



Cláudia Raquel Aniceto Resende

**REGENERAÇÃO ÓSSEA ATRAVÉS DA ENGENHARIA
DE TECIDOS BASEADA EM CÉLULAS ESTAMINAIS
DENTÁRIAS – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Dissertação de Investigação do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária apresentado
à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

**ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA MÉDICO DENTÁRIO
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

Orientadora: Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes

Coorientador: Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes

Porto, Maio de 2018

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

- *Fernando Pessoa*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer aos meus orientadores, Professora Maria Helena Raposo Fernandes e Professor Pedro Gomes, pela paciência, esforço e dedicação que me transmitiram na elaboração desta tese.

Aos meus pais, por todo o acompanhamento neste longo percurso, por terem sempre acreditado em mim e nas minhas capacidades, apoiando-me sempre nas minhas decisões, e por todo o esforço que fizeram para que eu conseguisse obter um curso superior.

À minha família mais próxima e às minhas avós, por toda a fé que depositaram em mim, por toda a presença, por todas as palavras de encorajamento.

Aos meus avós, que, presencialmente, me incitaram a entrar nesta nova fase da minha vida e a lutar por ela, e que agora, apenas no coração, me vêm a terminar esta etapa.

Às minhas queridas amigas de infância Rita, Marina, Isa e Sara, que me acompanharam toda a vida, tanto nas fases boas como menos boas, e me levaram a dar sempre o máximo de mim, dando-me força para nunca desistir.

Às novas amigas que encontrei na faculdade Anas e Joana, e à minha binómia Christelle, que me apoiaram nas decisões que fui tomando, que alegraram as horas vagas e que fizeram com que a entrada neste percurso valesse ainda mais a pena.

Ao Pedro, que, mesmo entrando inesperadamente no fim deste percurso, tornou-se um pilar de força e ajuda, que sempre me apoia tanto nos momentos bons como maus, e que me transmite a confiança, esperança e fé quando elas me faltam.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ABREVIATURAS	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	IX
1. INTRODUÇÃO	- 9 -
2. MATERIAL E MÉTODOS	- 12 -
3. DESENVOLVIMENTO.....	- 14 -
3.1. Osso alveolar	- 15 -
3.2. Osteogénese	- 16 -
3.3. Abordagens de Tratamentos Regenerativos Atuais.....	- 17 -
3.3.1. Enxertos Ósseos	- 17 -
3.3.2. Regeneração Tecidual Guiada	- 18 -
3.3.3. Engenharia de Tecidos Baseada em Células	- 18 -
3.3.3.1. <i>Scaffolds</i>	- 20 -
3.3.3.2. Células Estaminais	- 21 -
3.3.3.3. Moléculas Sinalizadoras	- 28 -
3.3.3.4. Interação	- 32 -
4. CONCLUSÃO	- 34 -
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 36 -
6. ANEXOS	- 41 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Os três componentes essenciais que compõem a tríade da engenharia de tecidos baseada em células.	- 19 -
Fig. 2 - Diagrama da engenharia de tecido ósseo baseada em DPSC.	- 33 -

ABREVIATURAS

MSC – mesenchymal stem cells

CP – calcium phosphate

TCP – tricalcium phosphate

HA – hydroxyapatite

PLLA – poly (L-lactic acid)

PGA – polyglycolic acid

PLGA – polylactico-glycolic acid

DPSC – dental pulp stem cells

SHED – stem cells from human exfoliated teeth

PDLSC – peridontal ligament stem cells

SCAP – stem cells from apical papilla

DFPS – dental follicle precursor cells

TGF- β – transforming growth factor β

BMP – bone morphogenic proteins

PDGF – platelet-derived growth factor

IGF – insulin-like growth factor

FGF-2 – fibroblast growth factor 2

GDF – growth/differentiation factor

RESUMO

A perda de osso alveolar tem um forte impacto na saúde da população, estando associada a limitações estéticas e funcionais do complexo crânio-maxilo-facial. Desta forma, o aparecimento da engenharia de tecidos baseada em células surgiu como uma alternativa para a regeneração óssea, procurando ultrapassar as desvantagens dos tratamentos até agora utilizados. Esta abordagem foca-se no uso integrativo de três elementos: os *scaffolds*, as células e moléculas sinalizadoras.

Este trabalho tem como objetivo a descrição e análise crítica das abordagens de engenharia de tecidos baseada em células estaminais dos tecidos dentários para a regeneração do osso alveolar. Pretende-se igualmente abordar os problemas/limitações associados a estas técnicas, bem como as suas vantagens.

A pesquisa foi realizada na base dados PubMed, em que os filtros utilizados permitiram a seleção de artigos de revisão e casos clínicos, sem limite temporal, visando apenas a escolha de artigos em Inglês e Português em texto integral.

Até à data, três abordagens regenerativas são aplicadas. Inicialmente, surgiram os enxertos ósseos, com diversas origens. De seguida, surgiu a regeneração tecidular guiada, baseando-se na utilização de membranas que favorece o crescimento seletivo de populações celulares, visando a regeneração tecidular acelerada. Mais recentemente, e como uma abordagem mais promissora, temos a engenharia de tecidos baseada em células, mais especificamente em células estaminais da cavidade oral, que combina o uso de *scaffolds* que fornecem estrutura e substrato, com o uso das cinco diferentes populações de células estaminais dentárias, associado às moléculas sinalizadoras.

Apesar das inúmeras vantagens, conclui-se que são ainda necessários mais estudos no sentido de validar os resultados promissores obtidos e garantir a segurança das novas terapias para aplicação em humanos.

Palavras-chave: células estaminais orais, aumento da osteogénese, indutores da osteogénese, compromisso osteogénico, *scaffolds*, formação óssea.

ABSTRACT

The loss of alveolar bone has a huge impact on population health, being associated with aesthetic and functional limitations of the cranio-maxillofacial complex. Therefore, the appearance of cell-based tissue engineering emerged as an alternative for bone regeneration, seeking to overcome the disadvantages of the treatments used up to now. This approach focus on the integrated use of three key-elements: scaffolds, cells e signaling molecules.

This work aims to describe and critically analyze of tissue engineering approaches based on stem cells of dental tissues for the regeneration of alveolar bone. It also intended to address the problems/limitations associated with these techniques, as wells as their advantages.

The research was made in the PubMed database, in which the filters used allowed the selection of review articles and clinical cases, with no time limit, aiming only the choice of articles in English and Portuguese in full text.

To date, three regenerative approaches have been applied. Initially, the bone grafts appeared with diverse origins. Then, guided tissue regeneration arose, based on the use of membranes that favors the selective growth of cell populations, aiming at accelerated tissue regeneration. More recently, and as a more promising approach, emerged cell-based tissue engineering, more specifically using stem cells from oral cavity, which combines the use of scaffolds that provide structure and substrate, with the use of five different stem cells population associated with signaling molecules.

