinárias, c) a presença de fatores de crescimento/morfogénicos, provenientes quer da parede dentinária, quer das plaquetas e de outros constituintes do coágulo sanguíneo e finalmente d) a criação de um microambiente favorável ao processo de regeneração tecidular.

A grande desvantagem desta tecnologia reside na falta de capacidade de regulação deste conjunto de elementos e sobretudo, na baixa densidade de células estaminais e no seu limitado potencial proliferativo e regenerativo ou mesmo na sua sobrevivência a situações tão adversas. Com efeito, a baixa densidade de células estaminais pós-natais presentes nos nichos da polpa dentária e papila apical pode não ser suficiente para conseguir regenerar grandes áreas de tecido danificado, possibilitando a síntese de nova matriz dentinária.

Todavia, considerando o conjunto de estudos publicados nesta área e os resultados aqui apresentados, somos de opinião que será importante continuar a investir no aperfeiçoamento e otimização dos pormenores técnicos de indução e enriquecimento do coágulo, bem como na manipulação dos tecidos periapicais, de modo a preservar a integridade estrutural da papila apical e da HERS/ERM e sobretudo nos mecanismos capazes de belar eficazmente os processo infecciosos /inflamatórios.

Uma vez que a viabilidade da HERS e papila apical em dentes permanentes imaturos está dependente da gravidade e duração dos processos de pulpíte/periodontite apical, a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento atempado destas situações pode aumentar sobremaneira o aparecimento de mecanismos de regeneração, minimizando os processo de reparação após tratamento endodôntico.

A revascularização do espaço pulpar em termos de procedimentos clínicos é relativamente simples e rápida para um profissional experiente, necessitando também de poucos recursos. De igual modo, será mais eficaz apostar na utilização de moléculas capazes de estimular o *homing* das células estaminais endogénas do que propriamente investir nos processos onerosos de transplan-

tação de células. O *homing* celular oferece uma alternativa mais segura e menos dispendiosa que o transplante de células.

Apesar dos resultados pouco animadores obtidos com as matrizes utilizadas no presente trabalho, será importante continuar a apostar na sua utilização e otimização. O desenvolvimento e a aplicação de matrizes continua, sem dúvida, a constituir um passo decisivo em engenharia de tecidos na área da endodontia regenerativa. A este respeito pensamos que a aplicação clínica do plasma enriquecido em plaquetas (PRP – *platelet-rich plasma*) será uma alternativa a considerar permitindo um incremento na concentração de plaquetas superior a 338%, aumentando teoricamente o teor em PDGF e de TGF- $\beta$ , potentes agentes quimiotáticos para as células estaminais/progenitoras. De registar ainda que, a sua combinação tem um efeito sinérgico, uma vez que o TGF- $\beta$  atua essencialmente como um agente de diferenciação e o PDGF como um forte fator mitogénico e proliferativo. Por sua vez, a presença de VEGF vai reforçar os mecanismos de angiogénese.

Por fim, importa referir que a identificação dos sinais moleculares capazes de estimular a migração e proliferação das células estaminais/ progenitoras presentes nos tecidos periapicais para o interior do espaço canal e dos mecanismos responsáveis pela sua diferenciação num fenótipo odontoblástico constitui, quanto a nós, a principal questão a resolver em futuros trabalhos de investigação.

Neste âmbito, interessa realçar que neste trabalho foi possível criar condições no espaço canal que possibilitaram, para além da formação de tecido conjuntivo e cimento, o aparecimento de tecido ósseo, tecido que necessita de um conjunto de circunstâncias, nomeadamente uma boa vascularização, que permitam a síntese da uma matriz tão organizada e mineralizada.

O mecanismo de diferenciação odontoblástica parece requerer um maior grau de exigência quando comparado com tecido ósseo e com o cimento, compreendendo-se pois que nos processos de regeneração, levados a cabo no espaço canal, seja sempre mais difícil de atingir uma reconstrução eficaz do complexo pulpo-dentinário. Assim, é nossa opinião que as estratégias futuras deverão continuar a incidir na otimização dos mecanismos de migração, proliferação e, sobretudo, de diferenciação das células estaminais endógenas em células da linha odontoblástica.

Em termos clínicos a criação de um microambiente propício à maturação e diferenciação celular, estará imperativamente associado ao desenvolvimento e optimização de técnicas e materiais tanto no campo da antisepsia canal, como no selamento coronário. Continua em aberta a necessidade que encontrar outros materiais, irrigantes/medicações intracanalares e técnicas alternativas, de modo a melhorar o processo de antisepsia com o mínimo de danos para os tecidos vitais remanescentes e sem provocar efeitos secundários como a pigmentação coronária. Neste âmbito, estão incluídos, materiais de selamento coronário com menor tempo de presa, melhor adesão às paredes permitindo um reforço estrutural e a prevenção da microinfiltração coronária a longo prazo.

Uma nota final mais uma vez para referir que, atualmente, não existem protocolos padronizados relativos aos métodos de tratamento regenerativo na área de endodontia, baseados na evidência científica ou clínica, que recomendem um procedimento reconhecido como sendo o mais correto e indicado para o tratamento de dentes imaturos infetados.

## 6. Conclusões

Este estudo apresenta uma caracterização histológica pormenorizada dos tecidos neoformados após aplicação de técnicas de apexificação e procedimentos de revascularização, permitindo pôr em evidência algumas particularidades que consideramos de grande interesse. Assim, do trabalho experimental realizado e dos resultados obtidos e apresentados decorrente das metodologias testadas, foi possível tirar as seguintes conclusões:

- Os estudos realizados neste trabalho experimental, em modelo animal, demonstraram diferenças significativas, no espaço canalar e na região periapical, entre os resultados obtidos com a técnica de apexificação e os resultados alcançados após aplicação de procedimentos de revascularização.
- Na análise radiográfica das raízes submetidas a procedimentos de apexificação, observámos para além da presença do MTA, uma resolução das lesões periapicais em 94% dos casos, um ligeiro aumento da espessura das paredes radiculares em 77,8% dos casos e encerramento apical em 67% dos casos. De referir também algumas situações (44%) nas quais se verificou alguma extrusão do MTA, registando que somente em 3 raízes (16,7%) nas quais se observou a formação de tecidos mineralizados.
- Os resultados de apexificação, em microscopia de luz, mostraram o lúmen dos canais completamente preenchidos com MTA, bem como a criação de uma barreira apical, formando uma ponte entre as paredes radiculares, constituída maioritariamente por cimento celular. De assinalar, que este tecido mineralizado neoformado está envolvido por ligamento periodontal e apresenta uma perfeita continuidade com o cimento celular constituinte do periodonto.
- Observaram-se em muitos dos casos analisados (83,3%) uma considerável deposição de cimento celular adjacente à face externa da parede dentinária, contribuindo para um aumento da espessura da parede radicular.
- Para além da resolução das lesões periapicais, registou-se a presença frequente de grande número de estruturas constituídas por dentina e cimento situadas geralmente em estreita proximidade com as pontes de cimento constituintes da barreira apical. Estas formações, certamente derivadas da diferenciação das células da papila apical, parecem contribuir para um nítido crescimento e reforço radicular em comprimento, facto raramente associado aos procedimentos de apexificação com MTA, assumindo-se assim como um caso de sucesso.
- No presente estudo, acentuaram-se os bons resultados observados e atribuídos ao MTA, de forma dominante e consistente, e o facto de se verificar uma boa tolerância dos tecidos periapicais a este material.

- Os procedimentos de revascularização aplicados em dentes imaturos (grupos 2, 3 e 4) permitiram observar radiograficamente, na grande maioria dos casos, a existência de uma barreira cervical de MTA adequada e bastante satisfatória. Verificou-se também uma evolução positiva no sentido da resolução da radiotransparência apical em 84%, um aumento da espessura das paredes radiculares em 77,2 % e um encerramento apical em 70,2%, das situações estudadas.
- Em microscopia de luz foi possível verificar na sequência dos diferentes protocolos de revascularização aplicados a recuperação de um estado vital no canal pulpar, possibilitando um desenvolvimento radicular para apical da restauração, traduzido por um aumento, ainda que mais significativo em espessura (85,6%) do que em comprimento (45,6%), das paredes radiculares, a par de grande número de casos (66,7%) de encerramento apical.
- Independente das matrizes utilizadas, encontramos com grande frequência, o espaço canalar novamente preenchido com grandes áreas de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado e a presença de tecidos mineralizados com diferentes características e localizações. De entre estes tecidos destaca-se por um lado a formação de cimento celular em aposição à face interna da dentina, geralmente acompanhada por um tecido conjuntivo semelhante ao ligamento periodontal (contendo também alguns restos epiteliais de Malassez), bem como várias áreas de tecido ósseo por vezes bastante extensas dispersas no lúmen do canal.
- Foram frequentes as situações em que se observou a existência de uma perfeita continuidade entre o cimento intracanal, a posicionado à superfície interna da dentina, e o cimento constituinte do periodonto já existente. Do mesmo modo, foi possível verificar também, uma continuação entre o ligamento periodontal e certas áreas de tecido conjuntivo presentes na cavidade pulpar, em particular na porção apical. Foi ainda possível observar a continuidade do tecido ósseo de localização intracanal com o tecido ósseo constituinte da parede alveolar, não sendo invulgar encontrar zonas de perfeita união entre cimento celular e tecido ósseo ou mesmo entre cimento celular e dentina.
- O conjunto das estruturas presentes no espaço canalar representa um processo de revascularização/revitalização do espaço pulpar, que parece resultar da migração e invasão dos tecidos constituintes do periodonto para o interior do canal pulpar, situação certamente facilitada pela dimensão do ápice. De qualquer forma, pode afirmar-se que a presença destes tecidos no espaço canalar é indicador da erradicação bacteriana e da reação inflamatória associada, o que por si só deve ser considerado como um resultado muito positivo. A este respeito, importa salientar a eficácia da pasta triantibiótica (ciprofloxacina, metronidazol e minociclina) utilizada como medicação intracanal.
- Por sua vez, os resultados observados nas zonas periapicais, ao contrário do que se verificou na cavidade pulpar, podem ser interpretados mais como processos regenerativos, do que reparativos.

- Apesar da possibilidade teórica de uma maior eficácia nos processos de regeneração com aplicação de diferentes matrizes (grupo 3 e 4), foram encontrados melhores resultados apenas com a indução, formação e estabilização de um coágulo sanguíneo (grupo 2). Assim, a capacidade regenerativa resultante da adição das matrizes ao coágulo não se revelou favorável.
- No grupo 3, onde foi aplicada uma matriz de ácido hialurônico e quitosano (HA:CS), observou-se a presença no espaço canalar de grande áreas ocupadas por esta matriz, frequentemente rodeadas por cemento celular, para além de regiões de tecido conjuntivo laxo e de um certo reforço inflamatório. De registar também a existência de áreas de tecido ósseo, ainda que em menor quantidade que no grupo 2.
- No grupo 4, onde foi utilizada uma matriz de pectina e quitosano (P:CS), é de assinalar também a presença de grandes áreas ocupadas por matriz, embora escassamente rodeadas por tecido mineralizado. Na cavidade pulpar encontrámos ainda grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado e raras zonas de infiltrado inflamatório. As áreas ocupadas por tecido ósseo, foram detetadas com muito menor frequência e quantidade do que nos grupos 2 e 3.
- A alcalinização do meio associada à utilização do MTA poderá ser responsável pela insolubilidade do quitosano, elemento comum às duas matrizes utilizadas, justificando assim a sua lenta biodegradação.
- Com base na análise estatística multivariada, foi possível confirmar que a presença de áreas de reabsorção na parede dentinária sem reparação, de infiltrado inflamatório e de espessamento do ligamento periodontal representam, no seu conjunto, sinais de mau prognóstico. Por outro lado, o preenchimento canalar, sinais de vascularização e encerramento apical quando presentes influenciam positivamente o resultado, sendo sinais favoráveis de sucesso. Assim, através da análise destas seis variáveis e da sua correlação, poderemos prever um grande grau de exatidão (90,1%), o sucesso ou insucesso da intervenção. Sendo que a presença de encerramento apical por si só dá um grau de exatidão de 85,7%.
- Um aspeto que nos parece importante registar, nos casos em que foram aplicados os procedimentos de revascularização, é a presença frequente de formações mineralizadas, circundadas por ligamento periodontal, contendo restos epiteliais de Malassez, situadas a uma certa distância das raízes dentárias correspondentes. Estas estruturas bastante idênticas às observadas no grupo do MTA, posicionam-se ao nível do local estimado para a formação do ápice, surgindo como resultado de um processo de diferenciação e maturação da papila apical.
- O aparecimento isolado destas estruturas, pode ficar a dever-se a traumatismos mecânicos ou fatores iatrogénicos, tendo em conta que são facilmente destacáveis. A ausência de encerramento apical e de crescimento radicular em comprimento, observado em muitas situações, parece-nos ficar a dever-se à separação entre a papila apical e a sua raiz correspondente, ou mesmo à sua destruição.

- Ainda que não tenha sido encontrada nenhuma cavidade pulpar completamente regenerada foi possível observar alguns casos em que se verificou a regeneração de grandes áreas de tecido pulpar bastante bem vascularizado e innervado ocupando a maioria do espaço canal. De entre os resultados apresentados, verificaram-se cinco casos (4 casos no grupo 2 e 1 no grupo 4) em que foi possível observar a presença de uma extensa camada de células odontoblásticas, adjacente a uma zona de pré-dentina e dentina recém formada, que consideramos como uma área em que se verificou um verdadeiro processo de regeneração do complexo pulpo-dentinário. A formação desta nova matriz dentinária sintetizada por odontoblastos neoformados será certamente da responsabilidade da diferenciação odontoblástica das células estaminais da papila apical (SCAPs). Nestes casos verificou-se também, um verdadeiro crescimento em comprimento da raiz. Assim, os odontoblastos recém formados provenientes da SCAPs, permitiram completar o processo de crescimento e maturação da radicular.
- A preservação da integridade estrutural da papila apical (evitando também o seu destacamento da raiz correspondente) e da bainha radicular epitelial de Hertwig (ou dos seus derivados), bem como um diagnóstico atempado e controlo eficaz da infeção, a par de um eficaz mecanismo de revascularização, são condições essenciais que, à partida, podem proporcionar o desenvolvimento e maturação das células estaminais, adequadas à diferenciação fenotípica dos tecidos a regenerar, o que pode fazer toda a diferença na reconstituição do complexo pulpo dentinário e crescimento radicular.
- Finalmente pode afirmar-se que os tratamentos aplicados no decurso deste estudo experimental permitiram observar, na maioria das raízes imaturas necrosadas e/ou com periodontite apical, a recuperação de um estado vital e uma boa vascularização do espaço pulpar, permitindo um desenvolvimento radicular para apical da restauração.

### **III. Resumo**

---



Durante o processo de desenvolvimento dos dentes permanentes é bastante comum a ocorrência de situações de cárie ou de traumatismos, que podem alterar ou mesmo danificar o tecido pulpar e prejudicar a fisiologia do complexo pulpo-dentinário e o normal desenvolvimento radicular. A perda prematura de uma polpa funcional em dentes imaturos leva à paragem da formação de dentina radicular, condicionando uma parede canalar pouco espessa e funcionalmente comprometida. Esta situação anatómica e funcional apresenta uma grande predisposição para fraturas, representando um enorme desafio para os tratamentos endodônticos e restauradores. Para além disso, a presença de um ápice aberto dificulta as técnicas de preparação, antissepsia e obturação canalar, bem como a impossibilidade de obtenção de uma receptáculo apical capaz de conter os materiais no interior do canal radicular, sem extravasamento para os tecidos periapicais.

Nestas circunstâncias clínicas, é geralmente recomendado um procedimento de apexificação com indução de uma barreira apical capaz de reter os materiais obturadores e impedir o seu contacto com os tecidos periapicais. Contudo nos dentes imaturos sujeitos à técnica de apexificação, mesmo quando tratados de acordo com o estado da arte, ou seja, barreira apical de MTA seguida de restauração adesiva, o prognóstico é incerto, devido à desfavorável relação coroa/raiz e grande suscetibilidade à fratura. Por outro lado, uma vez que, os procedimentos de apexificação restringem a progressão e a maturação radicular, mantinha-se a necessidade de encontrar um mecanismo que possibilitasse o restabelecimento da vitalidade do espaço pulpar e deste modo um aumento da espessura da matriz dentinária, bem como o crescimento radicular e encerramento apical, ou seja, a continuação do desenvolvimento e maturação da raiz.

Com esta perspetiva, surgiram nos últimos anos alguns tratamentos inovadores que possibilitaram uma revascularização e revitalização do espaço pulpar de dentes imaturos necrosados e periodontite apical, permitindo o reforço das paredes radiculares e por vezes a continuação do seu desenvolvimento, abrindo assim novas possibilidades terapêuticas neste campo.

As estratégias subjacentes ao aparecimento de novos tecidos no espaço pulpar, visando recuperar uma polpa lesada ou ausente, são referidas como procedimentos de endodontia regenerativa,

assentando em três pressupostos fundamentais: 1) uma antisepsia canalar efetiva, 2) criação de uma matriz que permita o crescimento de novos tecidos, geralmente associada à formação e organização de um coágulo sanguíneo e 3) selamento coronário adequado de modo a prevenir uma reinfeção.

É neste contexto que se situa o trabalho experimental aqui apresentado. Com efeito, o objetivo principal deste estudo consiste, para além da indução de um coágulo sanguíneo, numa avaliação *in vivo* do desempenho biológico e potencial regenerativo de diferentes matrizes (ácido hialurónico/ quitosano e pectina/quitosano) colocadas no espaço canalar de dentes imaturos com necrose pulpar e periodontite apical, tendo por base análises radiográficas, histológicas, imunocitoquímicas e histomorfométricas. Na sua realização foram utilizados quatro cães da raça *Beagle*, envolvendo no total 56 dentes imaturos. Em cada um dos animais, foram selecionados 14 pré-molares. Estes dentes foram divididos em 6 grupos, nos quais estão incluídos dois grupos de controlos (20 canais) e quatro grupos de teste (76 canais) perfazendo um total de 96 canais radiculares. Os quatro grupos teste foram agrupados do seguinte modo: grupo I (apexificação com MTA); grupo II (coágulo sanguíneo); grupo III (coágulo sanguíneo + matriz polimérica de hialuronato de sódio/ quitosano – HA:CS) e grupo IV (coágulo sanguíneo + matriz polimérica de pectina/ quitosano - P:CS). Nos grupos controlo está inserido um controlo positivo (sem qualquer intervenção) e um negativo (infetados, sem qualquer tratamento). A análise estatística foi realizada utilizando uma única variável e uma análise multivariada exploratória, com o nível de significância de  $p < 0,05$ .

O protocolo desenvolvido compreendeu um total de 5 intervenções. Inicialmente procedeu-se à indução de lesão periapical. Após três semanas, procedeu-se à antisepsia canalar e à aplicação da medicação intracanal (hidróxido de cálcio ou pasta triantibiótica). Depois de cinco semanas do início, efetuaram-se os procedimentos de apexificação ou de revascularização pulpar, incluindo neste caso a indução e estabilização do coágulo sanguíneo e colocação de matrizes. Após 11 semanas do início, foi realizado um controlo clínico e radiográfico e finalmente, às 18 semanas, procedeu-se após um novo controlo clínico e radiográfico, à eutanásia dos animais e à colheita em bloco dos maxilares para processamento e observação em microscopia de luz. As observações histológicas do material após fixação, descalcificação e inclusão em parafina tiveram por finalidade a caracterização histológica e organização dos tecidos presentes no canal radicular, após aplicação de técnicas de apexificação e procedimentos de revascularização, incidindo fundamentalmente na análise morfológica, imunohistoquímica e histomorfométrica dos tecidos em estudo e seu registo fotográfico.

Nos resultados de apexificação (grupo I), com base numa análise radiográfica foi possível verificar uma resolução das lesões periapicais (94%), um ligeiro aumento da espessura das paredes radiculares (77,8%) e encerramento apical (67%), apesar de uma ligeira extrusão do MTA (44%). Já as observações histológicas mostraram o lúmen dos canais completamente preenchidos com MTA, bem como a criação de uma barreira apical formada maioritariamente por cimento celular. De assinalar, que este tecido mineralizado neoformado está envolvido por ligamento periodontal e apresenta uma perfeita continuidade com o cimento celular constituinte do periodonto. Relativamente aos resul-

tados de natureza histológica, observados neste grupo, o facto de todo o lúmen do canal radicular estar preenchido com MTA impossibilitou, desde logo, a hipótese de formação de novos tecidos em aposição à parede interna da dentina. Esta situação constitui uma das grandes limitações da técnica de apexificação ou seja, apesar de se conseguir a criação de uma barreira apical dura, mantiveram-se as paredes dentinárias muito finas e fragilizadas, o que torna o dente muito susceptível à fratura. Porém, observámos em 83,3% dos casos analisados, uma considerável deposição de cimento celular na porção externa da raiz, quando em comparação com a dentina adjacente, contribuindo para um aumento da parede radicular em comprimento.

De registar ainda, para além da resolução das lesões periapicais, a presença frequente de grande número de estruturas constituídas por dentina e cimento situadas em estreita proximidade e continuidade com as pontes de cimento constituintes da barreira apical. Estas formações, certamente derivadas da diferenciação das células da papila apical, parecem contribuir para um nítido crescimento e reforço radicular em comprimento, facto raramente associado aos procedimentos de apexificação com MTA, assumindo-se como um caso de sucesso.

Nos grupos experimentais em que foram aplicadas as matrizes (grupos 2, 3 e 4), foi possível confirmar radiograficamente, na grande maioria dos casos, a existência de uma barreira cervical de MTA adequada e bastante satisfatória. Verificou-se também uma evolução positiva no sentido da resolução da radiotransparência apical em 84%, um aumento da espessura das paredes radiculares em 77,2 % e um encerramento apical parcial e/ou completo em 70,2% das situações estudadas.

A análise dos resultados em microscopia de luz revelou que os procedimentos de revascularização aplicados em dentes imaturos com necrose pulpar e periodontite apical, permitiram a recuperação de um estado vital no canal pulpar, possibilitando um desenvolvimento radicular para apical da restauração, traduzido por um aumento, ainda que mais significativo em espessura (85,6%) do que em comprimento (45,6%), das paredes radiculares, a par de grande número de casos (66,7%) de encerramento apical. Independente das matrizes utilizadas encontrámos com grande frequência, o espaço canal novamente preenchido com grandes áreas de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado e a presença de tecidos mineralizados com diferentes características e localizações. De entre estes tecidos destaca-se por um lado a formação de cimento celular em aposição à face interna da dentina, geralmente acompanhado por um tecido conjuntivo semelhante ao ligamento periodontal (contendo também alguns restos epiteliais de Malassez), bem como várias áreas de tecido ósseo, por vezes bastante extensas e dispersas no lúmen do canal. O conjunto destas estruturas no espaço canal, parece resultar da migração e invasão dos tecidos constituintes do periodonto para o interior do canal pulpar, situação certamente facilitada pela dimensão do ápice.

Considerando que o cimento e o tecido ósseo neoformados no interior dos canais radiculares não são componentes normais do tecido pulpar, parece estarmos em presença de um processo de revitalização do espaço pulpar e não de uma verdadeira regeneração. De qualquer forma, pode afirmar-se que a presença destes tecidos no espaço canal é indicador da erradicação bacteriana e

da reação inflamatória associada, o que por si só deve ser considerado como um resultado muito positivo. A este respeito, importa salientar a eficácia da pasta triantibiótica (ciprofloxacina, metro-nidazol e minociclina) utilizada como medicação intracanal.

Por sua vez, os resultados observados nas zonas periapicais, ao contrário do que se verificou na cavidade pulpar, podem ser interpretados mais como processos regenerativos, do que reparativos.

Apesar da possibilidade teórica de uma maior eficácia nos processos de regeneração com aplicação de diferentes matrizes (grupo 3 e 4), foram encontrados melhores resultados apenas com a indução, formação e estabilização de um coágulo sanguíneo (grupo 2). Assim, a capacidade regenerativa resultante da adição das matrizes ao coágulo não se revelou favorável.

No grupo 3 onde foi aplicada uma matriz de ácido hialurónico e quitosano (HA:CS), observou-se a presença no espaço canal de grandes áreas ocupadas por esta matriz, frequentemente rodeadas por cimento celular, para além de regiões de tecido conjuntivo laxo e de um certo reforço inflamatório. De registar também a existência de áreas de tecido ósseo, ainda que em menor quantidade que no grupo 2.

No grupo 4 onde foi utilizada uma matriz de pectina e quitosano (P:CS), é de assinalar também a presença de grandes áreas ocupadas por matriz, embora escassamente rodeadas por tecido mineralizado. Na cavidade pulpar encontrámos ainda grandes quantidades de tecido conjuntivo laxo muito vascularizado e raras zonas de infiltrado inflamatório. As áreas ocupadas por tecido ósseo, foram detetadas com muito menor frequência e quantidade do que nos grupos 2 e 3. A alcalinização do meio associada à utilização do MTA poderá ser responsável pela insolubilidade do quitosano, elemento comum às duas matrizes utilizadas, justificando assim a sua lenta biodegradação.

Com base na análise estatística multivariada, foi possível confirmar que a presença de áreas de reabsorção na parede dentinária sem reparação, de infiltrado inflamatório e espessamento do ligamento periodontal representam, no seu conjunto, sinais de mau prognóstico. Por outro lado, o preenchimento canal, sinais de vascularização e encerramento apical quando presentes influenciam positivamente o resultado, sendo sinais favoráveis de sucesso. Assim, através da análise destas seis variáveis e da sua correlação, poderemos prever com grande grau de exatidão (90,1%), o sucesso ou insucesso da intervenção, sendo que a presença de encerramento apical por si só dá um grau de exatidão de 85,7%.

Consideramos ainda, que neste trabalho, estiveram presentes os quatro princípios básicos em que assenta a engenharia de tecidos, e que englobam a) a presença de células estaminais libertadas para o interior do espaço canal, aquando da disrupção do tecido periapical e indução do coágulo, b) uma matriz constituída pelo coágulo sanguíneo, matrizes de natureza polimérica e paredes dentinárias e finalmente c) a presença de fatores de crescimento/morfogénicos, provenientes quer da parede dentinária, quer das plaquetas e de outros constituintes do coágulo sanguíneo e d) a criação de um microambiente favorável ao processo de revitalização/regeneração tecidular.

Um aspeto que nos parece importante sublinhar é a presença quase constante de formações mineralizadas, circundadas por ligamento periodontal, contendo restos epiteliais de Malassez, situadas a uma certa distância das raízes dentárias correspondentes. Estas áreas de tecido mineralizado são

essencialmente constituídas por cimento celular e dentina, mostrando uma composição em tudo semelhante às paredes do ápice de qualquer raiz, incluindo a presença de *foramina*, surgindo como resultado de um processo de diferenciação e maturação da papila apical. O espaço entre estas formações e a porção mais apical da raiz correspondente está, na maior parte dos casos, ocupado por lamelas ósseas. Estas estruturas parecem representar o desenvolvimento de um ápice radicular total ou parcialmente separado da restante raiz correspondente, dependendo da sua ligação, ou não, a uma das paredes radiculares. De facto, foi possível observar na mesma raiz, uma tentativa de encerramento numa das paredes radiculares (com cimento, dentina e existência de *foramina*), enquanto a outra permaneceu aberta. Este facto, parece ficar a dever-se a uma continuidade da parede radicular com a papila apical respectiva enquanto a outra perdeu este contacto. Deste modo não usufruiu da contribuição das células constituintes da papila apical para a formação da camada de dentina da parede radicular. O aparecimento isolado destas estruturas, ou seja a sua separação da raiz correspondente, pode ficar a dever-se a traumatismos mecânicos ou factores iatrogénicos, tendo em conta que estas formações são facilmente destacáveis.

Apraz-nos registar que embora em escasso número, foi possível observar alguns casos em que se verificaram, em simultâneo, áreas de regeneração do tecido pulpar justapostas a regiões em que se formaram tecidos mineralizados característicos do periodonto. Na verdade, de entre os nossos resultados, verificaram-se cinco casos (4 casos no grupo 2 e 1 no grupo 4) em que foi possível observar a presença de uma extensa camada de células odontoblásticas, adjacente a uma zona de pré-dentina e dentina recém formada, que consideramos como uma área em que se verificou um verdadeiro processo de regeneração do complexo pulpo-dentinário. Este facto, foi quase sempre observado em apenas uma das paredes dentinária, nunca tendo sido encontrada uma cavidade pulpar completamente regenerada e revestida, na sua totalidade, por células odontoblásticas.

Neste âmbito interessa realçar que neste trabalho foi possível criar condições no espaço canalar que possibilitaram, para além da formação de tecido conjuntivo e cimento, o aparecimento de tecido ósseo, tecido que necessita de um conjunto de circunstâncias fundamentais que incluem uma boa vascularização que permita a síntese da sua matriz tão organizada e mineralizada. Todavia o mecanismo de diferenciação odontoblástica parece requerer um ainda maior grau de exigência, quando comparado com o tecido ósseo e com o cimento, compreendendo-se pois que nos processos de regeneração, levados a cabo no espaço canalar, seja sempre mais difícil de atingir uma reconstituição eficaz do complexo pulpo-dentinário. Por outro lado, a baixa densidade de células estaminais pós-natais presentes nos nichos da polpa dentária e papila apical pode não ser suficiente para conseguir regenerar grandes áreas de tecido danificado, possibilitando a síntese de nova matriz dentinária.

Uma vez que a viabilidade da HERS e papila apical em dentes permanentes imaturos está dependente da gravidade e duração dos processos de pulpíte/periodontite apical, a prevenção, diagnóstico precoce e tratamento atempado destas situações pode aumentar de sobremaneira o aparecimento de mecanismos de regeneração, minimizando os processo de reparação após tratamento endodôntico.

A este respeito importa referir que as células estaminais, quer da polpa quer da papila apresentam, após poucas passagens em cultura, uma restrição no seu potencial diferenciação, mostrando um desvio em favor de um fenótipo osteoblástico, em detrimento da linha odontoblástica.

A preservação da integridade estrutural da papila apical (evitando também o seu destacamento da raiz correspondente) e da bainha radicular epitelial de Hertwig (ou dos seus derivados), bem como efetuar um diagnóstico atempado e controlo da infeção/inflamação, a par de um eficaz mecanismo de revascularização, são condições essenciais que, à partida, podem proporcionar o desenvolvimento e maturação das células estaminais, adequadas à diferenciação fenotípica dos tecidos a regenerar, o que pode fazer toda a diferença na reconstituição do complexo pulpo dentinário e crescimento radicular.

Em termos clínicos a criação de um microambiente propício à maturação e diferenciação celular, estará imperativamente associado ao desenvolvimento e optimização de técnicas e materiais tanto no campo da antissepsia canal, como no selamento coronário. Continua em aberto a necessidade de encontrar outros materiais, irrigantes/medicações intracanalares e técnicas alternativas, de modo a melhorar o processo de antissepsia com o mínimo de danos para os tecidos vitais remanescentes e sem provocar efeitos secundários como a pigmentação coronária. Neste âmbito, estão incluídos, materiais de selamento coronário com menor tempo de presa e melhor adesão às paredes, que possibilitem o reforço estrutural e a prevenção da microinfiltração coronária a longo prazo.

## **IV. Summary**

---



During the development of permanent teeth, the occurrence of caries or trauma is quite common and can alter or even damage the pulp tissue and impair the physiology of the pulp-dentin complex and the normal root development. The premature loss of a functional pulp in immature teeth leads to the stopping of the root dentin formation, creating a thin and functionally compromised canal wall. These anatomical and functional conditions show a great predisposition to fractures, representing a huge challenge for endodontic and restorative treatments. In addition, the presence of an open apex hampers the preparation techniques, the canal antisepsis and filling, as well as the attainment of an apical receptacle capable of containing the materials inside the root canal without leaking into the periapical tissues.

In these clinical circumstances, an apexification procedure is generally recommended, inducing an apical barrier capable of retaining the filling materials and preventing their contact with the periapical tissues. However, in immature teeth subject to an apexification technique, even when treated according to the state of the art, in other words, with an apical barrier of MTA followed by an adhesive restoration, the prognosis is uncertain due to the unfavourable crown-to-root ratio and high susceptibility to fracture. On the other hand, since the apexification procedure restricts the root maturation and progression, there was still the need to find a mechanism that would enable the reestablishment of the pulp vitality and, thus, an increase in the thickness of dentine wall, as well as the root growth and apical closure, that is, the maintenance of root development and maturation.

Bearing all this in mind, some innovative treatments emerged in recent years for the revascularization and revitalization of pulp tissue of immature necrotic teeth and apical periodontitis, allowing the reinforcement of root walls and sometimes the maintenance of their development, thus opening new therapeutic possibilities in this field.

Underlying strategies to the emergence of new tissues in the pulp canal space, in order to retrieve a missing or damaged pulp, are referred to as regenerative endodontic procedures, based on three fundamental assumptions: 1) effective canal disinfection/antisepsis, 2) creation of a scaffold that allows growth of new tissue, usually associated with the formation and organization of a blood clot, and 3) appropriate coronal sealing so as to prevent reinfection.

This is the context in which the experimental work presented here is founded. Indeed, the main objective of this study is, in addition to the induction of a blood clot, an *in vivo* evaluation of the biological performance and regenerative potential of different scaffolds (hyaluronic acid/chitosan and pectin/chitosan) placed within the root canals of immature teeth with pulp necrosis and apical periodontitis, based on radiographic, histological, immunocytochemical and histomorphometric analysis. In the study, four beagle dogs were used, involving a total of 56 immature teeth. In each animal, 14 premolars were selected. These teeth were divided into six groups, among which two control groups (20 canals) and four test groups (76 canals) are included, for a total of 96 root canals. The four test groups were grouped as follows: group I (apexification with MTA); group II (blood clot); group III (blood clot + polymeric scaffold of sodium hyaluronate and chitosan - HA:CS) and group IV (blood clot + polymeric scaffold of pectin and chitosan - P:SC). In the control groups, a positive control (no intervention) and a negative one (infected without any treatment) were inserted.

The developed protocol comprised a total of five interventions. Initially, an apical periodontitis was induced. Three weeks later, the canal disinfections/antiseptics and application of intracanal medication (calcium hydroxide or triantibiotic paste) was performed. After five weeks of beginning, the apexification or revascularization procedures were done, including the induction and stabilization of the blood clot and placement of the scaffolds. Eleven weeks after the initiation, we performed a clinical and radiographic control and finally, at 18 weeks, after a new clinical and radiographic control, euthanasia of animals was done and the jaw blocks were harvested for processing and observation by light microscopy. Histological observations of the material after fixation, decalcification and paraffin embedding were intended for histological organizational characterization of the tissues in the root canal after the application of apexification techniques and pulp revascularization procedures, focusing primarily on morphological, immunohistochemical and histomorphometric analysis of the studied tissues and their photographic record. Statistical analysis was performed using a univariate and an exploratory multivariate analysis, with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

In the apexification results (group I), based on X-ray analysis it was possible to verify a resolution of periapical lesions (94%), a slight increase in root wall thickness (77,8%) and continued apical closure (67%), in spite of a slight extrusion of the MTA (44%). The histological observations showed the lumen of the root canal completely filled with MTA, as well as the creation of an apical barrier formed mainly by cellular cementum. Be noted that this newly formed mineralized tissue is surrounded by periodontal ligament and presents a perfect continuity with the periodontal cellular cementum. On the results of histological nature observed in this group, the fact that the entire lumen of the root canal was filled with MTA precluded the possibility of new tissue formation in apposition to the inner dentin wall. This constitutes a major limitation of the apexification technique, that is, although it is possible to achieve the creation of an apical hard barrier, the dentinal walls remained very thin and fragile, which makes the tooth very susceptible to fracture. However, a large number of examined cases showed considerable cellular cement deposition in the outer portion of the root when compared with the adjacent dentin, contributing to an increase of the root wall in terms of length.

It is also noteworthy, besides the resolution of periapical lesions, the frequent presence of a large number of structures made of dentin and cementum, located in close proximity and continuity with the cementum bridges of the apical barrier. These formations, certainly derived from the differentiation of the apical papilla cells, appear to contribute to a clear growth and increase in root length, which is an element rarely associated with apexification procedures using MTA, assuming this as a success.

In the experimental groups where the scaffolds were applied (group 2, 3 and 4), it was confirmed radiographically, in most cases, the existence of an adequate and quite satisfactory cervical MTA barrier. There was also a positive trend towards the resolution of the apical radiolucency in 84%, an increase in root wall thickness in 77,2% and a partial and/or total continued apical closure in 70,2% of the studied cases.

The results analysis in light microscopy revealed that revascularization procedures applied in immature teeth with necrotic pulp and apical periodontitis (groups 2, 3 and 4) showed us the recovery of a vital state in the pulp canal, allowing root growth apically to the restoration, reflected by an increase, though more significant in terms of thickness (85,6%) than in length (45,6%), of the root canal walls, together with a large number of cases (66,7%) of apical closure. Regardless of the scaffolds, we very frequently found the canal space once again filled with large areas of very vascularized soft tissue and the presence of mineralized hard tissues with different characteristics and locations.

Among these tissues stands out the formation of cellular cement in apposition to the inner surface of the dentin, often accompanied by a connective tissue similar to periodontal ligament (also containing some epithelial rests of Malassez) as well as several areas of bone tissue, sometimes quite extensive and dispersed in the lumen of the canal. All these structures within the canal space appear to result from the migration and invasion of periodontal tissue constituents into the pulp canal, a situation certainly facilitated by the size of the apex.