Despite the numerous advantages, it is concluded that further studies are still needed to validate the promising results obtained and ensure the safety of the new therapies for human application

Keywords: oral-derived stem cells, osteogenesis enhancement, osteogenic commitement, osteogenic inducers, scaffolds, bone formation.

1. INTRODUÇÃO

A perda de osso alveolar é uma enorme preocupação à escala global, nomeadamente após a extração dentária, bem como em todos os indivíduos com doença periodontal – condição inflamatória crónica a qual, se deixada sem tratar, resulta ultimamente numa dentição comprometida a nível estético e funcional, culminando com a perda prematura de estruturas dentárias.⁽¹⁾ De forma a superar a perda óssea e para aumentar o suporte estrutural, diversos substitutos regenerativos foram disponibilizados. Temos como exemplo os enxertos ósseos, dos quais se destacam os autoenxertos como *gold standard*, sendo também utilizados aloenxertos (dador geneticamente diferente mas da mesma espécie), bem como xenoenxertos (dador de outra espécie).^(2, 3) Contudo, várias desvantagens estão associadas a estas utilizações, podendo-se destacar a maior morbidade, risco de ativação da resposta imunológica, transmissão de doenças, disponibilidade limitada, bem como problemas éticos.^(4, 5)

O uso de membranas como barreira para a regeneração tecidual guiada é também um exemplo de uma abordagem regenerativa.⁽⁶⁾ Esta técnica baseia-se na exclusão celular para limitar o crescimento de células indesejáveis, favorecendo a proliferação de células ósseas.⁽⁵⁾ Contudo, o sucesso limitado desta metodologia atribui-se à insuficiente compatibilidade e reduzidas propriedades mecânicas dos materiais utilizados.⁽⁶⁾

Para ultrapassar as limitações dos métodos existentes para a regeneração óssea, as novas estratégias incluem a engenharia de tecidos baseada em células.⁽⁷⁾ Esta técnica engloba três elementos-chave: os *scaffolds*, as células, e as moléculas sinalizadoras.⁽⁸⁾ Os *scaffolds* fornecem estrutura e substrato para o crescimento e desenvolvimento do tecido.⁽⁹⁾ Devem também mimetizar a matriz extracelular do tecido ósseo, ser biodegradáveis, e permitir e/ou promover a adesão, migração e proliferação celular.⁽⁸⁾ Quanto às células, a cavidade oral provou ser um importante reservatório de células estaminais, com capacidade de diferenciação adequada à regeneração óssea, com a vantagem de algumas destas populações poderem ser recolhidas de forma minimamente invasiva.⁽¹⁰⁾ Vários tipos de células estaminais adultas têm sido identificadas dentro da cavidade oral, incluindo as células estaminais da polpa dentária, do folículo dentário, da papila apical, de dentes decíduos exfoliados e do ligamento periodontal.⁽¹¹⁾ Já as moléculas sinalizadoras são importantes para direcionar o crescimento e a diferenciação celulares, na estrutura do *scaffold*. Contudo, estes componentes não são apenas importantes de forma individual, sendo que a chave para o sucesso da engenharia de tecidos baseada em células assenta na dinâmica das suas interações.⁽⁹⁾

Este trabalho tem como objetivos a realização de uma descrição e análise crítica das abordagens de engenharia de tecidos baseada em células, com recurso a células estaminais dos tecidos dentários, para a regeneração do osso alveolar. Pretende-se igualmente abordar os problemas/limitações associados a estas técnicas, bem como as vantagens adicionais que podem representar, comparativamente às metodologias convencionais de regeneração tecidual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados PubMed, com a combinação de palavras-chave: *oral-derived stem cells*, *osteogenesis enhancement*, *osteogenic commitment*, *osteogenic inducers*, *scaffolds*, *bone formation*. Os filtros utilizados permitiram a seleção de artigos de revisão, investigação e casos clínicos, sem limite temporal, e de acesso a texto integral. Foram selecionados apenas os textos em Inglês e Português, juntamente com a presença das palavras-chave no título e no resumo, de acordo com a sua relevância para o tema em estudo.

3. DESENVOLVIMENTO

3.1. Osso alveolar

O osso é um tecido dinâmico sujeito a processos de modelação e remodelação, resultantes da interação dinâmica entre os osteoblastos, formadores de tecido ósseo, e os osteoclastos, responsáveis pela sua reabsorção.^(12, 13) A matriz extracelular bifásica contém um componente orgânico, constituído principalmente por fibras de colagénio tipo I, mas também outras proteínas não colagenosas, como a osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina, entre outras; e um componente inorgânico, constituído essencialmente por fosfato de cálcio semelhante a hidroxiapatite.^(2, 12, 14-16) Tanto a resistência mecânica do osso como a sua elasticidade são características cruciais para as funções de locomoção músculo-esquelética, e suporte e proteção dos órgãos internos.⁽²⁾ Este tecido é capaz de ajustar a sua arquitetura e massa de forma a suportar as forças físicas que sofre. Em adultos, a adaptação óssea ocorre ao longo da vida. As taxas de aposição óssea são elevadas em resposta às crescentes exigências mecânicas.⁽¹⁷⁾

O osso alveolar é constituído pelos processos alveolares da mandíbula e maxila, os quais fornecem suporte estrutural e manutenção para os dentes, fazendo parte do periodonto.^(3, 6) Desta forma, o periodonto é constituído pelo osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular.⁽³⁾ Este tipo de osso é perfurado por pequenos canais, os quais permitem a interposição vasos e nervos.⁽⁶⁾

Durante a transição da dentição primária para a dentição permanente, o osso alveolar sofre processos de remodelação. O osso alveolar associado à dentição primária é completamente reabsorvido com as raízes dos dentes decíduos, enquanto o novo osso alveolar é formado para suportar os dentes permanentes que erupcionam. A capacidade do osso se remodelar rapidamente também facilita a adaptação posicional dos dentes em resposta às forças funcionais e ao movimento fisiológico das estruturas dentárias, que ocorre durante o desenvolvimento da maxila e da mandíbula.⁽¹⁸⁾

3.2. Osteogénese

A formação óssea é um processo biológico lento, complexo e bem organizado^(12, 19), associado a alterações dos padrões de expressão genética e com progressão através de 3 estádios de desenvolvimento: (i) proliferação, (ii) produção e maturação da matriz extracelular, e (iii) mineralização da matriz.⁽¹²⁾

Ao longo do desenvolvimento embrionário, blocos de mesênquima condensados são modelados em elementos cartilagosos, ocorrendo este processo durante o primeiro trimestre de gravidez. De seguida, o modelo do tecido esquelético sofre um aumento significativo de tamanho e ossificação, mas com uma mudança relativamente pequena na forma básica da sua estrutura. A maxila e a mandíbula desenvolvem-se a partir do 1º arco braquial, sendo formados por ossificação intramembranosa. Contudo, os componentes celulares do esqueleto craniofacial são únicos e incluem ectomesênquima derivado da crista neural.⁽¹⁸⁾

Durante o curso da vida, traumas ou lesões, incluindo fraturas, podem ocorrer, e a reação natural do corpo humano consiste na iniciação de uma cascada de processos biológicos que levam à reparação de tecidos.⁽⁹⁾ Esta reparação pode ser considerada uma recapitulação dos eventos que ocorrem no curso normal do desenvolvimento embrionário.⁽²⁰⁾ Após a ocorrência destes eventos forma-se um hematoma, iniciando-se uma resposta inflamatória que envolve a interrupção da circulação sanguínea (e, assim favorecendo a hemóstase, criando também um ambiente de hipoxia, que atua como um estímulo regulador e quimiotático para muitas células, incluindo as células ósseas e os seus precursores – como as células mesenquimais), e recrutamento de macrófagos e neutrófilos. Depois de formado o hematoma, as células precursoras agregam-se e formam novos vasos sanguíneos, ocorrendo também a migração de fibroblastos e outras células de suporte. O hematoma é então substituído por tecido de granulação e, concomitantemente, os osteoclastos degradam o osso necrótico. As células progenitoras originárias do perióstio diferenciam-se em osteoblastos que estimulam o crescimento aposicional. O calo é subsequentemente invadido por células mesenquimais precursoras, as quais se diferenciam em condrócitos que sintetizam uma matriz extracelular cartilaginosa formando, posteriormente, tecido calcificado, resultando em osso – num modelo de ossificação endocondral.^(21, 22)

3.3. Abordagens de Tratamentos Regenerativos Atuais

Os tratamentos regenerativos atuais incluem o recurso a enxertos ósseos, a regeneração tecidual guiada e, mais recentemente, a engenharia de tecidos baseada em células. O principal objetivo dos tratamentos regenerativos assenta no crescimento/aumento ósseo, com o objetivo de preservar e/ou recuperar o tecido ósseo perdido. Este aumento depende de três mecanismos essenciais: a osteogénese, a osteoindução, e a osteocondução. A osteogénese envolve a transplantação de células osteocompetentes para o local recetor, contribuindo de forma direta para a neoformação óssea. A osteoindução envolve a quimiotaxia de células precursoras para o local recetor, favorecendo a sua estimulação e diferenciação para o aumento da formação óssea. A osteocondução assenta na capacidade do material implantado fornecer um suporte para a formação de novo osso.⁽⁵⁾ De seguida serão apresentadas, mais pormenorizadamente, as várias abordagens de tratamentos regenerativos.

3.3.1. Enxertos Ósseos

O osso, tecido altamente vascularizado, único na capacidade de autorregeneração sem formação de cicatriz fibrosa, é o segundo tecido mais comumente transplantado no mundo. Apesar deste potencial de cicatrização natural, nem sempre é possível a regeneração autóloga de grandes defeitos ósseos. Consequentemente é necessário o recurso à implantação de enxertos ósseos, como formar de promover o processo regenerativo.⁽²¹⁾ São conhecidos vários tipos de enxertos: os autoenxertos, que representam um tecido transplantado de um local para outro no mesmo indivíduo; os aloenxertos, um transplante entre indivíduos da mesma espécie mas geneticamente diferentes; e os xenoenxertos, materiais transplantados entre espécies diferentes.^(3, 6)

Os autoenxertos - enxertos ósseos autógenos - representam o *gold standard* clínico devido à sua elevada imunocompatibilidade e às suas propriedades naturais de osteoindução, osteocondução e osteogénese, rapidamente se associando ao tecido remanescente, fornecendo uma população pré-estabelecida de células viáveis e fatores de crescimento.^(3, 5, 21, 23) Contudo, existem várias razões para a necessidade crítica de enxertos alternativos, entre as quais se destacam a disponibilidade limitada de tecido autólogo caso sejam necessárias maiores quantidades; a morbidade do local dador devido aos procedimentos de colheita; e potenciais infeções perioperatórias nos locais intervencionados.^(2-5, 9, 15, 21, 23, 24)

Também se encontram disponíveis os aloenxertos que, tal como os xenoenxertos, apesar da falta do potencial osteogénico, podem ser preparados para terem propriedades osteocondutivas e osteoindutivas. As propriedades mecânicas dos aloenxertos são alteradas substancialmente durante o processamento extensivo do tecido, que envolve descelularização, esterilização e preservação para uso clínico.⁽³⁾ As principais vantagens relativamente aos autoenxertos são a disponibilidade imediata nos bancos ósseos bem como a ausência da morbidade do local dador.^(5, 23) Contudo, vários problemas estão associados ao seu uso, incluindo o risco de rejeição imunológica, transmissão de doenças, a incorporação é lenta, problemas éticos/religiosos, bem como uma elevada taxa de não-união aos tecidos do hospedeiro.^(4, 5, 9, 15, 21, 23, 25) Os xenoenxertos podem também ser uma alternativa, com muitos dos produtos derivados do coral, fontes suínas e bovinas.⁽³⁾ No entanto, existem também riscos associados, idênticos aos descritos para os aloenxertos, tais como a transmissão de doenças e a rejeição.⁽²¹⁾

Foram assim desenvolvidos materiais de origem sintética cujas principais características serão descritas subseqüentemente, no âmbito da sua aplicação nas estratégias de Engenharia de Tecidos.