Whereas the newly formed cementum and bone tissue in the root canals are not normal components of the pulp tissue, it seems we are witnessing a revitalization process of the pulp and not a true regeneration. So, it can be stated that the presence of these tissues within the canal is an indicator of bacterial eradication and associated inflammatory reaction, which itself must be considered a very good result. In this regard, it is important to point out the effectiveness of the triantibiotic paste (ciprofloxacin, metronidazole and minocycline) used as intracanal medication.

On the other hand, the results observed in the periapical area, unlike those seen in the pulp cavity, may be interpreted more as regenerative processes than reparative ones.

In spite of the theoretical possibility of a more effective regeneration processes with the use of different scaffolds (group 3 and 4), better results were found with only the induction, formation and stabilization of a blood clot (group 2). Thus, the regenerative capacity resulting from the addition of the scaffolds to the blood has not proved favourable.

Group 3, where chitosan and hyaluronic acid scaffolds (HA: CS) were applied, revealed the presence of large canal space areas occupied by this scaffold, often surrounded by cellular cement,

as well as regions of soft connective tissue and some inflammation. The existence of areas with bone tissue is to be noted, although in smaller quantities than at group 2.

In Group 4, where pectin and chitosan scaffolds (P: SC) were used, it is also important to mark the presence of large areas occupied by the scaffold, although surrounded by sparsely mineralized tissue. In the pulp cavity we also found large amounts of very vascularized soft tissue and rare areas of inflammatory infiltrate. The areas occupied by bone tissue were detected with much lower frequency and quantity than in groups 2 and 3. The alkalisation of the medium associated with the use of MTA may be responsible for the insolubility of chitosan element common to the two scaffolds used, thus justifying its slow biodegradation.

Based on multivariate statistical analysis, it was confirmed that the presence of resorption areas on the dentinal wall without repair, inflammatory infiltration and thickening of the periodontal ligament represent, as a whole, signs of a poor prognosis. On the other hand, the canal filling, signs of vascularization, and continued apical closure, when present, positively affect the outcome, with favourable signs of success. Thus, through the analysis of these six variables and their correlation we can foresee, with a great degree of accuracy (90,1%), the success or failure of the intervention. The presence of continued apical closure alone gives an 85,7% degree of accuracy.

We also consider, in this work, that all four basic principles of tissue engineering were observed, namely a) the presence of stem cells released into the pulp canal space during the periapical tissue disruption and induction of the blood clot, b) a scaffold consisting of the blood clot, arrays of polymeric nature and dentin walls, and c) the presence of growth factors/morphogenic, derived from the dentin wall, both in platelets and other constituents of the blood clot, d) creation of a microenvironment favourable to the tissue revitalization/regeneration process.

One aspect that seems important to note is the almost constant presence of mineralized formations, surrounded by periodontal ligament, containing epithelial rests of Malassez, located at a distance from corresponding tooth roots.

These areas of mineralized tissue are essentially made of cellular cementum and dentin, showing a composition similar to the walls of any root apex, including the presence of foramina, arising as a result of a process of differentiation and maturation of the apical papilla. Bone trabeculae, in most cases, occupy the space between these configurations and the apical portion of the root. These structures appear to represent the development of an apex totally or partially separated from the remainder corresponding root, depending on the connection, or not, to root canal walls. In fact, it was observed, in the same root, an attempt to close one of the root walls (with cementum, dentin, and there is foramina), while the other remained open. This seems to be due to a continuation of the root wall with its apical papilla while the other lost this contact and, thus, did not benefit from the contribution of the constituent cells of the apical papilla to form the dentin layer of the root wall. The appearance of these structures, that is, its separation from their corresponding root, may be due to mechanical trauma and iatrogenic factors, taking into account that these formations are easily detachable.

We are pleased to note that although in small number, it was possible to observe some cases in which simultaneous regeneration areas of the pulp tissue occurred juxtaposed to regions that formed mineralized tissues typical of the periodontium. In fact, our results showed five cases (4 cases in group 2 and 1 in group 4) among which was possible to observe the presence of an extensive odontoblastic cell layer adjacent to a newly formed pre-dentin and dentin, which we consider as an area where there was a real process of regeneration of the pulpo-dentin complex. This was almost always observed in only one of the dentin walls, never having found a completely regenerated and coated pulp cavity by odontoblastic cells.

In this context, it should be noted that in this work it was possible to create conditions in the canal space that permitted, in addition to the formation of cementum tissue, the appearance of bone tissue which requires a fundamental set of circumstances including a good vascularization that allows the synthesis of its organized and mineralized matrix. However the mechanism of odontoblast differentiation appears to require an even higher degree of demand when compared with the bone and the cement, being understood that in the processes of regeneration, carried out in canal space, it will always be more difficult to achieve an effective reconstitution of the pulpo-dentin complex. On the other hand, the low density of postnatal stem cells present in the niche of the apical papilla and dental pulp may not be sufficient to regenerate large areas of damaged tissue, allowing the synthesis of new dentin matrix.

Since the viability of HERS and apical papilla in immature permanent teeth is dependent on the severity and duration of the processes of pulpitis/apical periodontitis, prevention, early diagnosis and early treatment of these conditions can greatly increase the appearance of regeneration mechanisms, minimizing the processes of repair after endodontic treatment.

Concerning this aspect, it should be noted that the stem cells either from the pulp or the papilla, after a few passages in culture, exhibit a restriction on their differentiation potential, showing a shift in favour of an osteoblast phenotype, rather than an odontoblast line.

Preserving the structural integrity of the apical papilla (also avoiding its detachment from the corresponding root) and Hertwig's epithelial root sheath (or its derivatives), as well as making timely diagnosis and control of infection/inflammation, along with an effective revascularization mechanism, are essential conditions that can provide the development and maturation of stem cells suitable for phenotypic differentiation of tissues to regenerate, which can make all the difference in the reconstitution of the pulpo-dentinal complex and root growth.

Clinically, the creation of a microenvironment favourable to cellular maturation and differentiation is imperatively associated with the development and optimization of materials and techniques both in the field of canal asepsis, and coronal sealing. The need remains open to find other materials, irrigation/intra-canal medications and alternative techniques to improve the process of disinfection with minimal damage to the remaining vital tissues and without causing side effects such as coronary pigmentation. In this setting, several improvements are subjacent, such as coronal sealing materials with lower setting time, better adhesion to the walls allowing for structural reinforcement and prevention of coronal microleakage in the long term.



## **V. Bibliografia**

---



1. Smith JW. Apexification: management of the immature pulpless tooth. *J Dent Assoc* 1982, 60(6): 3-5.
2. Gupta S, Sharma A, Dang N. Apical bridging in association with regular root formation following single-visit apexification: a case report. *Quintessence Int* 1999, 30(8): 560-562.
3. Goldstein S, Sedaghat-Zandi A, Greenberg M, Friedman S. Apexification & apexogenesis. *NY State Dent J* 1999, 65(5): 23-25.
4. Ghose LJ, Baghdady VS, Hikmat YM. Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endod* 1987, 13(6): 285-290.
5. Morse DR, O'Larnic J, Yesilsoy C. Apexification: review of the literature. *Quintessence Int* 1990, 21(7): 589-598.
6. Chawla HS. Apexification: follow-up after 6-12 years. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 1991, 8(1): 38-40.
7. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005, 21(1): 1-8.
8. Huang GT. Apexification: the beginning of its end. *Int Endod J* 2009, 42(10): 855-866.
9. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* : 2001, 17(4): 185-187.
10. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: Case report and review of the literature. *Pediatric Dent* 2007, 29(1): 47-50.
11. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod* 2008, 34(5): 611-616.
12. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Tex Dent J* 2012, 129(6): 601-616.
13. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010, 36(3): 536-541.
14. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 2009, 88(9): 792-806.
15. Huang GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 2010, 16(2): 605-615.

16. Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study I: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod* 2012, 38(10): 1330-1336.
17. Chen MYH, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int End J* 2012, 45(3): 294-305.
18. Thibodeau B, Teixeira T, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endodont* 2007, 33(6): 680-689.
19. Wang XJ, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GTJ. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endodont* 2010, 36(1): 56-63.
20. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2013, 39(3 Suppl): S30-43.
21. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013, 39(3): 319-326.
22. Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol* 1992, 8(2): 45-55.
23. Skoglund A, Tronstad L. Pulpal changes in replanted and autotransplanted immature teeth of dogs. *J Endod* 1981, 7(7): 309-316.
24. Tziafas D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. *J Endodont* 2010, 36(5): 781-789.
25. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS one* 2006, 1: e79.
26. Malhotra N, Mala K. Regenerative endodontics as a tissue engineering approach: past, current and future. *Aust Endod J* 2012, 38(3): 137-148.
27. Demarco FF, Conde MC, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nor JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J* 2011, 22(1): 3-13.
28. Goodis HE, Kinaia BM, Kinaia AM, Chogle SM. Regenerative endodontics and tissue engineering: what the future holds? *Dent Clin North Am* 2012, 56(3): 677-689.
29. Geisler TM. Clinical considerations for regenerative endodontic procedures. *Dent Clin North Am* 2012, 56(3): 603-626.
30. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007, 33(4): 377-390.
31. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: What does the future hold? *J Endodont* 2008, 34(7): S51-S56.
32. Hargreaves K, A. L. Regenerative endodontics. In: Hargreaves, K, Cohen, S (eds). *Pathways of the Pulp*, 10 edn. Elsevier St. Louis, 2011, pp 602-619.
33. Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, et al. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 639-649.
34. Sun HH, Jin T, Yu Q, Chen FM. Biological approaches toward dental pulp regeneration by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2010.
35. Nakashima M. Tissue engineering in endodontics. *Aust Endod J* 2005, 31(3): 111-113.

36. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 2011, 23(3): 333-339.
37. Galler KM, D'Souza RN. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med* 2011, 6(1): 111-124.
38. Kaigler D, Mooney D. Tissue engineering's impact on dentistry. *J Dent Educ* 2001, 65(5): 456-462.
39. Sathorn C, Palamara JE, Palamara D, Messer HH. Effect of root canal size and external root surface morphology on fracture susceptibility and pattern: a finite element analysis. *J Endod* 2005, 31(4): 288-292.
40. Diangelis AJ, Andreasen JO, Ebeleseder KA, Kenny DJ, Trope M, Sigurdsson A, et al. International association of dental traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 1. Fractures and luxations of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012, 28(1): 2-12.
41. Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. *J Endod* 2013, 39(3 Suppl): S26-29.
42. AAE. Glossary of endodontic terms In: Endodontists, AAo, editor. *American Association of Endodontists. Glossary of endodontic terms*. Chicago; 2012.
43. Camp JH. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: Treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. *Pediatric Dent* 2008, 30(3): 197-205.
44. AAE. Considerations for regenerative procedures. 2013 [cited 2013 25/02/2013] Available from: [http://www.aae.org/dental\\_professionals/considerations\\_for\\_regenerative\\_procedures.aspx](http://www.aae.org/dental_professionals/considerations_for_regenerative_procedures.aspx)
45. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*. 2009/10/06 ed; 2009. pp. 1343-1349.
46. Andersson L. Epidemiology of traumatic dental injuries. *J Endod* 2013, 39(3 Suppl): S2-5.
47. Glendor U. Epidemiology of traumatic dental injuries-a 12 year review of the literature. *Dent Traumatol* 2008, 24(6): 603-611.
48. Glendor U, Marcenes W, Andreasen JO. Classification, epidemiology and etiology. In: Andreasen, JO, Andreasen, FM, Andersson, L (eds). *Traumatic Injuries to the teeth*. Blackwell Publishing, Ida.: Oxford, UK, 2008, pp 217-254.
49. Glendor U. Aetiology and risk factors related to traumatic dental injuries-a review of the literature. *Dent Traumatol* : 2009, 25(1): 19-31.
50. Almeida CM, Petersen PE, Andre SJ, Toscano A. Changing oral health status of 6- and 12-year-old schoolchildren in Portugal. *Community Dent Health* 2003, 20(4): 211-216.
51. Bucher K, Neumann C, Hickel R, Kuhnisch J. Traumatic dental injuries at a German university clinic 2004-2008. *Dent Traumatol* : 2013, 29(2): 127-133.
52. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Desenvolvimento da raiz e do ligamento periodontal. In: Berkovitz, BKB, Holland, GR, Moxham, BJ (eds). *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal*, 3ª edn: São Paulo, 2004, pp 335-369.
53. Luukko K, Kettunen P, Frisad I, Berggreen E. Estrutura e funções do complexo dentino-pulpar. In: Hargreaves, K, Cohen, S (eds). *Caminhos da Polpa*. Elsevier S. Paulo, 2011, pp 418-463.
54. Levin LG. Pulp and periradicular testing. *J Endod* 2013, 39(3 Suppl): S13-19.
55. Jafarzadeh H, Abbott PV. Review of pulp sensibility tests. Part II: electric pulp tests and test cavities. *Int Endod J* 2010, 43(11): 945-958.
56. Jafarzadeh H, Abbott PV. Review of pulp sensibility tests. Part I: general information and thermal tests. *Int Endod J* 2010, 43(9): 738-762.

57. Peters DD, Baumgartner JC, Lorton L. Adult pulpal diagnosis. I. Evaluation of the positive and negative responses to cold and electrical pulp tests. *J Endod* 1994, 20(10): 506-511.
58. Sigurdsson A, Trope M, Chivian N. The role of endodontics after dental traumatic injuries. In: Hargreaves, K, Cohen, S (eds). *Pathways of the Pulp*, 10 edn. Elsevier St. Louis, 2011, pp 620-654.
59. Reyes V, Páucar M. Tratamiento pulpar en la apexificación del diente inmaduro mediante agregado de trióxido mineral. *Odontol Sanmarquina* 2009, 12: 29-32.
60. Moorrees CF, Fanning EA, Hunt EE, Jr. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dent Res* 1963, 42: 1490-1502.
61. Seibel V, Soares, G, Limongi O. Healing process after root canal therapy in immature human teeth. *RSBO - Revista Sul-Brasileira de Odontologia* 2006, vol. 3(2): 37-43.
62. Waterhouse PJ, Whitworth JM, Camp JH, Fuks AB. Pediatric endodontics: endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. In: Hargreaves, K, Cohen, S (eds). *Pathways of the Pulp*, 10 edn. Elsevier St. Louis, 2011.
63. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008, 36(6): 379-386.
64. Mendoza AM, Reina ES, Garcia-Godoy F. Evolution of apical formation on immature necrotic permanent teeth. *Am J Dent* 2010, 23(5): 269-274.
65. Morfis AS, Siskos G. Apexification with the use of calcium hydroxide: a clinical study. *J Clin Pediatr Dent* 1991, 16(1): 13-19.
66. Lee LW, Hsiao SH, Chang CC, Chen LK. Duration for apical barrier formation in necrotic immature permanent incisors treated with calcium hydroxide apexification using ultrasonic or hand filing. *J Formos Med Assoc* 2010, 109(8): 596-602.
67. Walia T, Chawla HS, Gauba K. Management of wide open apices in non-vital permanent teeth with Ca(OH)<sub>2</sub> paste. *J Clin Pediatr Dent* 2000, 25(1): 51-56.
68. El-Meligy OA, Avery DR. Comparison of apexification with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *Pediatr Dent* 2006, 28(3): 248-253.
69. Pradhan DP, Chawla HS, Gauba K, Goyal A. Comparative evaluation of endodontic management of teeth with unformed apices with mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide. *J Dent Child (Chic)* 2006, 73(2): 79-85.
70. Dominguez Reyes A, Munoz Munoz L, Aznar Martin T. Study of calcium hydroxide apexification in 26 young permanent incisors. *Dent Traumatol* 2005, 21(3): 141-145.
71. Al-Ansary MAD, Day PF, Duggal MS, Brunton PA. Interventions for treating traumatized necrotic immature permanent anterior teeth: inducing a calcific barrier & root strengthening. *Dent Traumatol* 2009, 25(4): 367-379.
72. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Assoc* 1966, 72(1): 87-93.
73. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 1999, 25(1): 1-5.
74. Das S. Apexification in a nonvital tooth by control of infection. *J Am Dent Assoc* 1980, 100(6): 880-881.
75. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* : 2002, 18(3): 134-137.

76. Doyon GE, Dumsha T, von Fraunhofer JA. Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. *J Endod* 2005, 31(12): 895-897.
77. Hatibovic-Kofman S, Raimundo L, Zheng L, Chong L, Friedman M, Andreasen JO. Fracture resistance and histological findings of immature teeth treated with mineral trioxide aggregate. *Dent Traumatol* 2008, 24(3): 272-276.
78. Batur YB, Erdemir U, Sancakli HS. The long-term effect of calcium hydroxide application on dentin fracture strength of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol*: 2013(Epub 26/02/2013).
79. Yassen GH, Platt JA. The effect of nonsetting calcium hydroxide on root fracture and mechanical properties of radicular dentine: a systematic review. *Int Endod J* 2013, 46(2): 112-118.
80. Moore A, Howley MF, O'Connell AC. Treatment of open apex teeth using two types of white mineral trioxide aggregate after initial dressing with calcium hydroxide in children. *Dent Traumatol* 2011, 27(3): 166-173.
81. Holden DT, Schwartz SA, Kirkpatrick TC, Schindler WG. Clinical outcomes of artificial root-end barriers with mineral trioxide aggregate in teeth with immature apices. *J Endod* 2008, 34(7): 812-817.
82. Chhabra N, Singhal KP, Kamat S. Successful apexification with resolution of the periapical lesion using mineral trioxide aggregate and demineralized freeze-dried bone allograft. *J Conserv Dent* 2010, 13(2): 106-109.
83. Mente J, Leo M, Panagidis D, Ohle M, Schneider S, Lorenzo Bermejo J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate in open apex teeth. *J Endod* 2013, 39(1): 20-26.
84. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A Retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endodont* 2009, 35(10): 1343-1349.
85. Palma P, Escórcio M, Diogo P, Caramelo F, Santos JM. Retrospective study of apexification with ProoRoot MTA. *J Dent Res* 2012(Issue 91(Spec Iss D)): paper 168106.
86. Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod J* 2007, 40(3): 186-197.
87. Sarris S, Tahmassebi JF, Duggal MS, Cross IA. A clinical evaluation of mineral trioxide aggregate for root-end closure of non-vital immature permanent incisors in children-a pilot study. *Dent Traumatol* : 2008, 24(1): 79-85.
88. Pace R, Giuliani V, Pini Prato L, Baccetti T, Pagavino G. Apical plug technique using mineral trioxide aggregate: results from a case series. *Int Endod J* 2007, 40(6): 478-484.
89. Witherspoon DE, Small JC, Regan JD, Nunn M. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008, 34(10): 1171-1176.
90. Witherspoon DE, Ham K. One-visit apexification: technique for inducing root-end barrier formation in apical closures. *Pract Proced Aesthet Dent* 2001, 13(6): 455-460; quiz 462.
91. Cehreli ZC, Sara S, Uysal S, Turgut MD. MTA apical plugs in the treatment of traumatized immature teeth with large periapical lesions. *Dent Traumatol* 2011, 27(1): 59-62.
92. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod* 2009, 35(6): 777-790.
93. Nygaard-Ostby B, Hjortdal O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. *Scand J Dent Res* 1971, 79(5): 333-349.
94. Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K. A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978, 45(1): 17-28.

95. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008, 34(2): 166-171.
96. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. 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(2): 133-138.
97. Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol* 1986, 2(3): 83-89.
98. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008, 34(6): 645-651.
99. Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol* 1996, 12(6): 289-293.
100. Myers WC, Fountain SB. Dental pulp regeneration aided by blood and blood substitutes after experimentally induced periapical infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974, 37(3): 441-450.
101. Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG, Laporta R. Revitalization of pulpless open apex teeth in rhesus monkeys, using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod* 1976, 2(6): 159-165.
102. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004, 30(4): 196-200.
103. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008, 34(7): 876-887.
104. Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2008, 34(8): 919-925; Discussion 1157.
105. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod* 2009, 35(5): 745-749.
106. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int End J* 2009, 42(1): 84-92.
107. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int End J* 2009, 42(12): 1118-1126.
108. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. *J Endodont* 2010, 36(6): 1086-1091.
109. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics – biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Endod J* 2010, 55(4): 446-452.
110. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod* 2011, 37(9): 1327-1330.
111. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol* 2011, 27(1): 55-58.
112. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011, 37(4): 562-567.
113. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011, 37(2): 265-268.
114. Aggarwal V, Miglani S, Singla M. Conventional apexification and revascularization induced maturogenesis of two non-vital, immature teeth in same patient: 24 months follow up of a case. *J Conserv Dent* 2012, 15(1): 68-72.

115. Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B. Revascularization of immature permanent incisors after severe extrusive luxation injury. *Tex Dent J* 2012, 129(7): 675-681.
116. Jadhav G, Shah N, Logani A. Revascularization with and without Platelet-rich Plasma in Nonvital, Immature, Anterior Teeth: A Pilot Clinical Study. *J Endodont* 2012, 38(12): 1581-1587.
117. Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, et al. Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci* 2012, 4(2): 109-113.
118. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod* 2012, 38(3): 411-414.
119. Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, Teixeira FB, Vann WF, Jr. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatric Dent* 2012, 34(1): 66-69.
120. Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *J Endod* 2012, 38(10): 1428-1434.
121. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod* 2012, 38(6): 864-868.
122. Chen X, Bao ZF, Liu Y, Liu M, Jin XQ, Xu XB. Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. *J Endod* 2013, 39(5): 719-722.
123. Law AS. Considerations for regeneration procedures. *J Endod* 2013, 39(3 Suppl): S44-56.
124. Huang G, Lin LM, Trope M. Revascularization versus regeneration - letters to the editor. *J Endodont* 2008, 34: 511-512.
125. Kollar EJ. Histogenetic aspects of dermal-epidermal interactions. In: Harold C. Slavkin, LAB (ed). *Developmental aspects of oral biology*. Academic Press: Londres, 1972, pp 125-149.
126. Lumsden AG. Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J Biol Buccale* 1979, 7(1): 77-103.
127. Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cate's - Oral histology - development, structure, and function. In: Nanci, A (ed). 8th, 2012.
128. Garant PR. *Oral Cells and Tissues*. Quintessence Publishing (IL) 2003.
129. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Desenvolvimento inicial do dente. In: Berkovitz, BKB, Holland, GR, Moxham, BJ (eds). *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal*, 3ª ed edn: São Paulo, 2004, pp 290-303.
130. Jarvinen E, Tummers M, Thesleff I. The role of the dental lamina in mammalian tooth replacement. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009, 312B(4): 281-291.
131. Magloire H, Couble ML, Romeas A, Bleicher F. Odontoblast primary cilia: facts and hypotheses. *Cell Biol Int* 2004, 28(2): 93-99.
132. Allard B, Magloire H, Couble ML, Maurin JC, Bleicher F. Voltage-gated sodium channels confer excitability to human odontoblasts: possible role in tooth pain transmission. *J Biol Chem* 2006, 281(39): 29002-29010.
133. Slavkin HC, Diekwisch T. Evolution in tooth developmental biology: of morphology and molecules. *Anat Rec* 1996, 245(2): 131-150.
134. Perris R, Lofberg J. Promotion of chromatophore differentiation in isolated premigratory neural crest cells by extracellular matrix material explanted on microcarriers. *Dev Biol* 1986, 113(2): 327-341.
135. Suomalainen M, Thesleff I. Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/beta-catenin signaling in the epithelial stem cells. *Dev Dyn* 2010, 239(1): 364-372.

136. Tapadia MD, Cordero DR, Helms JA. It's all in your head: new insights into craniofacial development and deformation. *J Anatomy* 2005, 207(5): 461-477.
137. Helms JA, Cordero D, Tapadia MD. New insights into craniofacial morphogenesis. *Development* 2005, 132(5): 851-861.
138. Katchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral, Texto-Atlas-Correlações Clínicas*, Segunda edição edn. Editora Guanabara Koogan SA: Rio de Janeiro, 2004.
139. Ferraris ME, Munoz A. *Histología y embriología bucodental*, 2ª edn. Editorial Medica Panamericana, 2009.
140. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993, 75(1): 45-58.
141. Thesleff I. The genetic basis of tooth development and dental defects. *Am J Med Genet A* 2006, 140(23): 2530-2535.
142. McCollum MA, Sharpe PT. Developmental genetics and early hominid craniodental evolution. *Bioessays* 2001, 23(6): 481-493.
143. Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet* 1999, 15(2): 59-65.
144. Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. In: Institute, HSC (ed). *StemBook [Internet]* Harvard Stem Cell Institute Cambridge (MA), 2009.
145. Kerr JB. *Atlas de Histologia Funcional* ARTES MEDICAS, 2000.
146. Mjor IA, Sveen OB, Heyeraas KJ. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int* 2001, 32(6): 427-446.
147. Kierszenbaum AL. *Histologia e Biologia Celular*. In: Kierszenbaum, AL (ed). tradução da 2ª Edição edn. Mosby-Elsevier, 2008.
148. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. Dentina. In: Berkovitz, BKB, Holland, GR, Moxham, BJ (eds). *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal*, 3ª ed edn: São Paulo, 2004, pp 125-167.
149. Mjor IA, Ferrari M. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int* 2002, 33(1): 35-63.
150. Bergenholtz G, Mjor IA, Cotton WR, Hanks CT, Kim S, Torneck CD, et al. The biology of dentin and pulp. Consensus report. *J Dent Res* 1985, 64 Spec No: 631-633.
151. D'souza R, Qin CL. Development of the Pulpodentin Complex. *Seltzer and Bender's Dental Pulp, Second Edition* 2012: 1-25.
152. Simon S, Smith aj, Lumley PJ, Berdal a, Smith G, Finney S, et al. Molecular characterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 2009, 45: 693-703.
153. Simon SRJ, Berdal a, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL, Smith aj. Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic. *Adv Dent Res* 2011, 23: 340-345.
154. Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW, Simon S, Imazato S, Smith AJ. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *J Dent* 2010, 38(9): 687-697.
155. Smith AJ, Murray PE, Lumley PJ. Preserving the vital pulp in operative dentistry: I. A biological approach. *Dent Update* 2002, 29(2): 64-69.
156. Murray PE, Smith AJ, Windsor LJ, Mjor IA. Remaining dentine thickness and human pulp responses. *Int Endod J* 2003, 36(1): 33-43.
157. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Dent* 2000, 28(2): 77-92.

158. Six N, Lasfargues JJ, Goldberg M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol* 2002, 47(3): 177-187.
159. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med* 2001, 12(5): 425-437.
160. Smith AJ, Tobias RS, Murray PE. Transdentinal stimulation of reactionary dentinogenesis in ferrets by dentine matrix components. *J Dent* 2001, 29(5): 341-346.
161. Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Human odontoblast cell numbers after dental injury. *J Dent* 2000, 28(4): 277-285.
162. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nor JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endod* 2011, 37(1): 26-30.
163. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 2004, 38(3): 314-320.
164. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J* 2000, 32(8): 489-494.
165. Tecles O, Laurent P, Zygouritsas S, Burger AS, Camps J, Dejou J, et al. Activation of human dental pulp progenitor/stem cells in response to odontoblast injury. *Arch Oral Biol* 2005, 50(2): 103-108.
166. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. edn: New York, 2002.
167. Connor NS, Aubin JE, Melcher AH. The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues: an immunofluorescence study using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 1984, 32(6): 565-572.
168. Sargeant TD, Aparicio C, Goldberger JE, Cui H, Stupp SI. Mineralization of peptide amphiphile nanofibers and its effect on the differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta Biomater* 2012, 8(7): 2456-2465.
169. Kim J, Park Y, Tae G, Lee KB, Hwang CM, Hwang SJ, et al. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. *J Biomed Mater Res A* 2009, 88(4): 967-975.
170. Dangaria SJ, Ito Y, Walker C, Druzinsky R, Luan X, Diekwisch TG. Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells. *Differentiation* 2009, 78(2-3): 79-90.
171. Zeichner-David M, Chen LS, Hsu Z, Reyna J, Caton J, Bringas P. Amelogenin and ameloblastin show growth-factor like activity in periodontal ligament cells. *Eur J Oral Sci* 2006, 114 Suppl 1: 244-253; discussion 254-246, 381-242.
172. Torneck CD. Effects and clinical significance of trauma to the developing permanent dentition. *Dent Clin North Am* 1982, 26(3): 481-504.
173. Wang S, Mu J, Fan Z, Yu Y, Yan M, Lei G, et al. Insulin-like growth factor I can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res* 2012, 8(3): 346-356.
174. Keinan D, Cohen RE. The significance of epithelial rests of Malassez in the periodontal ligament. *J Endod* 2013, 39(5): 582-587.
175. Cho MI, Garant PR. Ultrastructural evidence of directed cell migration during initial cementoblast differentiation in root formation. *J Periodont Res* 1988, 23(4): 268-276.
176. Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001, 45(5-6): 695-706.
177. Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S. Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* 2007, 86(7): 594-599.

178. Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, et al. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 2003, 228(4): 651-663.
179. Xiong J, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Epithelial cell rests of Malassez contain unique stem cell populations capable of undergoing epithelial-mesenchymal transition. *Stem Cells Dev* 2012, 21(11): 2012-2025.
180. Lin L, Huang GTJ. Pathobiology of the Periapex. In: Hargreaves, KM, Cohen, S (eds). *Pathways of the pulp* 10 th ed edn. Elsevier St.Louis, 2011, pp 486-511.
181. Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970, 29(4): 620-630.
182. Andreasen JO, Kristerson L, Andreasen FM. Damage of the Hertwig's epithelial root sheath: effect upon root growth after autotransplantation of teeth in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1988, 4(4): 145-151.
183. Nair PNR, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996, 81(1): 93-102.
184. Lin LM, Huang GT, Rosenberg PA. Proliferation of epithelial cell rests, formation of apical cysts, and regression of apical cysts after periapical wound healing. *J Endod* 2007, 33(8): 908-916.
185. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol* 2000 2006, 41: 196-217.
186. Beertsen W, VandenBos T, Everts V. Root development in mice lacking functional tissue non-specific alkaline phosphatase gene: inhibition of acellular cementum formation. *J Dent Res* 1999, 78(6): 1221-1229.
187. Mikos AG, Herring SV, Ochareon P, Elisseff J, Lu HH, Kandel R, et al. Engineering complex tissues. *Tissue Eng* 2006, 12(12): 3307-3339.
188. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004, 4(8): 743-765.
189. Oreffo RO, Triffitt JT. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* 1999, 25(2 Suppl): S5-S9.
190. Giannoudis PV, Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. The diamond concept--open questions. *Injury* 2008, 39 Suppl 2: S5-8.
191. Casagrande L, Cordeiro MM, Nor SA, Nor JE. Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology* 2011, 99(1): 1-7.
192. Matos SM. Regeneração Periodontal - Aplicação de matrizes enriquecidas com modeladores biológicos. Doutorado thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
193. Zivkovic P, Petrovic V, Najman S, Stefanovic V. Stem cell-based dental tissue engineering. *ScientificWorld-Journal* 2010, 10: 901-916.
194. Bhatnagar R, Li S. Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2004, 7: 5021-5023.
195. Murray PE. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 577-588.
196. Murray PE, Garcia-Godoy F. Stem Cells and Regeneration of the Pulpodentin Complex. *Seltzer and Bender's Dental Pulp, Second Edition* 2012: 91-108.
197. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nor JE. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater* 2012, 28(4): 341-348.
198. Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian J Dent Res* 2011, 22(1): 122-131.

199. Horst OV, Chavez MG, Jheon AH, Desai T, Klein OD. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 495-520.
200. Zhou Y, Ma G, Shi S, Yang D, Nie J. Photopolymerized water-soluble chitosan-based hydrogel as potential use in tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2011, 48(3): 408-413.
201. Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, et al. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2011, 37(3): 390-397.
202. Sreejalekshmi KG, Nair PD. Biomimeticity in tissue engineering scaffolds through synthetic peptide modifications-altering chemistry for enhanced biological response. *J Biomedical Mat Res Part A* 2011, 96: 477-491.
203. Sakai VT, Cordeiro MM, Dong Z, Zhang Z, Zeitlin BD, Nör JE. Tooth slice/scaffold model of dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res* 2011, 23: 325-332.
204. Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2012, 18(1-2): 176-184.
205. Chandki R, Kala M, Banthia P, Banthia R. From stem to roots: tissue engineering in endodontics. *J Clin Exp Dent* 2012, 4: e66-e71.
206. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod* 2008, 34(8): 962-969.
207. Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(1): 13-27.
208. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Abberton K, Messer HH, Thompson EW. Revascularization and tissue regeneration of an empty root canal space is enhanced by a direct blood supply and stem cells. *Dent Traumatol* 2013, 29(2): 84-91.
209. Smith AJ, Smith JG, Shelton RM, Cooper PR. Harnessing the natural regenerative potential of the dental pulp. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 589-601.
210. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, et al. A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med* 2013.
211. Zhu X, Zhang C, Huang GTJ, Cheung GSP, Dissanayaka WL, Zhu W. Transplantation of Dental Pulp Stem Cells and Platelet-rich Plasma for Pulp Regeneration. *J Endodont* 2012, 38(12): 1604-1609.
212. Zheng Y, Wang XY, Wang YM, Liu XY, Zhang CM, Hou BX, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res* 2012, 91(7): 676-682.
213. Yang B, Chen G, Li J, Zou Q, Xie D, Chen Y, et al. Tooth root regeneration using dental follicle cell sheets in combination with a dentin matrix - based scaffold. *Biomaterials* 2012, 33(8): 2449-2461.
214. Wang X, Jin T, Chang S, Zhang Z, Czajka-Jakubowska A, Nor JE, et al. In vitro differentiation and mineralization of dental pulp stem cells on enamel-like fluorapatite surfaces. *Tissue Eng Part C Methods* 2012, 18(11): 821-830.
215. Coimbra P, Alves P, Valente TA, Santos R, Correia IJ, Ferreira P. Sodium hyaluronate/chitosan polyelectrolyte complex scaffolds for dental pulp regeneration: synthesis and characterization. *Int J Biol Macromol* 2011, 49(4): 573-579.
216. Wang Y, Zhao Y, Jia W, Yang J, Ge L. Preliminary Study on dental pulp stem cell-mediated pulp regeneration in canine immature permanent teeth. *J Endod* 2013, 39(2): 195-201.
217. Huang GT, Sonoyama W, Chen J, Park SH. In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 2006, 324(2): 225-236.

218. Hennessy KM, Pollot BE, Clem WC, Phipps MC, Sawyer AA, Culpepper BK, et al. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials* 2009, 30(10): 1898-1909.
219. Kim NR, Lee DH, Chung PH, Yang HC. Distinct differentiation properties of human dental pulp cells on collagen, gelatin, and chitosan scaffolds. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 108(5): e94-100.
220. Srisuwan T, Tilkorn DJ, Al-Benna S, Vashi A, Penington A, Messer HH, et al. Survival of rat functional dental pulp cells in vascularized tissue engineering chambers. *Tissue Cell* 2012, 44(2): 111-121.
221. Shi S, Cheng X, Wang J, Zhang W, Peng L, Zhang Y. RhBMP-2 microspheres-loaded chitosan/collagen scaffold enhanced osseointegration: an experiment in dog. *J Biomater Appl* 2009, 23(4): 331-346.
222. Gebhardt M, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Cell Survival within Pulp and Periodontal Constructs. *J Endodont* 2009, 35(1): 63-66.
223. Zhang Y, Cheng X, Wang J, Wang Y, Shi B, Huang C, et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering. *Bioche Bioph Res Com* 2006, 344(1): 362-369.
224. d'Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater* 2009, 18: 75-83.
225. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein I after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod* 2008, 34(4): 421-426.
226. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2010, 93(1): 247-257.
227. Liu H, Yao F, Zhou Y, Yao K, Mei D, Cui L, et al. Porous poly (DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *J Biomater Appl* 2005, 19(4): 303-322.
228. Yamashita K, Horisaka Y, Okamoto Y, Yoshimura Y, Matsumoto N, Kawada J, et al. Architecture of implanted bone matrix gelatin influences heterotopic calcification and new bone formation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991, 197(3): 342-347.
229. Kikuchi N, Kitamura C, Morotomi T, Inuyama Y, Ishimatsu H, Tabata Y, et al. Formation of dentin-like particles in dentin defects above exposed pulp by controlled release of fibroblast growth factor 2 from gelatin hydrogels. *J Endod* 2007, 33(10): 1198-1202.
230. Kuo TF, Huang AT, Chang HH, Lin FH, Chen ST, Chen RS, et al. Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *J Biomed Mater Res A* 2008, 86(4): 1062-1068.
231. Inuyama Y, Kitamura C, Nishihara T, Morotomi T, Nagayoshi M, Tabata Y, et al. Effects of hyaluronic acid sponge as a scaffold on odontoblastic cell line and amputated dental pulp. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010, 92(1): 120-128.
232. Custodio CA, Alves CM, Reis RL, Mano JF. Immobilization of fibronectin in chitosan substrates improves cell adhesion and proliferation. *J Tissue Eng Regen Med* 2010, 4(4): 316-323.
233. Yang KC, Wang CH, Chang HH, Chan WP, Chi CH, Kuo TF. Fibrin glue mixed with platelet-rich fibrin as a scaffold seeded with dental bud cells for tooth regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2011.
234. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 2011, 37(8): 1109-1115.