3.3.2. Regeneração Tecidual Guiada

A regeneração tecidual guiada é uma técnica útil para a regeneração dos tecidos periodontais, nos quais se incluem o osso alveolar. Esta alternativa baseia-se em processos de exclusão e proliferação celular. Assim são utilizadas membranas, implantados no espaço periodontal, que funcionam como barreiras, prevenindo a migração das células epiteliais e das células do tecido conjuntivo epitelial (exclusão celular), guiando, ao mesmo tempo, a colonização do local por células progenitoras do ligamento periodontal e do osso alveolar (proliferação celular).^(5, 6, 26) O sucesso limitado desta abordagem tem sido atribuído à biocompatibilidade insuficiente e às fracas propriedades mecânicas dos materiais usados como membrana.⁽⁶⁾

3.3.3. Engenharia de Tecidos Baseada em Células

A engenharia de tecidos baseada em células tem emergido como uma abordagem alternativa para colmatar as lacunas das opções terapêuticas convencionais.⁽⁶⁾ Trata-se de um campo multi e interdisciplinar em emergência, o qual aplica princípios da engenharia, biologia e ciências

clínicas.^(6, 27, 28) Esta tem como objetivo investigar e transferir para aplicação clínica a regeneração de tecidos usando vias de sinalização biológicas e componentes do organismo.⁽²⁹⁾ De facto, a regeneração de tecidos existe naturalmente, devido à presença de células estaminais com capacidade de autorregeneração e diferenciação em uma ou mais linhagens. Contudo, este potencial regenerativo diminui com a idade e a regeneração não é suficiente para reparar os danos existentes.⁽³⁰⁾ A engenharia de tecidos ósseos tem surgido como um dos principais campos na engenharia de tecidos baseada em células.⁽⁹⁾

Para se atingir o sucesso clínico é necessária a interligação adequada dos seguintes fatores essenciais, também designados de tríade: (i) *scaffold*, uma estrutura tridimensional inspirada na arquitetura nativa do osso, (ii) células progenitoras com a capacidade de se diferenciarem no fenótipo formador de tecido ósseo maduro e (iii) moléculas sinalizadoras apropriadas para modular a diferenciação e neogénese tecidual.^(4, 6-9, 15, 22, 27, 31, 32) De realçar que estes componentes não são apenas importantes individualmente, sendo a compreensão das suas interações a chave para o sucesso.⁽⁹⁾

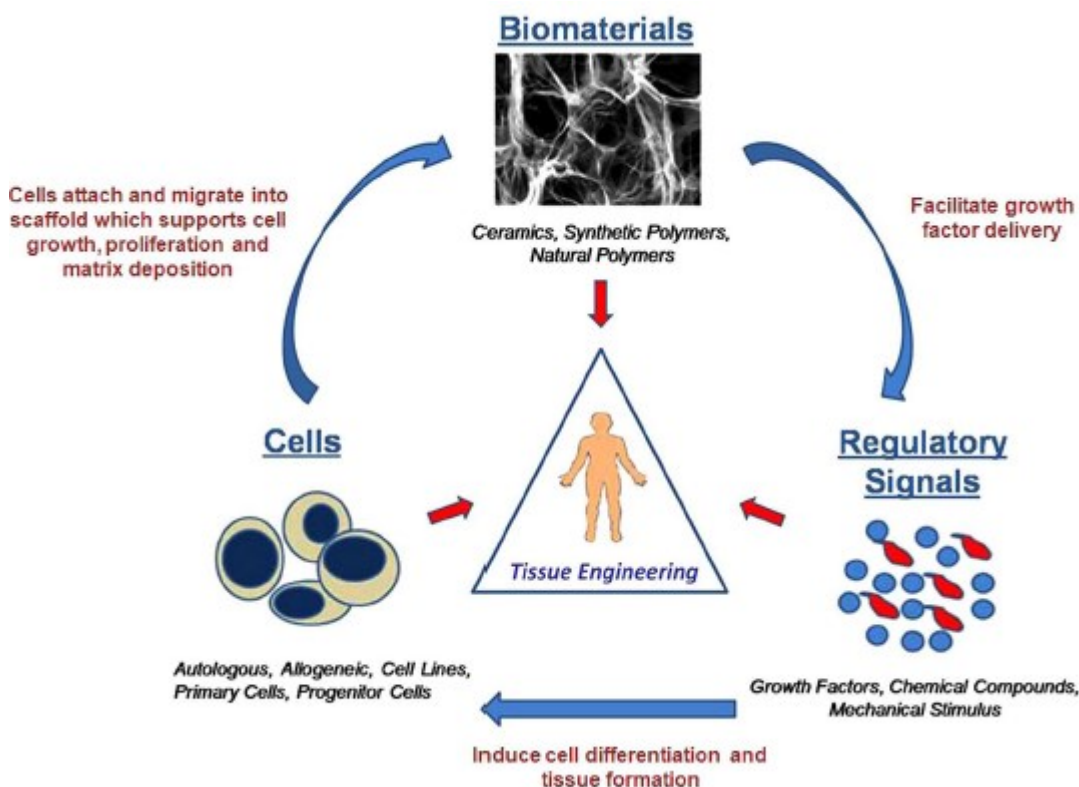


Fig. 1 - Os três componentes essenciais que compõem a tríade da engenharia de tecidos baseada em células.

(Fonte: Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European cells & materials*. 2013;26:120-32.)

Esta estratégia ultrapassa as limitações associadas com os procedimentos regenerativos convencionais uma vez que permite a colocação direta dos fatores de crescimento e células progenitoras no local pretendido, eliminando a fase de espera de recrutamento de células.⁽⁶⁾

De seguida serão apresentados, mais pormenorizadamente, os componentes da tríade da engenharia de tecidos baseada em células.

3.3.3.1. Scaffolds

A estrutura/arquitetura do *scaffold*, a qual simula a matriz extracelular num modelo tridimensional, é um importante determinante das funções celulares, bem como da extensão da migração e diferenciação; determina também o crescimento ósseo, vascularização, e transferência de massa entre as células e o ambiente.^(2, 8, 10, 16, 21) Assim, de um ponto de vista anatómico, um *scaffold* ideal para a regeneração óssea deve ser: injetável, de forma a adaptar-se aos defeitos irregulares produzidos após a extração dentária; deve sofrer um aumento de rigidez mecânica, de maneira a mimetizar as propriedades mecânicas do osso e, assim, sustentar as cargas fisiológicas impostas pela mastigação; deve sofrer degradação a uma taxa complementar à da formação óssea, e com o mínimo de deformação;^(14, 24, 30, 33) permitir e/ou promover a adesão, migração e proliferação celulares;^(8, 28) ser fácil de esterilizar, sem perder a integridade biomecânica e estrutural;⁽¹⁴⁾ deve ser biocompatível, tendo capacidade de suportar o crescimento celular e a regeneração de tecido *in vivo*, sem provocar uma resposta inflamatória ou imunológica, que pode resultar em rejeição;^(6, 9, 30) deve ser estável e resistir às cargas biomecânicas *in vivo*;⁽³⁴⁾ não ser tóxico;⁽³⁵⁾ possuir bioatividade, permitindo a interação celular com a superfície do material;⁽³⁾ possuir uma porosidade aumentada e heterogênea, com redes de poros interligados, de forma a fornecer espaços adequados para o crescimento celular, distribuição de nutrientes, promoção da vascularização e remoção dos produtos do metabolismo.^(2, 8, 9, 14, 19, 34) O *scaffold* deve, portanto, ser capaz de manter, induzir e restaurar a função biológica original.⁽³⁶⁾