235. Demir B, Demiralp B, Guncu GN, Uyanik MO, Caglayan F. Intentional replantation of a hopeless tooth with the combination of platelet rich plasma, bioactive glass graft material and non-resorbable membrane: a case report. *Dent Traumatol* 2007, 23(3): 190-194.
236. Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol* 1995, 40(3): 209-219.
237. Guo W, Gong K, Shi H, Zhu G, He Y, Ding B, et al. Dental follicle cells and treated dentin matrix scaffold for tissue engineering the tooth root. *Biomaterials* 2012, 33(5): 1291-1302.
238. Tziafas D, Lambrianidis T, Beltes P. Inductive effect of native dentin on the dentinogenic potential of adult dog teeth. *J Endod* 1993, 19(3): 116-122.
239. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989, 5(6): 279-286.
240. Fujiwara S, Kumabe S, Iwai Y. Isolated rat dental pulp cell culture and transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2006, 83(1): 15-24.
241. Dobie K, Smith G, Sloan AJ, Smith AJ. Effects of alginate hydrogels and TGF-beta 1 on human dental pulp repair in vitro. *Connect Tissue Res* 2002, 43(2-3): 387-390.
242. Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998, 9(7): 749-764.
243. Wang G, Zheng L, Zhao H, Miao J, Sun C, Liu H, et al. Construction of a fluorescent nanostructured chitosan-hydroxyapatite scaffold by nanocrystallon induced biomimetic mineralization and its cell biocompatibility. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011, 3(5): 1692-1701.
244. Matsunaga T, Yanagiguchi K, Yamada S, Ohara N, Ikeda T, Hayashi Y. Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds. *J Biomed Mater Res A* 2006, 76(4): 711-720.
245. Hsu SH, Huang GS, Feng F. Isolation of the multipotent MSC subpopulation from human gingival fibroblasts by culturing on chitosan membranes. *Biomaterials* 2012, 33(9): 2642-2655.
246. Dasilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *J Endod* 2013, 39(2): 249-253.
247. Coimbra P, Ferreira P, de Sousa HC, Batista P, Rodrigues MA, Correia IJ, et al. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int J Biol Macromol* 2011, 48(1): 112-118.
248. Hou Y, Hu J, Park H, Lee M. Chitosan-based nanoparticles as a sustained protein release carrier for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res A* 2012, 100(4): 939-947.
249. Iyer P, Walker KJ, Madhally SV. Increased matrix synthesis by fibroblasts with decreased proliferation on synthetic chitosan-gelatin porous structures. *Biotechnol Bioeng* 2012, 109(5): 1314-1325.
250. Nagel MD, Verhoef R, Schols H, Morra M, Knox JP, Ceccone G, et al. Enzymatically-tailored pectins differentially influence the morphology, adhesion, cell cycle progression and survival of fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1780(7-8): 995-1003.
251. Kokkonen H, Cassinelli C, Verhoef R, Morra M, Schols HA, Tuukkanen J. Differentiation of osteoblasts on pectin-coated titanium. *Biomacromolecules* 2008, 9(9): 2369-2376.
252. Liu L, Won YJ, Cooke PH, Coffin DR, Fishman ML, Hicks KB, et al. Pectin/poly(lactide-co-glycolide) composite matrices for biomedical applications. *Biomaterials* 2004, 25(16): 3201-3210.
253. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Sbl S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endodont* 2008, 34(8): 962-969.

254. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MAAM, Shi S, et al. SHED Differentiate into Functional Odontoblasts and Endothelium. *J Dent Res* 2010, 89(8): 791-796.
255. Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog* 1996, 12(6): 865-868.
256. Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta I. *J Biomed Mater Res A* 2008, 85(2): 439-444.
257. Sasaki R, Aoki S, Yamato M, Uchiyama H, Wada K, Ogiuchi H, et al. PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2011, 5(10): 823-830.
258. El-Backly RM, Massoud AG, El-Badry AM, Sherif RA, Marei MK. Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J* 2008, 34(2): 52-67.
259. Sarasam AR, Brown P, Khajotia SS, Dmytryk JJ, Madihally SV. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. *J Mater Sci Mater Med* 2008, 19(3): 1083-1090.
260. Song JS, Stefanik D, Damek-Poprawa M, Alawi F, Akintoye SO. Differentiation and regenerative capacities of human odontoma-derived mesenchymal cells. *Differentiation* 2009, 77(1): 29-37.
261. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97(25): 13625-13630.
262. Ando Y, Honda MJ, Ohshima H, Tonomura A, Ohara T, Itaya T, et al. The induction of dentin bridge-like structures by constructs of subcultured dental pulp-derived cells and porous HA/TCP in porcine teeth. *Nagoya J Med Sci* 2009, 71(1-2): 51-62.
263. Mangano C, Paino F, d'Aquino R, De Rosa A, Iezzi G, Piattelli A, et al. Human dental pulp stem cells hook into biocoral scaffold forming an engineered biocomplex. *PLoS one* 2011, 6(4): e18721.
264. Cavalcanti BN, Zeitlin BD, Nor JE. A hydrogel scaffold that maintains viability and supports differentiation of dental pulp stem cells. *Dent Mater* 2012.
265. Galler KM, Cavender A, Yuwono V, Dong H, Shi S, Schmalz G, et al. Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng Part A* 2008, 14(12): 2051-2058.
266. Santana BP, Dos Reis Paganotto GF, Nedel F, Piva E, de Carvalho RV, Nor JE, et al. Nano-/microfiber scaffold for tissue engineering: physical and biological properties. *J Biomed Mater Res A* 2012, 100(11): 3051-3058.
267. Yanpiset K, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. *Endod Dent Traumatol* 2000, 16(5): 211-217.
268. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors Related to Pulpal Healing. *Endod Dent Traumatol* 1995, 11(2): 59-68.
269. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010, 54(2): 313-324.
270. Ritter ALD, Ritter AV, Murrach V, Sigurdsson A, Trope M. 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(2): 75-84.
271. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: What does the future hold? *Pediatric Dent* 2008, 30(3): 253-260.
272. Johari V, Loke C. Brief overview of the coagulation cascade. *Dis Mon* 2012, 58(8): 421-423.
273. Norris LA. Blood coagulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003, 17(3): 369-383.

274. Mosher DF. Blood coagulation and fibrinolysis: an overview. *Clin Cardiol* 1990, 13(4 Suppl 6):VI5-11.
275. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YHM, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endodont* 2009, 35(2): 160-164.
276. Liao YH, Jones SA, Forbes B, Martin GP, Brown MB. Hyaluronan: pharmaceutical characterization and drug delivery. *Drug Deliv* 2005, 12(6): 327-342.
277. Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007, 23: 435-461.
278. Yuan Z, Nie H, Wang S, Lee CH, Li A, Fu SY, et al. Biomaterial selection for tooth regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011, 17(5): 373-388.
279. Fujishiro T, Bauer TW, Kobayashi N, Kobayashi H, Sunwoo MH, Seim HB, 3rd, et al. Histological evaluation of an impacted bone graft substitute composed of a combination of mineralized and demineralized allograft in a sheep vertebral bone defect. *J Biomed Mater Res A* 2007, 82(3): 538-544.
280. Krasinski R, Tchorzewski H. [Hyaluronan-mediated regulation of inflammation]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2007, 61: 683-689.
281. Palma P. Estudo de novas formulações para regeneração óssea em defeitos de dimensão crítica. Coimbra, 2009.
282. Liao E, Yaszemski M, Krebsbach P, Hollister S. Tissue-engineered cartilage constructs using composite hyaluronic acid/collagen I hydrogels and designed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Tissue Eng* 2007, 13(3): 537-550.
283. Brekke JH, Toth JM. Principles of tissue engineering applied to programmable osteogenesis. *J Biomed Mater Res* 1998, 43(4): 380-398.
284. Yamawaki H, Hirohata S, Miyoshi T, Takahashi K, Ogawa H, Shinohata R, et al. Hyaluronan receptors involved in cytokine induction in monocytes. *Glycobiology* 2009, 19(1): 83-92.
285. Jiang D, Liang J, Li Y, Noble PW. The role of Toll-like receptors in non-infectious lung injury. *Cell Res* 2006, 16(8): 693-701.
286. Huang L, Cheng YY, Koo PL, Lee KM, Qin L, Cheng JC, et al. The effect of hyaluronan on osteoblast proliferation and differentiation in rat calvarial-derived cell cultures. *J Biomed Mater Res A* 2003, 66(4): 880-884.
287. Schimizzi AL, Massie JB, Murphy M, Perry A, Kim CW, Garfin SR, et al. High-molecular-weight hyaluronan inhibits macrophage proliferation and cytokine release in the early wound of a preclinical postlaminectomy rat model. *Spine J* 2006, 6(5): 550-556.
288. Hayashi Y, Yamada S, Yanagi Guchi K, Koyama Z, Ikeda T. Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. *Adv Food Nutr Res* 2012, 65: 107-120.
289. Bigucci F, Luppi B, Monaco L, Cerchiara T, Zecchi V. Pectin-based microspheres for colon-specific delivery of vancomycin. *J Pharm Pharmacol* 2009, 61(1): 41-46.
290. Kumar TR, Shanmugasundaram N, Babu M. Biocompatible collagen scaffolds from a human amniotic membrane: physicochemical and in vitro culture characteristics. *J Biomater Sci Polym Ed* 2003, 14(7): 689-706.
291. Kumari S, Singh RP. Glycolic acid-g-chitosan-gold nanoflower nanocomposite scaffolds for drug delivery and tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 2012, 50(3): 878-883.
292. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology* 2008, 96(1): 1-11.
293. Hidaka Y, Ito M, Mori K, Yagasaki H, Kafrawy AH. Histopathological and immunohistochemical studies of membranes of deacetylated chitin derivatives implanted over rat calvaria. *J Biomed Mater Res* 1999, 46(3): 418-423.

294. Mohnen D. Pectin structure and biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol* 2008, 11(3): 266-277.
295. Chen CH, Sheu MT, Chen TF, Wang YC, Hou WC, Liu DZ, et al. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2006, 72(8): 1001-1009.
296. Bergman M, Djaldetti M, Salman H, Bessler H. Effect of citrus pectin on malignant cell proliferation. *Biomed Pharmacother* 2010, 64(1): 44-47.
297. Salman H, Bergman M, Djaldetti M, Orlin J, Bessler H. Citrus pectin affects cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Biomed Pharmacother* 2008, 62(9): 579-582.
298. Saber SE-DM. Tissue engineering in endodontics. *J Oral Sci* 2009, 51: 495-507.
299. Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejeda KM, Zhu Z. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol* 2001, 72(6): 815-823.
300. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone* 1996, 19(1 Suppl): 23S-37S.
301. Nakashima M, Akamine A. The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *J Endod* 2005, 31(10): 711-718.
302. Musson DS, McLachlan JL, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Adrenomedullin is expressed during rodent dental tissue development and promotes cell growth and mineralization. *Biol Cell* 2010, 102(3): 145-157.
303. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ. Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology* 2010, 98(1): 2-14.
304. Soares AP, Knop LA, Jesus A, Araujo T. Células-tronco em Odontologia. *R Dental Press Ortodon Facial* 2007, V.12(1): p. 33-44.
305. Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol* 1995, 39(1): 273-280.
306. Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H. Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1994, 38(3): 405-420.
307. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF-beta I release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J* 2012, 45(5): 439-448.
308. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 2007, 35(8): 636-642.
309. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006, 27(14): 2865-2873.
310. Roberts-Clark DJ, Smith aj. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000, 45: 1013-1016.
311. Wei X, Ling J, Wu L, Liu L, Xiao Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *J Endodont* 2007, 33: 703-708.
312. Jaunberzins A, Gutmann JL, Witherspoon DE, Harper RP. TGF-beta I alone and in combination with calcium hydroxide is synergistic to TGF-beta I production by osteoblasts in vitro. *Int End J* 2000, 33(5): 421-426.
313. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H. Influence of substrate nature and immobilization of implanted dentin matrix components during induction of reparative dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 1995, 32(1-4): 291-296.

314. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 2002, 84-A(6): 1032-1044.
315. Cheung E, Katti D, Rosier R, Laurencin C. Review of state of the art: growth factor-based systems for use as bone graft substitutes. . In: CT, L (ed). *Bone Grafts Substitutes* ASTM International, 2003, 174-193.
316. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol* 1992, 63(6): 515-525.
317. Strayhorn CL, Garrett JS, Dunn RL, Benedict JJ, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *J Periodontol* 1999, 70(11): 1345-1354.
318. Giannobile WV, Finkelman RD, Lynch SE. Comparison of canine and non-human primate animal models for periodontal regenerative therapy: results following a single administration of PDGF/IGF-I. *J Periodontol* 1994, 65(12): 1158-1168.
319. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993, 20(7): 537-544.
320. Rutherford RB, Niekrash CE, Kennedy JE, Charette MF. Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *J Periodontal Res* 1992, 27(4 Pt 1):285-290.
321. Tomson PL, Lumley PJ, Alexander MY, Smith AJ, Cooper PR. Hepatocyte growth factor is sequestered in dentine matrix and promotes regeneration-associated events in dental pulp cells. *Cytokine* 2013, 61(2): 622-629.
322. Smith AJ, Patel M, Graham A, Sloan AJ, Cooper PR. Dentine regeneration : key roles for stem cells and molecular signalling. *Oral Biosci Med* 2005, 2(2/3): 127-132.
323. Zhang R, Cooper PR, Smith G, Nör JE, Smith AJ. Angiogenic activity of dentin matrix components. *J Endodont* 2011, 37: 26-30.
324. Smith AJ, Tobias RS, Cassidy N, Plant CG, Browne RM, Begue-Kirn C, et al. Odontoblast stimulation in ferrets by dentine matrix components. *Arch Oral Biol* 1994, 39(1): 13-22.
325. Smith AJ, Scheven BA, Takahashi Y, Ferracane JL, Shelton RM, Cooper PR. Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol* 2012, 57(2): 109-121.
326. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009, 19(1): 71-88.
327. Nakashima M, Iohara K. Regeneration of dental pulp by stem cells. *Adv Dent Res* 2011, 23(3): 313-319.
328. Mitsiadis TA, Feki A, Papaccio G, Caton J. Dental pulp stem cells, niches, and notch signaling in tooth injury. *Adv Dent Res* 2011, 23(3): 275-279.
329. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how? *Int J Paediatr Dent* 2009, 19(1): 61-70.
330. Goldberg M. Pulp healing and regeneration: more questions than answers. *Adv Dent Res* 2011, 23(3): 270-274.
331. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res* 2008, 58(2): 137-147.
332. Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S, Huang GT. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 2010, 19(4): 469-480.
333. About I. Dentine regeneration in vitro: the pivotal role of supportive cells. *Adv Dent Res* 2011, 23(3): 320-324.
334. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 2007, 9(1): 204.

335. Tyagi P, Dhindsa MK. Tissue engineering and its implications in dentistry. *Indian J Dent Res* 2009, 20(2): 222-226.
336. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for msc: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, 7(5): 393-395.
337. Friedlander LT, Cullinan MP, Love RM. Dental stem cells and their potential role in apexogenesis and apexification. *Int Endod J* 2009, 42(11): 955-962.
338. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003, 18(4): 696-704.
339. Thesleff I, Wang XP, Suomalainen M. Regulation of epithelial stem cells in tooth regeneration. *C R Biol* 2007, 330(6-7): 561-564.
340. Ritchie KE, Nor JE. Perivascular stem cell niche in head and neck cancer. *Cancer Lett* 2012.
341. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis* 2007, 13(2): 151-157.
342. Ruparel NB, de Almeida JF, Henry MA, Diogenes A. Characterization of a stem cell of apical papilla cell line: effect of passage on cellular phenotype. *J Endod* 2013, 39(3): 357-363.
343. Trokovic R, Weltner J, Manninen T, Mikkola M, Lundin K, Hamalainen R, et al. Small molecule inhibitors promote efficient generation of induced pluripotent stem cells from human skeletal myoblasts. *Stem Cells Dev* 2013, 22(1): 114-123.
344. Lee SY, Huang GW, Shiung JN, Huang YH, Jeng JH, Kuo TF, et al. Magnetic cryopreservation for dental pulp stem cells. *Cells Tissues Organs* 2012.
345. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev* 2008, 4(1): 21-26.
346. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent* 2010, 2010: 856087.
347. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* 2003, 82(12): 976-981.
348. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002, 81(8): 531-535.
349. Casagrande L, Mattuella LG, de Araujo FB, Eduardo J. Stem cells in dental practice: perspectives in conservative pulp therapies. *J Clin Pediatr Dent* 2006, 31(1): 25-27.
350. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 2008, 37(9): 571-574.
351. d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2009, 312B(5): 408-415.
352. Nedel F, Andre Dde A, de Oliveira IO, Cordeiro MM, Casagrande L, Tarquinio SB, et al. Stem cells: therapeutic potential in dentistry. *J Contemp Dent Pract* 2009, 10(4): 90-96.
353. Nakashima M, Iohara K, Sugiyama M. Human dental pulp stem cells with highly angiogenic and neurogenic potential for possible use in pulp regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009, 20(5-6): 435-440.
354. Koyama N, Okubo Y, Nakao K, Bessho K. Evaluation of pluripotency in human dental pulp cells. *J Oral Maxillofac Surg* 2009, 67(3): 501-506.

355. Lee SY, Chiang PC, Tsai YH, Tsai SY, Jeng JH, Kawata T, et al. Effects of cryopreservation of intact teeth on the isolated dental pulp stem cells. *J Endod* 2010, 36(8): 1336-1340.
356. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol* 2010, 20(12): 715-722.
357. Sharma S, Sikri V, Sharma NK, Vivek M. Regeneration of tooth pulp and dentin: trends and advances introduction structure of pulpodentinal. *Annals of Neurosciences* 2010, 17: 1-36.
358. Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol* 2011, 698: 107-121.
359. Lei G, Yan M, Wang Z, Yu Y, Tang C, Wang Z, et al. Dentinogenic capacity: immature root papilla stem cells versus mature root pulp stem cells. *Biol Cell* 2011, 103(4): 185-196.
360. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011, 16(7): e997-1004.
361. Rosa V, Botero TM, Nor JE. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. *Int Dent J* 2011, 61 Suppl 1: 23-28.
362. Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Arch Oral Biol* 2012.
363. Kodonas K, Gogos C, Papadimitriou S, Kouzi-Koliakou K, Tziafas D. Experimental formation of dentin-like structure in the root canal implant model using cryopreserved swine dental pulp progenitor cells. *J Endod* 2012, 38(7): 913-919.
364. Riccio M, Resca E, Maraldi T, Pisciotta A, Ferrari A, Bruzzesi G, et al. Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *Eur J Histochem* 2010, 54(4): e46.
365. Huang GT. Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: advancement and challenge. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011, 3: 788-800.
366. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001, 29(6): 532-539.
367. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation* 2005, 80(6): 836-842.
368. Deepak BS, Nandini DB. Stem cells: Challenges in endodontics. *J Pharm Bioallied Sci* 2012, 4(1): 84.
369. Hargreaves KM, Jackson DL, Bowles WR. Adrenergic regulation of capsaicin-sensitive neurons in dental pulp. *J Endod* 2003, 29(6): 397-399.
370. Arora V, Arora P, Munshi AK. Banking stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED): saving for the future. *J Clin Pediatr Dent* 2009, 33(4): 289-294.
371. Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, De Rosa A, Papaccio G. Methods for the identification, characterization and banking of human DPSCs: current strategies and perspectives. *Stem Cell Rev* 2011, 7(3): 608-615.
372. Arthur A, Shi S, Zannettino AC, Fujii N, Gronthos S, Koblar SA. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells* 2009, 27(9): 2229-2237.
373. Kiran S, Bargale S, Srinivasan I. Paving the way for future solutions through human exfoliated deciduous teeth (shed). *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*. 2011.
374. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LV, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(10): 5807-5812.

375. Sedgley CM, Botero TM. Dental stem cells and their sources. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 549-561.
376. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res* 2005, 84(10): 907-912.
377. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004, 364(9429): 149-155.
378. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, et al. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res* 2006, 41(4): 303-310.
379. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res* 2007, 10(3): 149-160.
380. Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res* 2005, 8(3): 191-199.
381. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix *in vivo*. *Connect Tissue Res* 2002, 43(2-3): 406-408.
382. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci* 2010, 52(4): 541-552.
383. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 2008, 12(2): 113-118.
384. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament *in vivo*. *Cell Tissue Res* 2007, 327(2): 301-311.
385. Morsczeck C, Vollner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation *in vitro*. *Clin Oral Invest* 2010, 14(4): 433-440.
386. LePrince JG, Zeitlin BD, Tolar M, Peters OA. Interactions between immune system and mesenchymal stem cells in dental pulp and periapical tissues. *Int Endod J* 2012, 45(8): 689-701.
387. Fouad AF, Levin L. Pulp Reactions to Caries and Dental Procedures. In: Hargreaves, K, Cohen, S (eds). *Pathways of the Pulp*. Elsevier St.Louis, 2011, pp 504-528.
388. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J* 2011, 44(10): 889-906.
389. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961, 25: 585-621.
390. Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Brit J Cancer* 2007, 96: 1020-1024.
391. Ju Z, Lenhard Rudolph K. Telomere dysfunction and stem cell ageing. *Biochimie* 2008, 90(1): 24-32.
392. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med* 2010, 5(4): 617-631.
393. Pereira LO, Rubini MR, Silva JR, Oliveira DM, Silva IC, Pocas-Fonseca MJ, et al. Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *Int Endod J* 2012, 45(12): 1080-1090.
394. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011, 3.
395. Graves DT, Li J, Cochran DL. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res* 2011, 90(2): 143-153.
396. Nair PN, Duncan HF, Pitt Ford TR, Luder HU. Histological, ultrastructural and quantitative investigations on the response of healthy human pulps to experimental capping with mineral trioxide aggregate: a randomized controlled trial. *Int End J* 2008, 41(2): 128-150.

397. Kim RH, Mehrazarin S, Kang MK. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for oral and systemic diseases. *Dent Clin North Am* 2012, 56: 651-675.
398. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000, 28(8): 875-884.
399. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT. Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod* 2011, 37(9): 1217-1224.
400. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis* 2002, 8(3): 147-159.
401. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(6): 348-381.
402. Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int Endod J* 2002, 35(8): 660-667.
403. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodont Res* 2006, 41(6): 547-553.
404. Suzuki T, Lee CH, Chen M, Zhao W, Fu SY, Qi JJ, et al. Induced migration of dental pulp stem cells for in vivo pulp regeneration. *J Dent Res* 2011, 90(8): 1013-1018.
405. Kim K, Lee CH, Kim BK, Mao JJ. Anatomically shaped tooth and periodontal regeneration by cell homing. *J Dent Res* 2010, 89(8): 842-847.
406. Kim JY, Xin X, Moiola EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue engineering Part A* 2010, 16(10): 3023-3031.
407. Mao JJ. Stem cells and the future of dental care. *NY State Dent J* 2008, 74(2): 20-24.
408. Bhatt A, Le Anh D. Craniofacial tissue regeneration: where are we? *J Calif Dent Assoc* 2009, 37(11): 799-803.
409. Aranha AMF, Zhang ZC, Neiva KG, Costa CAS, Hebling J, Nor JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endodont* 2010, 36(10): 1633-1637.
410. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endothelial cells: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007, 14(6): 1162-1171.
411. Marchionni C, Bonsi L, Alviano F, Lanzoni G, Di Tullio A, Costa R, et al. Angiogenic potential of human dental pulp stromal (stem) cells. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009, 22(3): 699-706.
412. Sousa JC. *Manual de antibióticos antibacterianos* 2<sup>a</sup> edn: Porto, 2006.
413. Hoshino E. How to prepare 3Mix-MP. 2009 [cited 2012 06/03/2012] Available from: <http://lstr.jp/e/information.html>
414. Darvell BW, Wu RC. "MTA"- an hydraulic silicate cement: review update and setting reaction. *Dent Mater* 2011, 27(5): 407-422.
415. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010, 36(3): 400-413.
416. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod* 2010, 36(1): 16-27.
417. Martinez LAV, Frazão PJR, Ferreira ETT, Costa C, Gioso MA. Descrição das técnicas radiográficas intra-orais utilizadas na Medicina Veterinária. *Rev Inst Ciênc Saúde* 2009, 27(1): 39-43.
418. Eisner ER. Oral-dental radiographic examination technique. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice* 1998, 28(5): 1063-71.

419. Torabinejad M, Corr R, Buhrley M, Wright K, Shabahang S. An animal model to study regenerative endodontics. *J Endod* 2011, 37(2): 197-202.
420. Yanpiset K, Vongsavan H, Sigurdsson A, Trope M. Efficacy of laser Doppler flowmetry for the diagnosis of revascularization of reimplanted immature dog teeth. *Dent Traumatol* 2001, 17(2): 63-70.
421. da Silva LAB, Nelson P, da Silva RAB, Flores DSH, Heilborn C, Johnson JD, et al. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010, 109(5): 779-787.
422. Temmerman L, Vral A, Meire M, Verbeeck RM, Deschepper E, Dermaut LR, et al. Pulpal regeneration and root development after subcutaneous transplantation of cryopreserved immature teeth in rats. *Cryobiology* 2012, 64(2): 81-90.
423. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, et al. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011, 37(11): 1536-1541.
424. Baek SH, Lee WC, Setzer FC, Kim S. Periapical bone regeneration after endodontic microsurgery with three different root-end filling materials: amalgam, SuperEBA, and mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2010, 36(8): 1323-1325.
425. Yamauchi N, Nagaoka H, Yamauchi S, Teixeira FB, Miguez P, Yamauchi M. Immunohistological characterization of newly formed tissues after regenerative procedure in immature dog teeth. *J Endod* 2011, 37(12): 1636-1641.
426. Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, Flores DSH, Ito IY, da Silva LAB. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010, 109(1): E36-E40.
427. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J* 2013.
428. Chueh LH, Huang GTJ. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: A paradigm shift. *J Endodont* 2006, 32(12): 1205-1213.
429. Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent* 2009, 31(2): 145-148.
430. Jung IY, Kim ES, Lee CY, Lee SJ. Continued development of the root separated from the main root. *J Endod* 2011, 37(5): 711-714.
431. Narayana P, Hartwell GR, Wallace R, Nair UP. Endodontic clinical management of a dens invaginatus case by using a unique treatment approach: a case report. *J Endod* 2012, 38(8): 1145-1148.
432. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod* 2012, 38(9): 1293-1297.
433. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endodont* 2013(0).
434. Garcia-Godoy F, Murray PE. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol* 2012, 28(1): 33-41.
435. Andreasen JO, Bakland LK. Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. *Dent Traumatol* 2012, 28(1): 13-18.
436. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *Pediatric Dent* 2008, 30(3): 206-210.

437. Watts A, Paterson RC. Initial biological testing of root canal sealing materials - a critical review. *J Dent* 1992, 20(5): 259-265.
438. Watts A, Paterson RC. 'Usage' testing of root canal sealing materials - a personal view. *J Dent* 1992, 20(5): 266-271.
439. Browne RM. Animal tests for biocompatibility of dental materials - relevance, advantages and limitations. *J Dent* 1994, 22 Suppl 2: S21-24.
440. Santos JMMd. Prevenção da microinfiltração coronária no tratamento endodôntico. Doutor thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
441. Windley W, 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005, 31(6): 439-443.
442. Ramos JC. Protecções Pulpares Directas. Estudo histopatológico. Doutor thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
443. Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S. The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments. *Int End J* 2002, 35(3): 245-254.
444. Ferreira MM, Botelho MF, Abrantes M, Oliveiros B, Carrilho EV. Quantitative scintigraphic analysis of pulp revascularization in autotransplanted teeth in dogs. *Arch Oral Biol* 2010, 55(11): 825-829.
445. Allard U, Stromberg U, Stromberg T. Endodontic treatment of experimentally induced apical periodontitis in dogs. *Endod Dent Traumatol* 1987, 3(5): 240-244.
446. Citrome GP, Kaminski EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. *J Endod* 1979, 5(10): 290-297.
447. Lebeau A. L'age du chien et celui de l'homme. Essais de statistique sur la mortalité canine.. *Bull Academ Vétér* 1953(26): 229-232.
448. Shabestari L, Taylor GN, Angus W. Dental eruption pattern of the Beagle. *J Dent Res* 1967, 46(1): 276-278.
449. Kremenak CR, Jr. Dental exfoliation and eruption chronology in beagles. *J Dent Res* 1967, 46(4): 686-693.
450. Friedman S, Torneck CD, Komorowski R, Ouzounian Z, Syrtash P, Kaufman A. In vivo model for assessing the functional efficacy of endodontic filling materials and techniques. *J Endod* 1997, 23(9): 557-561.
451. Friedman S, Komorowski R, Maillet W, Klimaite R, Nguyen HQ, Torneck CD. In vivo resistance of coronally induced bacterial ingress by an experimental glass ionomer cement root canal sealer. *J Endod* 2000, 26(1): 1-5.
452. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010, 54(2): 291-312.
453. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011, 112(5): 662-666.
454. Huang X, Zhang J, Huang C, Wang Y, Pei D. Effect of intracanal dentine wettability on human dental pulp cell attachment. *Int Endod J* 2012, 45(4): 346-353.
455. Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pagavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps e open apices. *Dent Traumatol*. 2002, 18(4): 217-221.
456. Beslot-Neveu A, Bonte E, Baune B, Serreau R, Aissat F, Quinquis L, et al. Mineral trioxide aggregate versus calcium hydroxide in apexification of non vital immature teeth: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2011, 12: 174.
457. Steinig TH, Regan JD, Gutmann JL. The use and predictable placement of Mineral Trioxide Aggregate in one-visit apexification cases. *Aust Endod J* 2003, 29: 34-42.

458. White JD, Lacefield WR, Chavers LS, Eleazer PD. The effect of three commonly used endodontic materials on the strength and hardness of root dentin. *J Endod* 2002, 28(12): 828-830.
459. Wen PH, Liou JU, Duh BR. Apexification of nonvital immature mandibular premolars using two different techniques. *J Dent Sci* 2009, 4(2): 96-101.
460. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int End J* 1991, 24(3): 119-125.
461. Lee YL, Lee BS, Lin FH, Yun Lin A, Lan WH, Lin CP. Effects of physiological environments on the hydration behavior of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 2004, 25(5): 787-793.
462. Lee YL, Lin FH, Wang WH, Ritchie HH, Lan WH, Lin CP. Effects of EDTA on the hydration mechanism of mineral trioxide aggregate. *J Dent Res* 2007, 86(6): 534-538.
463. Camilleri J. Scanning electron microscopic evaluation of the material interface of adjacent layers of dental materials. *Dent Mater*: 2011, 27(9): 870-878.
464. Bidar M, Disfani R, Gharagozlo S, Rouhani A, Forghani M. Effect of previous calcium hydroxide dressing on the sealing properties of the new endodontic cement apical barrier. *Eur J Dent* 2011, 5(3): 260-264.
465. Bidar M, Disfani R, Gharagozloo S, Akbari M, Rouhani A. The effect of calcium hydroxide on the short and long-term sealing properties of MTA apical barrier. *Iran Endod J* 2011, 6(1): 6-10.
466. Hachmeister DR, Schindler WG, Walker WA, 3rd, Thomas DD. The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. *J Endod* 2002, 28(5): 386-390.
467. Bidar M, Disfani R, Gharagozloo S, Khojyehzad S, Rouhani A. Medication with calcium hydroxide improved marginal adaptation of mineral trioxide aggregate apical barrier. *J Endod* 2010, 36(10): 1679-1682.
468. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int End J* 1996, 29(2): 125-130.
469. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int End J* 1996, 29(2): 118-124.
470. Akgun OM, Altun C, Guven G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009, 108(2): 62-65.
471. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardinelli N, et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J Endodont* 2013, 39(1): 115-118.
472. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J Pharm Bioallied Sci* 2012, 4(Suppl 2): S230-233.
473. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod* 2012, 38(10): 1372-1375.
474. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod* 2012, 38(1): 91-94.
475. Boutsoukias C, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, et al. The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod* 2010, 36(10): 1664-1668.
476. Boutsoukias C, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurement of pressure and flow rates during irrigation of a root canal *ex vivo* with three endodontic needles. *Int Endod J* 2007, 40(7): 504-513.

477. Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990, 16(12): 580-588.
478. ISO. Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. 2008.
479. Schmitt JM, Buck DC, Joh SP, Lynch SE, Hollinger JO. Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects. *Journal of Periodontology* 1997, 68(11): 1043-1053.
480. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jonsson J. Osseous response to implanted natural bone-mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg* 1992, 50(3): 241-249.
481. Holland R, Mazuqueli L, de Souza V, Murata SS, Dezan Junior E, Suzuki P. Influence of the type of vehicle and limit of obturation on apical and periapical tissue response in dogs' teeth after root canal filling with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007, 33(6): 693-697.
482. Felipe WT, Felipe MC, Rocha MJ. The effect of mineral trioxide aggregate on the apexification and periapical healing of teeth with incomplete root formation. *Int Endod J* 2006, 39(1): 2-9.
483. Tewary S, Luzzo J, Hartwell G. Endodontic radiography: who is reading the digital radiograph? *J Endod* 2011, 37(7): 919-921.
484. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan PA. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 1999, 25(1): 1-5.
485. Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review - part II: leakage and biocompatibility investigations. *J Endod* 2010, 36(2): 190-202.
486. Dreger LA, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod* 2012, 38(3): 324-329.
487. Perinpanayagam H. Cellular response to mineral trioxide aggregate root-end filling materials. *J Can Dent Assoc* 2009, 75(5): 369-372.
488. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. *J Endodont* 2009, 35: 731-736.
489. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2005, 31(2): 97-100.
490. Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MC, Felipe WT, et al. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod* 2010, 36(8): 1347-1353.
491. Nosrat A, Nekoofar MH, Bolhari B, Dummer PM. Unintentional extrusion of mineral trioxide aggregate: a report of three cases. *Int Endod J* 2012, 45(12): 1165-1176.
492. Tezel B, Uysal S, Turgut MD, Cehreli ZC. Inadvertent MTA extrusion in an immature traumatized permanent incisor. *J Clin Pediatr Dent* 2010, 35(2): 145-148.
493. Brito-Junior M, Faria-e-Silva AL, Quintino AC, Moreira-Junior G, Geber M, Camilo CC, et al. Orthograde retreatment failure with extruded MTA apical plug in a large periradicular lesion followed by surgical intervention: case report. *Gen Dent* 2012, 60(2): e96-100.
494. Mente J, Hage N, Pfeifferle T, Koch MJ, Dreyhaupt J, Staehle HJ, et al. Mineral trioxide aggregate apical plugs in teeth with open apical foramina: a retrospective analysis of treatment outcome. *J Endod* 2009, 35(10): 1354-1358.

495. Tahan E, Celik D, Er K, Tasdemir T. Effect of unintentionally extruded mineral trioxide aggregate in treatment of tooth with periradicular lesion: a case report. *J Endod* 2010, 36: 760-763.
496. Lopes H, Siqueira J. *Endodontia - Biologia e Técnica* 2010: 951.
497. Castellucci A. The use of mineral trioxide aggregate in clinical e surgical endodontics. *Dent Today* 2003, 22(3): 74-81.
498. Vanka A, Ravi KS, Shashikiran ND. Apexification with MTA using internal matrix: report of 2 cases. *J Clin Pediatr Dent* 2010, 34: 197-200.
499. Sood R, Kumar Hans M, Shetty S. Apical barrier technique with mineral trioxide aggregate using internal matrix: a case report. *Compend Contin Educ Dent* 2012, 33(6): e88-90.
500. Rudagi KB, Rudagi B. One-step apexification in immature tooth using grey mineral trioxide aggregate as an apical barrier and autologous platelet rich fibrin membrane as an internal matrix. *J Conserv Dent* 2012, 15(2): 196-199.
501. Ballesio I, Marchetti E, Mummolo S, Marzo G. Radiographic appearance of apical closure in apexification: follow-up after 7-13 years. *Eur J Paediatr Dent* 2006, 7(1): 29-34.
502. Paranjpe A, Smoot T, Zhang H, Johnson JD. Direct contact with mineral trioxide aggregate activates and differentiates human dental pulp cells. *J Endod* 2011, 37(12): 1691-1695.
503. Paranjpe A, Zhang H, Johnson JD. Effects of mineral trioxide aggregate on human dental pulp cells after pulp-capping procedures. *J Endod* 2010, 36(6): 1042-1047.
504. Guerra F. *Biomimética Formulações haptotáticas para aplicação em regeneração óssea*. Doutorado thesis, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2003.
505. Huang GTJ. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008, 36(6): 379-386.
506. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part I: periapical health. *Int Endod J* 2011, 44(7): 583-609.
507. Miles JP, Gluskin AH, Chambers D, Peters OA. Pulp capping with mineral trioxide aggregate (MTA): a retrospective analysis of carious pulp exposures treated by undergraduate dental students. *Oper Dent* 2010, 35(1): 20-28.
508. Komabayashi T, Zhu Q. Innovative endodontic therapy for anti-inflammatory direct pulp capping of permanent teeth with a mature apex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010, 109(5): e75-81.
509. Bjonrdal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Nasman P, et al. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci* 2010, 118(3): 290-297.
510. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod* 2011, 37(5): 581-587.
511. Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med* 2009, 4(5): 697-707.
512. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* 1996, 245(2): 267-292.
513. Bosshardt DD, Nanci A. Hertwig's epithelial root sheath, enamel matrix proteins, and initiation of cementogenesis in porcine teeth. *J Clin Periodontol* 2004, 31(3): 184-192.
514. Sculean A, Stavropoulos A, Berakdar M, Windisch P, Karring T, Brex M. Formation of human cementum following different modalities of regenerative therapy. *Clin Oral Investig* 2005, 9(1): 58-64.
515. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000* 2006, 40: 164-172.