Existem, assim, três grandes grupos de materiais que têm sido utilizados como *scaffolds* na engenharia do tecido ósseo: (i) cerâmicos, (ii) polímeros sintéticos, e (iii) polímeros naturais.⁽⁹⁾

Os materiais cerâmicos são componentes não metálicos com uma estrutura cristalina e, tipicamente, possuem uma elevada rigidez. Os mais usados são os materiais baseados em fosfato

de cálcio (FC), fosfato tricálcico (TCP) e hidroxiapatite (HA), sendo estes materiais biocompatíveis (devido às suas semelhanças estruturais com a fase mineral do osso, mimetizando a maioria da sua componente inorgânica) e osteocondutivos. Mesmo assim, os cerâmicos são frágeis e têm, geralmente, uma taxa de degradação baixa.^(1, 8, 9, 15)

Os polímeros sintéticos, degradáveis, têm como principal atrativo o facto de permitirem a fabricação de *scaffolds* com características adaptadas para coincidir com a formação do novo tecido ósseo. Os exemplos mais característicos são o PLLA, PGA e PLGA. No entanto, uma desvantagem associada com a utilização de muitos polímeros sintéticos é a libertação de produtos ácidos durante a sua degradação, o que pode alterar o pH do tecido envolvente, podendo causar reações adversas e inflamatórias.⁽⁹⁾ Já os polímeros naturais mais usados incluem o colagénio, glicosaminoglicanos, quitosano, ácido hialurónico, fibrina e elastina isoladas diretamente da matriz extracelular. Os polímeros naturais apresentam uma superfície mais nativa que a dos polímeros sintéticos. Dessa forma, são biocompatíveis, possuem uma excelente afinidade celular e, tipicamente, são degradáveis com produtos de degradação não tóxicos. As limitações incluem as suas reduzidas propriedades mecânicas, as quais se mostram inadequadas para locais sujeitos a elevadas tensões.^(4, 8, 9) Mais recentemente, os hidrogéis oferecem a possibilidade de desenvolver *scaffolds* com numerosas propriedades importantes, incluindo uma elevada biocompatibilidade bem como características semelhantes às do osso nativo, em termos de composição química, com uma melhoria das propriedades mecânicas.⁽³⁵⁾

Contudo, ainda se impõem vários desafios. Continua a ser difícil a fabricação de arquiteturas internas que sejam permissivas para as células. Assim, uma estrutura porosa insuficiente pode levar a uma agregação celular na superfície, impedindo a migração de células para o interior do *scaffold*. Para além disso, muitos *scaffolds* possuem propriedades mecânicas subótimas, o que pode limitar todo o processo regenerativo.⁽⁹⁾

3.3.3.2. Células Estaminais

As células estaminais são células clonogénicas, imaturas e indiferenciadas, que possuem a capacidade de autorrenovação, isto é, de se dividirem indefinidamente, e de diferenciação multi-linhagem, dependendo dos sinais derivados do microambiente.^(6, 30, 37)

As células estaminais podem ser divididas em três categorias: (i) as células estaminais embrionárias, células pluripotentes, derivadas do embrião em fase precoce, que possuem a capacidade de proliferar extensivamente e de se diferenciarem em células com características das três camadas germinativas (i.e., endoderme, mesoderme e ectoderme); (ii) as células estaminais adultas, somáticas ou pós-natais, as quais representam células multipotentes com capacidade de autorrenovação, que residem dentro dos tecidos e órgãos mais diferenciados, suportando a manutenção e regeneração do tecido parental; e, (iii) mais recentemente, através de manipulação genética de células somáticas, as células estaminais pluripotentes induzidas que, tal como as células estaminais embrionárias, são células pluripotentes, podendo também originar células das três camadas germinativas.^(6, 30, 38)

Apesar do potencial desenvolvimento do uso de embriões para a obtenção de células estaminais embrionárias, verificaram-se sérios problemas éticos, o que fez motivar esforços para reprogramar geneticamente células somáticas de volta ao seu estado pluripotente. Contudo, mesmo a sua utilização não está isenta de problemas, uma vez que as manipulações genéticas podem alterar as características de crescimento e desenvolvimento, o que dificulta a previsibilidade do comportamento destas células. Desta forma, as células estaminais adultas, no âmbito deste trabalho, as de origem mesenquimal (*mesenchymal stem cells* – MSCs) – embora possuam um potencial de diferenciação mais restrito quando comparado com as células estaminais embrionárias, são mais facilmente acessíveis, imunocompatíveis e não estão associadas a problemas éticos, fatores que motivaram o seu uso mais generalizado.^(6, 18, 39)

Assim, as MSC, uma população heterogênea de células estaminais multipotentes, têm vindo a ser isoladas de uma variedade tanto de tecidos fetais como adultos, sendo consideradas uma fonte ideal para a terapia baseada em células devido às suas propriedades únicas, entre as quais se destacam a multipotência e funções imunomodulatórias.^(19, 29, 40, 41) Atualmente, todas as populações celulares que apresentam as seguintes características, independentemente da fonte tecidual, são referidas como MSC: (i) aderência ao plástico; (ii) morfologia tipo fibroblástica em cultura; (iii) capacidade de autorrenovação; (iv) diferenciação em células da linhagem mesenquimal, tais como osteoblastos/osteócitos, condrócitos e adipócitos; (v) em condições apropriadas, apresentam também a capacidade de se diferenciarem em células das linhagens da ectoderme e endoderme, tais como neurónios e hepatócitos, respetivamente; (vi) fenotipicamente expressam CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146 e antigénios de superfície STRO-1; (vii) não expressam CD45 (marcador de leucócitos), CD34 (marcador celular endotelial

e de progenitores hematopoiéticos primitivos), CD14 e CD11 (marcadores de monócitos e macrófagos), CD79 e CD19 (marcadores de células B), e HLA classe II.^(30,39)

Um dos maiores problemas do uso terapêutico de células estaminais adultas continua a ser a identificação de locais acessíveis no corpo humano onde se possa efetuar uma colheita de uma quantidade adequada para utilização clínica.⁽⁴²⁾ As MSC foram primeiramente isoladas e caracterizadas na medula óssea, constituindo uma fonte muito comum.⁽³⁰⁾ Contudo, devido às limitações processuais no seu isolamento, as quais incluem dor, morbidade e baixo número de células colhidas (uma vez que há reduções significativas relacionadas com a idade), há uma necessidade crescente de fontes alternativas. Os tecidos dentários têm sido considerados uma fonte potencial para o isolamento de populações tipo MSC, uma vez que são considerados tecidos altamente especializados, que não sofrem contínua remodelação.⁽²⁹⁾ As MSC de origem dentária podem ser usadas não só para a regeneração de estruturas dentárias, mas também de estruturas não dentárias, como osso e tecido nervoso.^(27, 43) As grandes vantagens do seu uso são: a facilidade e rapidez de obtenção a partir de desperdício biológico produzido durante os tratamentos de rotina (como extração de terceiros molares inclusos e de dentes decíduos, ou por razões ortodônticas),^(11, 43-45) o facto dos tecidos dentários concluírem os processos odontogénico e de erupção dentária num estadio mais tardio e, portanto, com uma elevada quantidade de células estaminais,⁽⁴⁶⁾ a existência de imunocompatibilidade nos transplantes autólogos⁽¹¹⁾, e a capacidade de se diferenciarem em odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos e outras células encontradas nos tecidos dentários.⁽¹⁰⁾ Para além de tudo isto, podem ser criopreservadas em segurança.⁽³⁵⁾

Várias células estaminais adultas têm sido identificadas dentro da cavidade oral, incluindo as células estaminais da polpa dentária (DPSC), as células estaminais de dentes exfoliados (SHED), as células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC), as células estaminais da papila apical (SCAP), e as células estaminais precursoras do folículo dentário (DFPC).^(8, 11, 41, 43, 45, 47) Estas podem ser divididas em duas categorias: as células estaminais dentárias, que engloba as DPSC, as SHED e as SCAP; e as células estaminais orais, que inclui as DFPC e as PDLSC.⁽¹¹⁾ Todas elas possuem potencial neurogénico devido à sua origem comum a partir da crista neural embrionária.^(11, 43, 45, 47) Apesar de possuírem características mesenquimais com morfologia fibroblástica, há também divergência nas suas propriedades como, por exemplo, diferenças na capacidade proliferativa e de plasticidade (isto é, conseguem diferenciar-se em tipos celulares que são, normalmente, derivados de outras camadas germinativas), no potencial de diferenciação multi-linhagem, na expressão de recetores de superfície celulares e outros marcadores.^(11, 45, 48) Existem critérios aplicados para a identificação e isolamento de MSC multipotentes, enumerados

anteriormente, sendo também aplicados às MSC orais.⁽¹¹⁾ Comparativamente a outras MSC, as MSC orais são, geralmente, mais plásticas e com maior potencial de diferenciação multi-linhagem, além da sua menor tendência para a senescência em culturas prolongadas.^(11, 45) Ainda mais surpreendente é a expressão de marcadores de pluripotência, tais como OCT4, MYC e SOX2 por algumas MSC dentárias e orais, os quais não são normalmente expressos nos outros tipos de MSC adultas.⁽⁴⁵⁾

Apesar destas características em comum, cada tipo celular possui também especificidades próprias, as quais serão apresentadas de seguida.

✓ **Células estaminais da polpa dentária (DPSC):**

A polpa dentária, localizada na parte mais interna do dente, caracteriza-se por ser uma estrutura de tecido conjuntivo mole, com estroma, sendo altamente vascularizada, com fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos; tem como funções providenciar nutrientes e estímulos sensoriais para a dentina, o que mantém a sua vitalidade biológica e fisiológica.^(24, 34, 49, 50)

O potencial regenerativo do complexo dentina/polpa, observado pela formação de dentina reparativa seguidamente a uma eventual lesão traumática ou cariosa, sugere a presença de progenitores dentinogénicos que são responsáveis por essa reparação - DPSC.^(24, 29, 39, 48, 51) Existem diferentes densidades celulares das colónias destas células quando em cultura, sugerindo que cada clone celular deve ter uma taxa de crescimento diferenciada; para além disso, diferentes morfologias e tamanhos celulares podem também ser observados dentro da mesma colónia. Daqui se conclui que se trata de uma população heterogénea.^(27, 47) Para além disso, estas células caracterizam-se por um rápido tempo de duplicação de população e possuem propriedades imunossupressoras.⁽⁴¹⁾

A diferenciação das DPSC numa linhagem celular específica é maioritariamente determinada pelos componentes do microambiente local, como, por exemplo, fatores de crescimento, etc.^(4, 27, 42) Contudo, esta população apresenta uma tendência intrínseca para se diferenciar na linhagem osteoblástica.⁽¹⁰⁾ Assim, esta população celular responde a indutores de diferenciação osteogénica e odontogénica, e expressam marcadores

osteogénicos, tais como a sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina, e colagénio tipo I e II.^(29, 50-52)

A maioria das DPSC, em cultura, forma uma estrutura tridimensional trabecular tipo osso, ao passo que uma pequena percentagem expressa marcadores endoteliais específicos. A transplantação destas estruturas osteoblásticas/endoteliais para ratos imunocomprometidos levaram à sua integração biológica e à formação de tecido mineralizado, com características idênticas à do tecido ósseo, com nutrição vascular.^(23, 29, 48) Daqui se conclui que estas células podem diferenciar-se em osteoblastos que secretam abundante matriz extracelular, e construir um tecido idêntico ao osso.^(4, 27, 48)

A principal fonte de DPSC corresponde aos terceiros molares, extraídos seja por motivos ortodônticos ou pelo facto de estarem inclusos, por trauma ou doença periodontal.^(4, 10, 52-54) As principais vantagens do uso dos terceiros molares como fonte de DPSC são: (i) início da organogénese por volta dos 6 anos de idade, ou seja, permitem o isolamento de uma população celular jovem, em termos de desenvolvimento; (ii) são dentes que são extraídos durante os tratamentos de rotina, e (iii) desta forma, não existe nenhum tipo de controvérsia ética;⁽⁵⁵⁾ (iv) as células isoladas podem ser criopreservadas a longo prazo e recuperadas, mantendo o seu potencial de diferenciação multipotente, tornando-as uma fonte potencialmente adequada e confiável;^(4, 10, 34, 38, 42, 48) (v) são células isoladas com morbidade mínima do tecido;⁽²⁴⁾ e (vi) de acesso cirúrgico fácil.⁽⁴²⁾

✓ **Células estaminais de dentes exfoliados (SHED):**

As SHED constituem uma população celular que existe na polpa viva remanescente de dentes decíduos exfoliados, representando uma população mais imatura.^(19, 27, 29, 38, 40, 51)