516. Ripamonti U, Parak R, Petit JC. Induction of cementogenesis and periodontal ligament regeneration by recombinant human transforming growth factor-beta3 in Matrigel with rectus abdominis responding cells. *J Periodont Res* 2009, 44(1): 81-87.
517. Haney JM, Leknes KN, Lie T, Selvig KA, Wikesjo UM. Cemental tear related to rapid periodontal breakdown: a case report. *J Periodontol* 1992, 63(3): 220-224.
518. Watanabe C, Watanabe Y, Miyauchi M, Fujita M, Watanabe Y. Multiple cemental tears. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012, 114(3): 365-372.
519. Lin HJ, Chang SH, Chang MC, Tsai YL, Chiang CP, Chan CP, et al. Clinical fracture site, morphologic and histopathologic characteristics of cemental tear: role in endodontic lesions. *J Endod* 2012, 38(8): 1058-1062.
520. Lin HJ, Chan CP, Yang CY, Wu CT, Tsai YL, Huang CC, et al. Cemental tear: clinical characteristics and its predisposing factors. *J Endod* 2011, 37(5): 611-618.
521. Koulaouzidou EA, Papazisis KT, Economides NA, Beltes P, Kortsaris AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement, and glass-ionomer cement against three fibroblastic cell lines. *J Endod* 2005, 31(1): 44-46.
522. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part I. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003, 36(2): 75-85.
523. Mallineni SK, Nuvvula S, Matinlinna JP, Yiu CK, King NM. Biocompatibility of various dental materials in contemporary dentistry: a narrative insight. *J Investig Clin Dent* 2012.
524. Kao DW, Fiorellini JP. Regenerative periodontal therapy. *Front Oral Biol* 2012, 15: 149-159.
525. McCulloch CA, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J Periodont Res* 1983, 18(4): 339-352.
526. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *J Clin Periodontol* 2011, 38(8): 721-731.
527. Vojinovic O, Vojinovic J. Periodontal cell migration into the apical pulp during the repair process after pulpectomy in immature teeth: an autoradiographic study. *J Oral Reab* 1993, 20(6): 637-652.
528. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 2002, 20(6): 587-591.
529. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 2005, 20(8): 1394-1402.
530. Demarco FF, Casagrande L, Zhang Z, Dong Z, Tarquinio SB, Zeitlin BD, et al. Effects of morphogen and scaffold porogen on the differentiation of dental pulp stem cells. *J Endod* 2010, 36(11): 1805-1811.
531. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol* 2011, 56(7): 709-721.
532. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *J Cell Physiol* 2006, 206(3): 693-701.
533. Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, et al. Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC cell biology* 2010, 11: 32.
534. Yang H, Ma L, Han X, Yang L, Tian C, Wang Y. The effects of tumor necrosis factor-alpha on mineralization of human dental apical papilla cells. *J Endod* 2012, 38(7): 960-964.

535. Yang SF, Yang ZP, Chang KW. Continuing root formation following apexification treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990, 6(5): 232-235.
536. Heithersay GS. Periapical repair following conservative endodontic therapy. *Aust Dent J* 1970, 15(6): 511-518.
537. Rincon JC, Young WG, Bartold PM. The epithelial cell rests of Malassez - a role in periodontal regeneration? *J Periodontol Res* 2006, 41(4): 245-252.
538. Kjaer I, Nolting D. The human periodontal membrane: focusing on the spatial interrelation between the epithelial layer of Malassez, fibers, and innervation. *Acta Odontol Scand* 2009, 67(3): 134-138.
539. Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AE. Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003, 123(5): 527-533.
540. Brunette DM, Heersche JN, Purdon AD, Sodek J, Moe HK, Assuras JN. In-vitro cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine rests of Malassez. *Arch Oral Biol* 1979, 24(3): 199-203.
541. Struys T, Schuermans J, Corpas L, Politis C, Vrielinck L, Schepers S, et al. Proliferation of epithelial rests of Malassez following auto-transplantation of third molars: a case report. *J Med Case Rep* 2010, 4: 328.
542. Athanassiou-Papaefthymiou M, Papagerakis S, Papagerakis P. Stem cells in the epithelial cell rests of malassez (ERM). *J Dent Res* 2010, 89(Spec Iss B).
543. Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent* 2007, 86(3): 33-35.
544. Soares AJ, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod* 2013, 39(3): 417-420.
545. Law AS. Outcomes of regenerative endodontic procedures. *Dent Clin North Am* 2012, 56(3): 627-637.

## **VI. Anexos**

---



Tabela A. Classificação de Patterson <sup>cit in 59</sup>

Classificação	Descrição
Classe I	Desenvolvimento parcial da raiz, com abertura do ápice maior que o diâmetro do canal. Desenvolvimento radicular a cerca de $\frac{1}{2}$ do seu comprimento total estimado. Ápice aberto e divergente (forma de funil) para apical (transição para o etapa 8 de Nolla).
Classe II	Desenvolvimento quase completo da raiz, com abertura do ápice maior que o diâmetro do canal. Desenvolvimento radicular de $\frac{2}{3}$ do comprimento estimado e ápice de paredes divergente para apical. Canal radicular com a forma de trombone (etapa 8 de Nolla).
Classe III	Desenvolvimento completo da raiz, com a abertura apical com o mesmo diâmetro do canal. Desenvolvimento radicular a cerca de $\frac{3}{4}$ do seu comprimento estimado. Ápice de paredes paralelas (transição para o etapa 9).
Classe IV	Desenvolvimento completo da raiz, com abertura do ápice com mais pequeno que o diâmetro do canal. Ápice aberto e canal de forma cilíndrica ( etapa 9).
Classe V	Desenvolvimento radicular completo (etapa 10 Nolla).

Tabela B. Classificação de Moorrees <sup>60</sup>

Descrição		
Coroa	Formação inicial das cúspides	Ci
	Coalescência das cúspides	Cco
	Esboço das cúspides completo	Coc
	$\frac{1}{2}$ da coroa completa	Cr.1/2
	$\frac{3}{4}$ da coroa completa	Cr.3/4
	Coroa completa	Cr.c
	Formação inicial da raiz	Ri
	Formação inicial da furca	Cl.i
Raiz	$\frac{1}{4}$ do comprimento radicular	R1/4
	$\frac{1}{2}$ do comprimento radicular	R1/2
	$\frac{3}{4}$ do comprimento radicular	R3/4
	Comprimento da raiz completo	Rc
Ápice	$\frac{1}{2}$ do ápice radicular encerrado	A1/2
	Ápice radicular encerrado	Ac

Tabela C. Classificação de Nolla <sup>cit in 61</sup>

Etapas	Classificação de Nolla
0	Ausência de cripta: sem imagem radiográfica
1	Presença de cripta: linha circular radiopaca, envolvendo uma zona radiotransparente
2	Calcificação inicial: imagem radiográfica circular ou em meia lua, dentro da cripta; início de formação das cúspides
3	Um terço da formação da coroa completa: continua a formação das cúspides (fusão cuspídea);
4	Dois terços da coroa completa: início da deposição de dentina
5	Coroa quase completa: mínima constrição cervical
6	Coroa completa: coroa completamente mineralizada até à junção amelo-cementária; forma de coroa definitiva
7	Um terço da raiz completa; comprimento radicular inferior ao da coroa
8	Dois terços da raiz completa: o comprimento da raiz é igual ou superior ao da coroa; paredes divergentes e ápice amplo
9	Raiz quase completa e ápice aberto: comprimento radicular maior do que o da coroa; paredes do canal paralelas e ápice aberto
10	Ápice encerrado; constrição definitiva

Tabela D. Resumo de casos e séries de casos clínicos de dentes permanentes imaturos com necrose pulpar, submetidos a processos de revascularização pulpar.

Referências	Idade	N.º do dente tratado*	Diagnóstico	Solução de irrigação	Técnica de irrigação/profundidade	Medicação intracanal (MI)	Método de colocação da MI	Duração da MI	Presença de tecidos no espaço canalar	Indução de hemorragia e formação de coágulo	barreira cervical/restauração
Iwaya et al. 2001 <sup>9</sup>	13	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% (semanalmente durante 5 semanas)	Porção coronal da raiz	Metronidazol Ciprofloxacina (semanalmente durante 5 semanas)	NM	4 semanas	Sim	"tira-nervos" inserido no tecido vital; não houve hemorragia	Ca(OH) <sub>2</sub> CIV (RC)
Banchi e Trope, 2004 <sup>10</sup>	11	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25% CHX	Menos de 1 mm do ápice	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	26 dias	Sim	Explorador endodôntico 3 mm abaixo da JAC	MTA RC
Chueh e Huang, 2006 <sup>48</sup>	10	35	Abcesso apical crônico	NaOCl 2,5%	Câmara pulpar	Ca(OH) <sub>2</sub>	NM	3 meses	Barreira de tecido mineralizado	Não efetuado	Ca(OH) <sub>2</sub> Cavit Amálgama
	10	45	Abcesso apical agudo	NaOCl 2,5%	Câmara pulpar	Ca(OH) <sub>2</sub>	NM	8 semanas	Barreira de tecido mineralizado	Presença de hemorragia	Ca(OH) <sub>2</sub> Cavit CIV
	10	35	Abcesso apical crônico	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Formocresol (antes de ser encaminhado)	NM	1 mês	Barreira de tecido mineralizado	Não efetuado	Ca(OH) <sub>2</sub> Cavit CIV (removido após 18,5 meses e substituído por amálgama)
Perrino, 2007 <sup>43</sup>	9	45	Abcesso apical agudo	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Ca(OH) <sub>2</sub>	NM	5 semanas	Barreira de tecido mineralizado	Não efetuado	Ca(OH) <sub>2</sub> IRM (removido após 3 anos e substituído por amálgama)
	8	11	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25% CHX	Menos de 1 mm do ápice	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	NM	Sim; tecido vital	Explorador endodôntico 3 mm abaixo da JAC	MTA RC
Thibodeau e Trope, 2007 e 2009 <sup>10, 47</sup>	9	11	Abcesso apical agudo	NaOCl 1,25%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Cefaclor	Lêntulo e pontas de papel esterilizadas	11 semanas	Não	Lima endodôntica para criar hemorragia	wMTA RC
Jung et al. 2008 <sup>103</sup>	10	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25%	Irrigação canal	(1) Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	88 dias	Barreira de tecido mineralizado	Não efetuado	Guta percha RC
						(2) Eritromicina Ca(OH) <sub>2</sub> (3) Ca(OH) <sub>2</sub>					
Jung et al. 2008 <sup>103</sup>		44	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	67 dias	Barreira de tecido mineralizado	Não efetuado	Guta percha RC

Referências	Idade	N.º do dente tratado*	Diagnóstico	Solução de irrigação	Técnica de irrigação/profundidade	Medicação intracanal (MI)	Método de colocação da MI	Duração da MI	Presença de tecidos no espaço canalar	Indução de hemorragia e formação de coágulo	barreira cervical/restauração	
Jung et al. 2008 <sup>103</sup>	10	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25%	Irrigação canalar	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	11 dias	Sim	Não efetuado	MTA RC	
	10	35	Periodontite apical assintomática (dente deixado aberto)	NaOCl 5,25%	Irrigação canalar	(1) Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina (2) Ca(OH) <sub>2</sub>	Lêntulo	(1) 30 dias (2) 40 dias	Sim	Hemorragia observada após 30 dias	MTA RC	
	13	35	Periodontite apical sintomática	NaOCl 5,25%	Irrigação canalar	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	2 semanas	Sim	Não efetuado	MTA IRM	
	10	35	Periodontite apical assintomática (dente deixado aberto)	NaOCl 5,25%	Irrigação canalar	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	1 semana	Não	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	MTA RC	
	9	35	Abcesso apical crônico	2,5% NaOCl	Irrigação canalar	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	1 semana	Sim	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	MTA RC	
	14	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 2,5%	Irrigação canalar	Ca(OH) <sub>2</sub> (aquoso)	NM	1 semana	Não	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	MTA RC	
	10	45	Periodontite apical assintomática (dente deixado aberto)	NaOCl 2,5%	Irrigação canalar	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	3 semanas	Não	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	Collatape™ MTA RC	
	Cotti et al. 2008 <sup>11</sup>	9	11	Abcesso apical crônico	NaOCl 5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	Porção coronal da raiz	Ca(OH) <sub>2</sub> (pó)	Pluggger	2 semanas	Sim	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	MTA CIV RC
	Shah et al. 2008 <sup>104</sup>	9-18	14 dentes	Abcesso apical crônico Periodontite apical assintomática	NaOCl 2,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%	Irrigação canalar	Formocresol	Bola de algodão	Consulta seguinte	Não	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	CIV
	Chueh et al. 2009 <sup>275</sup>	6-14	23 dentes	Abcesso apical crônico Periodontite apical assintomática Abcesso apical agudo	NaOCl 2,5%	Irrigação canalar	Ca(OH) <sub>2</sub>	Colocado de forma imprecisa	1-25 meses	Barreira de tecido mineralizado	Lima endodôntica para induzir a hemorragia	(1) Guta-percha RC ou amalgama (2) MTA Guta-percha RC ou amalgama (3) Amálgama

Referências	Idade	N.º do dente tratado*	Diagnóstico	Solução de irrigação	Técnica de irrigação/profundidade	Medicação intracanal (MI)	Método de colocação da MI	Duração da MI	Presença de tecidos no espaço canalar	Indução de hemorragia e formação de coágulo	barreira cervical/restauração
Ding et al. 2009 <sup>05</sup>	8-11	3 dentes (disponíveis para análise)	Abcesso apical crônico Abcesso apical agudo	NaOCl 5,25%	Gentilmente irrigado	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	1 semana	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	MTA RC
Shin et al. 2009 <sup>07</sup>	12	45	Abcesso apical crônico	NaOCl 6% Soro fisiológico CHX 2%	Porção coronal da raiz	Nenhuma (1 sessão)	NA	NA	Sim	Lima endodôntica para criar hemorragia	wMTA RC
Reynolds et al. 2009 <sup>06</sup>	11	2 dentes	Abcesso apical crônico	NaOCl 6% Solução salina CHX 2%	2 mm aquém do ápice	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina (selamento canalar com adesivo)	Aguilha 2mm aquém do ápice	4 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	wMTA RC
Kim et al. 2010 <sup>08</sup>	7	11	Periodontite apical sintomática	NaOCl 3%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina (pigmentação + branqueamento)	Lêntulo	6 semanas	NM	Cones de papel para induzir hemorragia	MTA CIV RC
Petrino et al. 2010 <sup>13</sup>	6-13	5 dentes	Abcesso apical crônico Periodontite apical assintomática	NaOCl 5,25% Solução salina CHX 2%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	3 semanas	Não	Lima endodôntica para criar hemorragia e Collaplug <sup>em</sup> (Z)	MTA RC
Thomson et al. 2010 <sup>09</sup>	12	35	Abcesso apical crônico	NaOCl 1% (ativado por US)	2 mm aquém do ápice	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	6 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia 3mm abaixo JEC	wMTA CIV RC
Iwaya et al. 2011 <sup>11</sup>	7	31	Abcesso apical agudo	NaOCl 5% Peróxido de hidrogênio 3%	Terço coronário da raiz	Ca(OH) <sub>2</sub>	NM	6 semanas	Barreira de tecido mineralizado	Nenhum	Guia-percha RC
Cehrelli et al. 2011 <sup>10</sup>	8-11	6 dentes	Periodontite apical assintomática	NaOCl 2,5%	1-2 mm abaixo do orifício	Ca(OH) <sub>2</sub>	Colocado de forma imprecisa	3 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	MTA CIV RC ou amálgama
Nosrat et al. 2011 <sup>12</sup>	9	36	Periodontite apical sintomática	NaOCl 5,25%	Irrigação canal passiva	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Colocada com lima endodôntica tipo K	3 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	cimento CEM (mistura enriquecida com cálcio) /CIV/ Amálgama
	8	46	Abcesso apical crônico	NaOCl 5,25%	Irrigação canal passiva	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Colocada com lima endodôntica tipo K	3 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	cimento CEM CIV Amálgama

Referências	Idade	N.º do dente tratado*	Diagnóstico	Solução de irrigação	Técnica de irrigação/profundidade	Medicação intracanal (MI)	Método de colocação da MI	Duração da MI	Presença de tecidos no espaço canalar	Indução de hemorragia e formação de coágulo	barreira cervical/restauração
Torabinejad e Turman, 2011 <sup>13</sup>	11	15	Periodontite apical sintomática	NaOCl 5,25%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Porta-amálgama e pluggers endodônticos	22 dias	NM	Não foi criada hemorragia; colocado plasma rico em plaquetas	MTA Cavit Amálgama
Chen et al. 2012	7 – 13	20 dentes	"Lesão apical osteolítica"	NaOCl 5,25%	Abundantemente irrigado	Ca(OH) <sub>2</sub>	Colocado na metade coronária do canal	Até 4 semanas	NM	Lima/hemorragia (6 casos não houve hemorragia satisfatória)	MTA RC
Nosrat et al. 2012 <sup>30</sup>	14	11	Periodontite apical sintomática	NaOCl 5,25%	Irrigação passiva	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lima endodôntica K50	4 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	wMTA "Restauração definitiva"
Lenzi e Trope, 2012 <sup>18</sup>	8	11	Periodontite apical sintomática	NaOCl 5,25%	Irrigação passiva	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lima endodôntica K50	4 semanas	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	wMTA "Restauração definitiva"
			Inconclusivo	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	35 dias	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	MTA Angelus RC
Jadhav et al. 2012 <sup>16</sup>	15-28	21	Periodontite apical assintomática	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lêntulo	35 dias	NM	Lima endodôntica para criar hemorragia	MTA Angelus RC
			Periodontite apical	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	Lima endodôntica esterilizada 40	NM	2mm abaixo do CT para criar hemorragia (10) Colocado PRP+coágulo (10)	NM	2mm abaixo do CT para criar hemorragia (10) Colocado PRP+coágulo (10)
Jeeruphan et al. 2012 <sup>16</sup>	8-24	20 dentes	PA apical sintomática (17) e assintomática (3)	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	28,85 dias(+/- 13,08)	NM	Lima/hemorragia e matriz de colágeno	MTA/ CIV RC
Kim et al. 2012 <sup>17</sup>	10-12	3 dentes	Periodontite apical sintomática	NaOCl 3 %	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Cefalor	Lêntulo	2 semanas	NM	Lima endodôntico para provocar hemorragia	MTA/RC
Cahrell et al. 2012 <sup>15</sup>	8	11, 21	Periodontite apical sintomática	NaOCl 2,5%	Irrigação canal	Ca(OH) <sub>2</sub>	NM	3 semanas	NM	NM	MTA RC
Chen et al. 2013 <sup>32</sup>	8	45	Abscesso apical crônico	NaOCl 3% Solução salina CHX	Irrigação canal	Metronidazol Ciprofloxacina Minociclina	NM	1 mês	NM	Lima endodôntica para provocar hemorragia	MTA Cavit CIV
Soares et al. 2013 <sup>34</sup>	9	21	Necrose pulpar	Solução salina CHX 2%	Irrigação canal	Ca(OH) <sub>2</sub> e CHX 2%	Lêntulo	21 dias		Lima endodôntica para provocar hemorragia	MTA Cososol RC

NA – não aplicável; NM - não mencionado; RC – resina composta; CIV – cimento ionômero de vidro; wMTA – white MTA; CHX; Clorohexidina. \* Federação Dentária Internacional. Adaptado de Law<sup>23, 545</sup> e Hargreaves<sup>20, 32</sup>.

Tabela E. Resultados (outcomes) dos procedimentos de revascularização em relatos de casos ou série de casos clínicos.

Referências	Métodos de avaliação	n	Sucesso*	Período de avaliação	Patologia Periapical	Comprimento radicular	Espessura das paredes dentinárias	Resposta aos testes de sensibilidade pós tratamento
Iwaya et al. 2001 <sup>9</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	30 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	Positiva
Banchs e Tropé, 2004 <sup>102</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	2 anos	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	Positiva
Chueh e Huang, 2006 <sup>428</sup>	Imagiológico e clínico	4	4/4	7-60 meses	Resolvida (4)	Aumento (4)	Aumento (4)	NM
Petrino et al. 2007 <sup>543</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	8 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM
Thibodeau e Tropé, 2007 <sup>10</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	12,5 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	Negativa
Jung et al. 2008 <sup>63</sup>	Imagiológico e clínico	9	9/9	1-5 anos	Resolvida (8) Reduzida (1)	Aumento (7) Questionável (2)	Aumento (9)	NM
Cotti et al. 2008 <sup>11</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	30 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM
Shah et al. 2008 <sup>104</sup>	Imagiológico e clínico	14	13/14	6-42 meses	Resolvida (13)	Aumento (8)	Aumento (11)	NM
Chueh et al. 2009 <sup>275</sup>	Imagiológico e clínico	23	23/23	6-108 meses	Resolvida (23)	Continuação do desenvolvimento radicular (23)	Continuação do desenvolvimento radicular (23)	NM
Ding et al. 2009 <sup>65</sup>	Imagiológico e clínico	12	3/12	≥1 ano	Resolvida (3) Desistiram (6) Não comparência (3)	Continuação do desenvolvimento radicular com encerramento do ápice (3) Sem alterações (2)	Continuação do desenvolvimento radicular com encerramento do ápice (3) Aumento (2)	Positiva
Reynolds et al. 2009 <sup>66</sup>	Imagiológico e clínico	2	2/2	18 meses	Resolvida (2)	Continuação do desenvolvimento radicular com encerramento do ápice (3)	Aumento (2)	NM
Shin et al. 2009 <sup>67</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	19 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	Positiva
Thibodeau et al. 2009 <sup>429</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	16 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM
Kim et al. 2010 <sup>68</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	8 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM
Petrino et al. 2010 <sup>13</sup>	Imagiológico e clínico	6	3/6	9-12 meses	Resolvida (1)	Aumento (2) Sem alteração (4)	Aumento (2) Sem alteração (4)	Positiva
Cehrelli et al. 2011 <sup>10</sup>	Imagiológico e clínico	6	6/6	9-10 meses	Resolvida (6)	Aumento (6)	Aumento (6)	Positiva
Nosrat et al. 2011 <sup>12</sup>	Imagiológico e clínico	2	2/2	15-18 meses	Resolvida (2)	Sem alteração (2)	Aumento (2)	Negativa
Torbinejad e Turman, 2011 <sup>13</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	5,5 meses	Resolvida (1)	Incapaz de determinar (1)	Aumento (1)	Negativa
Lenzi e Tropé, 2012 <sup>18</sup>	Imagiológico e clínico	2	1/2	21 meses	Resolvida (2)	Incapaz de determinar (2)	Aumento (1) Sem alterações (1)	NM
Jadhav et al. 2012 <sup>116</sup>	Imagiológico e clínico	20	20/20	12 meses	Resolvida (20)	Aumento (20)	Aumento (20)	NM
Kim, et al. 2012 <sup>17</sup>	Imagiológico e clínico	3	3/3	24-48 meses	Resolvido (3)	Aumento(3)	Aumento(3)	NM
Jeeurphan et al. 2012 <sup>16</sup>	Imagiológico e clínico	20	20/20	14,2 ±7,8	Resolvida (16) Em resolução (4)	Aumento (19) Sem aumento(1)	Aumento (20)	NM
Cehrelli et al. 2012	Imagiológico e clínico	1	1/1	18 meses	Resolvida (2)	Aumento (2)	Aumento (2)	Positiva
Chen et al. 2012	Imagiológico e clínico	20	20/20	6-26 meses	Resolvida (20)	Aumento (20)	Aumento (20) Continuação do desenvolvimento radicular significativo(15)	NM
Nosrat et al. 2012 <sup>120</sup>	Imagiológico e clínico	2	2/2	6 anos	Resolvida (2)	Sem alterações(2)	Sem alterações(2)	NM
Chen et al. 2013 <sup>122</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	12 meses	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM
Soares et al. 2013 <sup>54</sup>	Imagiológico e clínico	1	1/1	2 anos	Resolvida (1)	Aumento (1)	Aumento (1)	NM

\* Aumento de espessura das paredes dentinárias e comprimento da raiz e/ ou encerramento apical.  
 • Adaptado de Law<sup>123-56</sup> e Hargreaves<sup>60,32</sup>.

Tabela F. Lista de materiais utilizados no protocolo experimental

Materiais	Fabricante	Lote	Validade
Absorbent Paper Points ISO 80	VDW GmbH, Munique, Alemanha	26889	2015-09
Água Biodestilada esterilizada	B Braun Medical, Queluz de Baixo, Portugal	9193B01	2012-04
Calcur®	Voco GmbH, Cuxhaven, Alemanha	0932251	2011-06
Cavit®-G	3M ESPE AG, Seefeld, Alemanha	397167	2013-07
Diques de Goma	Proclinc	05071001	2015-07
Iodopovidona 10%	Betadine		
Kendall Monoject™	Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA	803522	2012-12
Ketac® Fil Plus Aplicap™	3M ESPE AG, Seefeld, Alemanha	55020, 55030	2013-09, 2013-06
NaCl 0,9% B. Braun	B Braun Medical, Queluz de Baixo, Portugal	9491B02 0311B08	2012-10
Nic tone Dental Dam	Proclinc	04011001	2015-01
Oraseal®	Ultradent, South Jordan, UTAH, USA	B5JVQ, B5C4N	2012-09, 2012-06
Pontas de papel Absorvente ISO 90-140	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	021109 011209	2014-11, 2014-12
ProRoot® MTA White	Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA	09001921	2012-04
Super Polish®	Kerr, Bioggio, Suíça	3282188	2012-09

Tabela G. Lista de produtos referenciados na tese e respetivos endereços na internet

Materiais	Fabricante	Endereço na Internet
Absorbent Paper Points ISO 90-140	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Absorbent Paper Points ISO 80	VDW GmbH, Munique, Alemanha	<a href="http://www.vdw.com">www.vdw.com</a>
Butorfanol	Dolorex®, Merck Animal Health	<a href="http://www.msd-animal-health.pt/">www.msd-animal-health.pt/</a>
Cavit®-G,	3M ESPE, Seefeld, Alemanha	<a href="http://www.3m.com">www.3m.com</a>
Dexmedetomidina	Esteve Farma, Lda	<a href="http://www.esteve.pt/">www.esteve.pt/</a>
Diques de borracha	Proclinc	<a href="http://www.proclinc.es">www.proclinc.es</a>
Endo Z	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Gauge	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Gutta-Percha Plugger	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Isoflurano	Esteve Farma, Lda	<a href="http://www.esteve.pt/">www.esteve.pt/</a>
Kendall Monoject™	Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, MA, USA	<a href="http://www.tycohealthcare.com">www.tycohealthcare.com</a>
Ketac™ Fil Plus Aplicap™	3M ESPE, Seefeld, Alemanha	<a href="http://www.3m.com">www.3m.com</a>
Limas K	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Meloxicam	Meloxidyl®, Ceva	<a href="http://www.ceva.pt">www.ceva.pt</a>
Morfina 2%	B.Braun Medical	<a href="http://www.bbraun.pt/">www.bbraun.pt/</a>
MTA Endo Carrier	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
MTA Gun System	Dentsply Mallifer, CH Ballaigues, Suíça	<a href="http://www.dentsplymaillefer.com">www.dentsplymaillefer.com</a>
Propofol Lipuro 2%	B.Braun Medical	<a href="http://www.bbraun.pt/">www.bbraun.pt/</a>
ProRoot™ MTA White	Dentsply Tulsa, Johnson City, TN, USA	<a href="http://www.tulsadentalspecialties.com">www.tulsadentalspecialties.com</a>
Zoletil 50®	Virbac	<a href="http://www.virbac.cz">www.virbac.cz</a>

Tabela H. Índice de siglas, acrónimos e abreviaturas

AAE	<i>American Association of Endodontists</i>
BB	<i>Brown &amp; Brenn</i>
BMMSCs	Células estaminais mesenquimatosas da medula óssea ( <i>bone marrow mesenchymal stem cells</i> )
BMPs	Proteínas morfogénicas ósseas ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSP	Sialoproteína óssea ( <i>bone sialoprotein</i> )
CD44	Principal recetor de superfície celular para o HA
CHX	Clorohexidina
CIV	Cimento de inonómero de vidro
CNP	Controlo negativo pulpar
CNPA	Controlo negativo periapical
CS	Quitosano ( <i>chitosan</i> )
DFSCs	Células estaminais do folículo dentário ( <i>dental follicle stem cells</i> )
DMP-1	Proteína da matriz dentinária – I ( <i>dentin matrix protein-1</i> )
DPSCs	Células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes ( <i>dental pulp stem cells</i> )
DSP	Sialoproteína dentinária ( <i>dentin sialoprotein</i> )
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária ( <i>dentin sialoprotein</i> )
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético ( <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> )
EGF	Fator de crescimento epidermal ( <i>epidermal growth factor</i> )
EMD	<i>Enamel matrix derivative</i>
ERMs	Restos epiteliais de Malassez ( <i>epithelial rests of Malassez</i> )
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FGFs	Fator de crescimento de fibroblastos ( <i>fibroblast growth factor</i> )
HA	Ácido hialurónico ( <i>hyaluronic acid</i> )
HE	Hematoxilina/eosina
HEMA	Hidroxietilmetacrilato
HERS	Bainha radicular epitelial de Hertwig ( <i>hertwig epithelial root sheath</i> )
HGF	Fator de crescimento do hepatócito ( <i>hepatocyte growth factor</i> )
ICAM-1	<i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
IGFs	Fatores de crescimento derivado de insulina ( <i>insulin growth factors</i> )
iPS	Células estaminais pluripotenciais induzidas ( <i>induced pluripotent stem cells</i> )
ISO	<i>International standards organization</i>
JAC	Junção amelocementária
m/v	Massa/Volume
MEV	Microscopia electrónica de varrimento
MMPs	Metaloproteinases da matriz
MSCs	Células estaminais mesenquimais ( <i>mesenchymal stem cells</i> )
MTA	Agregado de trióxido mineral ( <i>mineral trioxide aggregate</i> )
NGF	Fator de crescimento neuronal ( <i>neural growth factor</i> )
OPG	Osteopontina ( <i>osteopontin</i> )
PCA	Análise dos componentes principais
PCR	Reação de polimerase em cadeia ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
PDLSCs	Células estaminais do ligamento periodontal ( <i>periodontal ligament stem cells</i> )
PDT	Tempo de duplicação da cultura celular ( <i>doubling population time</i> )
PECs	Complexos polielectrolíticos ( <i>polyelectrolyte complexes</i> )

---

PGA	Ácido poli-glicólico ( <i>poly glycolic acid</i> )
PGLA	Ácido láctico poli-glicólico ( <i>poly lactic-co-glycolic acid</i> )
PLA	Ácido poli-láctico ( <i>poly lactic acid</i> )
PMN	Polimorfonuclear
PRP	Plasma enriquecido em plaquetas ( <i>platelet-rich plasma</i> )
RGD	Sequência de aminoácidos arginina-glicina-ácido aspártico ( <i>amino acid sequence Arg-Gly-Asp</i> )
RHAMM	Hyaluronan mediated motility receptor
Scaffold	Matriz
SCAPs	Células estaminais da papila apical ( <i>stem cells from apical papilla</i> )
SHED	Células estaminais de dentes decíduos recém esfoliados ( <i>stem cells from exfoliated deciduous teeth</i> )
Shh	Família de proteínas Hedgehog
STRO-1	Marcador positivo para células estaminais mesenquimais do estroma
TGFs	Fator transformador de crescimento
TLR4	<i>Toll like receptor</i>
TM	Tricrómio Masson
TNF	Fator de necrose tumoral ( <i>tumor necrotic factor</i> )
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
W	peso/ <i>weigh</i>
Wnts	Proteínas <i>Wingless</i>



## **VII. Índice**

---



Sumário .....	1
<b>I. Introdução</b> .....	3
1. Justificação do tema.....	5
1.2. Planificação e apresentação do trabalho.....	6
2. Problemática do ápice imaturo - algumas considerações .....	7
2.1. Apexificação.....	11
2.2 Revascularização/revitalização/ regeneração pulpar .....	15
3. Odontogénese.....	22
3.2 Alguns aspetos morfofuncionais da odontogénese .....	24
3.3 Desenvolvimento do complexo pulpo-dentinário .....	26
3.3.1 Zona Odontoblástica .....	26
3.3.2 Composição da matriz dentinária.....	28
3.3.3 Zona central da polpa.....	28
3.3.4 Composição da matriz extracelular da polpa .....	30
3.4 Desenvolvimento radicular.....	31
3.4.1 Papila Apical.....	33
3.4.2 Bainha radicular epitelial de Hertwig/restos epiteliais de Malassez .....	35
3.5 Cimento e Cementogénese.....	38
3.5.1 Variedades de Cimento .....	39
3.5.1.1 Cimento acelular de fibras extrínsecas (cimento primário).....	39
3.5.1.2 Cimento celular de fibras intrínsecas (cimento secundário).....	40
4.1 Matrizes.....	44
4.1.1 Coágulo sanguíneo .....	47
4.1.2 Ácido hialurónico .....	48
4.1.3 Quitosano .....	49
4.1.4 Pectina .....	50

4.2 Fatores morfogênicos e fatores de crescimento.....	50
4.3 Células estaminais .....	53
4.3.1 Características das células estaminais.....	54
4.3.1.1 Nichos de células estaminais.....	55
4.3.2 Células estaminais dentárias.....	57
4.3.2.1 Células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes (DPSCs) ...	57
4.3.2.2 Células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHEDs) .....	59
4.3.2.3 Células estaminais da papila apical (SCAPs) .....	60
4.3.2.4 Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) e do folículo dentário (DFSC) .....	61
4.4 Interação entre o sistema imunitário e a atividade das células estaminais no potencial regenerativo da polpa e dos tecidos periapicais.....	62
4.4.1 Lesões pulpares.....	62
4.4.2 Lesões periapicais .....	66
4.5 Transplantação celular versus homing celular.....	68
4.6 Regeneração pulpar e angiogênese .....	69
<b>II. Estudo experimental em modelo animal.....</b>	<b>71</b>
1. Objetivos.....	73
2. Materiais e Métodos.....	74
2.1. Matrizes.....	75
2.1.1. Síntese das matrizes.....	75
2.2. Medicação intracanal .....	77
2.2.1. Pasta de hidróxido de cálcio.....	77
2.2.2. Pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina) .....	78
2.2.2.1 Preparação da pasta triantibiótica.....	78
2.3. MTA.....	79
2.4. Modelo experimental .....	79
2.5. Manutenção e bem estar animal .....	79
2.6. Organização estrutural e cronológica do trabalho .....	80
2.7. Anestesia e sedação .....	81
2.8. Grupos experimentais .....	82
2.8.1 Aleatorização/ Randomização .....	83

2.9. Protocolo experimental.....	83
2.9.1. Indução de lesão periapical ( <b>1ª intervenção</b> ).....	84
2.9.2. Antissepsia e medicação intracanal (2ª <b>Intervenção</b> ).....	85
2.9.3. Realização da apexificação/revascularização ( <b>3ª Intervenção</b> ).....	88
2.9.3.1. <b>Grupo 1</b> – barreira apical com MTA	
2.9.3.2. <b>Grupos 2, 3 e 4</b> – revascularização pulpar.....	89
2.9.4. Recuperação da anestesia e sedação.....	90
2.9.5. Avaliação clínica e radiográfica da cavidade oral ( <b>4ª intervenção</b> ).....	90
2.9.6. Eutanásia dos animais ( <b>5ª Intervenção</b> ).....	91
2.10. Colheita da amostra.....	91
2.11. Processamento histológico.....	91
2.11.1. Técnica para material descalcificado.....	92
2.11.2. Imunocitoquímica.....	93
2.12. Métodos de análise.....	93
2.12.1. Análise radiográfica.....	93
2.12.2. Análise histológica.....	94
2.12.2.1. Análise histológica qualitativa.....	94
2.12.2.2. Análise histológica quantitativa.....	94
2.12.3. Análise estatística.....	97
2.13. Locais de execução do projeto.....	97
3. Resultados.....	98
3.1. Evolução do estado de saúde dos animais e avaliação clínica da cavidade oral.....	98
3.2. Análise macroscópica.....	99
3.3. Avaliação radiográfica e histológica.....	99
3.3.1. <b>Controlo positivo</b> (n=12).....	101
3.3.2. <b>Controlo negativo</b> (n=8).....	105
3.3.2.1. Controlo negativo pulpar (CNP).....	105
3.3.2.2. Controlo negativo periapical (CNPA).....	105
3.3.3. <b>Grupo 1</b> – Apexificação com MTA (n=18).....	110
3.3.4. <b>Grupos experimentais com matrizes</b> .....	117
3.3.4.1. <b>Grupo 2</b> – Coágulo sanguíneo (n=19).....	123
3.3.4.2. <b>Grupo 3</b> – Hialuronato de sódio/quitosano (N=19).....	134
3.3.4.3. <b>Grupo 4</b> – Pectina/quitosano (n=19).....	141

3.4. Análise estatística univariada.....	147
3.4.1. Avaliação radiológica .....	147
3.4.1.1. Resolução de lesões periapicais radiotransparentes .....	147
3.4.1.2. Aumento da espessura das paredes radiculares .....	148
3.4.2. Histomorfometria .....	149
3.4.2.1. Preenchimento canalar .....	149
3.4.2.2. Vascularização .....	150
3.4.2.3. Tecidos mineralizados presentes na cavidade canalar.....	151
3.4.2.4. Quantificação dos tecidos mineralizados e da matriz no canal radicular..	152
3.4.2.5. Cimento formado na parede externa da raiz.....	154
3.4.2.6. Tecidos mineralizados adjacentes ao MTA (Ponte).....	155
3.4.2.7. Encerramento apical .....	156
3.4.2.8. Reabsorção/reparação de tecidos mineralizados da parede radicular...	157
3.4.2.9. Infiltrado inflamatório .....	158
3.4.2.10. Espessura do ligamento periodontal .....	159
3.4.2.11. Extrusão do MTA.....	160
3.5. Análise Estatística Multivariada.....	161
4. Discussão .....	165
5. Considerações finais e perspectivas futuras.....	199
6. Conclusões.....	201
<b>III. Resumo .....</b>	<b>205</b>
<b>IV. Summary.....</b>	<b>213</b>
<b>V. Bibliografia .....</b>	<b>221</b>
<b>VI. Anexos.....</b>	<b>251</b>
<b>VII. Índice.....</b>	<b>263</b>