Esta população celular exhibe as propriedades típicas das células estaminais, incluindo a clonogenicidade, capacidade de formação de colónias com taxas de proliferação elevadas, multipotência para se diferenciarem em células tipo odontoblastos, adipócitos, e neurónios, com uma tendência acentuada para a osteogénese.^(10, 27, 29, 35, 40, 41, 52) Comparativamente às DPSC, as SHED crescem mais rapidamente e possuem um maior número de duplicações populacionais.^(10, 29, 48, 52, 56) Para além disso, estas expressam capacidade regenerativa de formar tecidos *in vivo*, formando complexos tipo dentina/polpa; e osso/medula óssea quando transplantadas para ratos imunocomprometidos, devido à sua

capacidade osteoindutiva. Os clones das SHED induzem a formação óssea através da organização de uma matriz osteoindutiva responsável pelo recrutamento de células osteogénicas.^(27, 29, 39, 40, 47) Assim, apesar das SHED não se diferenciarem diretamente em odontoblastos, induzem a neoformação óssea através do recrutamento de células osteogénicas do hospedeiro, *in vivo*, podendo pensar-se que estas células possam estar envolvidas na indução da formação óssea durante a erupção dos dentes permanentes.⁽⁴¹⁾

A utilização dos dentes decíduos exfoliados para recolha destas células está associada a diversas vantagens, entre as quais a mínima invasividade e fonte facilmente acessível (quando comparada com a medula óssea, por exemplo), além de que não acarreta nenhum problema ético ou legal.^(19, 40, 56) Contudo, como desvantagens, podemos enumerar o facto de ser impraticável o isolamento das SHED imediatamente após a exfoliação dos dentes, uma vez que não possível precisar o momento em que este evento ocorre,⁽⁴⁰⁾ a quantidade de polpa num dente decíduo exfoliado é limitada, e a produção proporcionalmente mais pequenas das SHED, que necessitará de uma expansão em cultura a longo prazo, acarretará mais custos e riscos biológicos.⁽³⁶⁾

✓ **Células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC):**

O ligamento periodontal, um tecido conjuntivo embebido entre o cemento e osso alveolar, não tem apenas um importante papel no suporte do dente, como também providencia a sua nutrição, regula a homeostasia periodontal, e em comum com a polpa dentária, possui um certo grau de capacidade regenerativa após um trauma leve; para além disso, contém potentes células progenitoras, que têm sido isoladas como fonte celular ideal para a reparação e regeneração dos tecidos periodontais.^(10, 41, 48, 51, 52, 57)

As PDLSC são derivadas de uma população de células perivasculares.⁽⁵⁸⁾ Elas constituem uma população heterogénea de células estaminais que possuem capacidade de se diferenciarem em várias linhagens de células mesenquimais como cementoblastos, osteoblastos, condrócitos, fibroblastos e adipócitos, sob condições de cultura definidas.^(27, 29, 35, 41, 44, 47, 58) Esta população celular parece ser mais proliferativa, apresentando uma taxa de crescimento celular mais rápida e uma maior capacidade clonogénica, comparativamente às células estaminais derivadas da medula óssea.^(10, 29, 39) PDLSC transplantadas para defeitos periodontais em ratos imunocomprometidos, demonstraram

estar envolvidas na ligação do ligamento periodontal à superfície radicular através da formação de uma estrutura semelhante ao ligamento periodontal nativo, além de participarem na regeneração do osso alveolar perdido.^(29, 38, 39, 47, 51)

As PDLSC são obtidas através da raspagem do terço médio da raiz de dentes extraídos.⁽¹⁰⁾

Uma das vantagens do uso das PDLSC reside no facto do seu potencial regenerativo tecidual se manter mesmo depois de serem recuperadas de tecido humano congelado, sugerindo a possibilidade da sua criopreservação para uso futuro.^(10, 48)

Um dos maiores problemas no isolamento desta população celular está relacionado com a condição periodontal, isto é, se o periodonto se encontra lesado, este contém relativamente poucas células estaminais, e a obtenção de um número suficiente de células estaminais para transplantação requer um isolamento e expansão *in vitro*.⁽⁵⁷⁾

✓ **Células estaminais da papila apical (SCAP):**

As SCAP podem ser obtidas a partir da papila apical, um tecido mole que se encontra em torno do ápice radicular dos dentes permanentes em desenvolvimento, substanciando que esta população celular está associada a um estadio precoce de diferenciação.^(10, 27, 29, 38, 47, 52) Devido a este facto, estas células exibem uma maior plasticidade que as restantes populações consideradas.⁽⁴¹⁾

Estas células têm capacidade de se diferenciarem em células das linhagens osteogénica, odontogénica, adipogénica e neurogénica.^(29, 38, 41, 47, 52) Relativamente às DPSC, pensa-se que as SCAP apresentam uma taxa de proliferação mais elevada.^(10, 27)

As SCAP são, provavelmente, responsáveis pela formação dos odontoblastos primários, responsáveis pela formação de dentina radicular; ao passo que as DPSC parecem ser a fonte dos odontoblastos de substituição, responsáveis pela produção de dentina reparativa.^(10, 27, 29)

A colheita destas células é efetuada a partir do tecido da papila apical e podem ser facilmente removido dos dentes extraídos com as raízes em desenvolvimento, sendo mais comum nas extrações dos terceiros molares.⁽¹⁰⁾

✓ **Células estaminais precursoras do folículo dentário (DFPC):**

As DFPC existem no folículo dentário, uma estrutura ectomesenquimatosa de tecido conjuntivo mole que circunda o órgão de esmalte e a papila dentária do germen dentário em desenvolvimento, antes da sua erupção, regulando a osteoclastogênese e a osteogênese necessárias para a erupção dentária.^(10, 27, 29, 41, 43, 46, 47) O folículo dentário pode ser considerado um tecido multipotente devido à sua capacidade de gerar cimento, osso e ligamento periodontal.^(27, 48)

Tal como as SCAP, as DFPC representam células de um tecido em desenvolvimento e, portanto, possuem maior plasticidade em relação às outras células estaminais de origem dentária.⁽²⁷⁾ Estas células demonstraram capacidade de diferenciação osteogénica, odontogénica e cementogénica, adipogénica e neurogénica *in vitro*.^(10, 29, 41) Para além disto, estas células também se caracterizam pela sua elevada taxa de proliferação.^(41, 43)

A partir do momento que se verificou a potencial utilização clínica das MSC derivadas dos tecidos orais e dentários, as quais são aplicadas em vários campos da medicina regenerativa, a preservação das mesmas estabeleceu o conceito de “Banco Dentário”. Assim os tecidos biológicos contendo células estaminais, tais como a polpa dentária, ligamento periodontal, papila apical e folículo dentário, obtidos do paciente, podem ser preservados por vários anos retendo o seu potencial regenerativo, e permitindo a sua utilização em terapias regenerativas futuras. O armazenamento destas células estaminais pode ser realizado por criopreservação, considerada a metodologia mais comum, como por congelamento magnético.⁽⁵²⁾

3.3.3.3. Moléculas Sinalizadoras

O comportamento celular é fortemente influenciado por fatores biológicos, biofísicos e bioquímicos da matriz extracelular. Consequentemente, o uso de moléculas sinalizadoras, tais como fatores de crescimento e citocinas, constitui o terceiro componente da tríade da engenharia de tecidos baseada em células. Estas podem funcionar localmente ou sistemicamente, alterando padrões de expressão genética em células-alvo. Para além disso, também podem estar envolvidas na sub- ou sobre-regulação da síntese de outras moléculas sinalizadoras.⁽⁹⁾

No âmbito da aplicação para a regeneração óssea têm sido isoladas e validadas diversas moléculas sinalizadoras, as quais podem ser libertadas de forma isolada ou em associação.⁽³⁾ Uma das formas de utilizarmos associações baseia-se no uso de concentrados de plaquetas, cuja utilização parece resultar num favorecimento e aceleração da cicatrização/regeneração pós-cirúrgica, fornecendo suporte para a regeneração tecidual.⁽³⁰⁾ A libertação dos fatores de crescimento é de crucial importância para mediar o ambiente no qual o *scaffold* se encontra inserido, bem como a subsequente resposta celular. Os fatores de crescimento são, globalmente, polipéptidos solúveis que se ligam aos recetores da membrana celular e influenciam a função celular. São exemplo a inclusão de fatores osteoindutivos/conduativos (e.g., BMPs, TGF- β , IGF, FGF-2, PDGF) que guiam a diferenciação celular e o processo de formação de tecido nas terapias regenerativas ósseas. Da mesma forma, a vascularização é vital para a sustentabilidade dos tecidos recentemente formados, e necessita da inclusão de fatores de crescimento com propriedades angiogénicas (e.g., VEGF, PDGF, FGF-2 e TGF- β). Um grande desafio na libertação de fatores de crescimento envolve a necessidade de um perfil cinético de libertação que mimetize as condições presentes durante a reparação tecidual natural. A entrega espaço-temporal simultânea ou sequencial de múltiplos fatores de crescimento pode ser alcançada usando *scaffolds*, baseados numa janela temporal terapêutica, durante a qual a libertação de fatores de crescimento é ótima para a regeneração tecidual, e pode incluir a combinação de fatores envolvidos na formação da angiogénese e do tecido ósseo.⁽³⁾ Seguidamente será discutida a utilização de alguns fatores relevantes no processo de regeneração do tecido ósseo.

✓ TGF- β

As moléculas da superfamília TGF a regulam a proliferação e diferenciação celular, contribuindo para a diferenciação osteoblástica, marcada pela secreção de matriz óssea com glicoproteínas colagenosas e não colagenosas.⁽⁵⁹⁾

O TGF- β é um importante regulador do processo de remodelação no osso, que equilibra a taxa de formação/reabsorção óssea.⁽¹²⁾ É libertado pelas plaquetas na fase inflamatória inicial da formação do calo ósseo, durante o processo reparativo.⁽²²⁾ Estes biomoduladores também podem ser expressos e secretados pelos condrócitos, osteoblastos, macrófagos e outras células inflamatórias armazenadas na matriz óssea. Algumas moléculas desta família apresentam também uma atividade quimiotática para as MSC derivadas da medula óssea.⁽¹²⁾ Para além disso, promovem a sua proliferação, bem como dos pré-osteoblastos,

condrócitos e osteoblastos, e induzem a produção de colagénio, osteopontina e osteonectina, preteoglicanos, fosfatase alcalina, e outras proteínas extracelulares.^(12, 22) Estes mediadores podem promover a sinalização de BMPs na indução da osteogénese, inibindo a ativação de osteoclastos, ao promover a sua apoptose.⁽²²⁾

✓ **BMPs**

As BMPs são responsáveis pela formação óssea durante a embriogénese, e pela remodelação e regeneração óssea no esqueleto adulto.⁽⁶⁰⁾ São membros da superfamília TGF e têm fortes propriedades osteoindutivas, especialmente a BMP-2, -4, -6, -7, e -9.^(3, 12, 55, 60)

As BMP-2 e BMP-7 estimulam a diferenciação das células do ligamento periodontal em osteoblastos, e aumentam a expressão de marcadores do tecido mineralizado, quando em combinação com células do ligamento ou osteoblastos, *in vitro*.⁽³⁾ As BMPs também demonstraram sub-regular a proliferação e mineralização de cementoblastos e fibroblastos gengivais⁽³⁾. Nos alvéolos após extração, em ratos, a BMP-2 mostrou aumentar a velocidade e quantidade de formação óssea através dos seus efeitos osteoindutivos.⁽³⁾ Para além disso, a BMP-2 é também um agente quimiotático para MSC indiferenciadas.⁽⁵⁾ A BMP-7, também conhecida como proteína osteogénica-1, tem aplicações semelhantes à BMP-2.⁽³⁾

Quando usadas de forma independente, estas moléculas apresentam um efeito com relevância clínica reduzido, uma vez que são altamente solúveis, diluindo-se no local terapêutico.⁽⁶¹⁾ Desta forma, o uso combinado com *scaffolds* permite aumentar a sua permanência no local de implantação e aumentar o efeito terapêutico.⁽⁶¹⁾

✓ **PDGF**

O papel primário do PDGF é a promoção da cicatrização do tecido mole, uma vez que é fortemente quimiotático para as células inflamatórias, apresentando também um forte efeito estimulatório nas MSC.^(3, 12, 22)

Estudos *in vitro* mostraram que este fator estimula a população celular-chave para a regeneração periodontal, aumentando a síntese de ADN cementoblástico e regulando a

expressam da osteopontina.⁽³⁾ O PDGF estimula a quimiotaxia das células do ligamento periodontal e a sua divisão, as quais podem modular a formação óssea através do aumento da proliferação dos osteoblastos.⁽³⁾

✓ **IGF:**

A via de sinalização IGF é uma importante via envolvida na proliferação e diferenciação dos osteoblastos,⁽⁶²⁾ O IGF-1 e IGF-2, os dois únicos membros da família IGF, têm papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento, remodelação e reparação ósseas bem como na expressão de proteínas colagenosas e não colagenosas; são ambos expressos nos osteoblastos e apresentam propriedades e funções biológicas semelhantes.^(9, 62)

Foi demonstrado que o IGF-1 promove a diferenciação osteogénica e a síntese de colagénio tipo I.⁽⁶²⁾ Este pode também ser usado em associação com a BMP-6, mostrando ser uma boa alternativa para a indução da formação de tecido ósseo.⁽⁶²⁾

✓ **FGF**

O FGF-2 tem efeitos sobre os tecidos moles ao induzir a proliferação das células epiteliais gengivais, fibroblastos do tecido conjuntivo e gengival, e as células do ligamento periodontal.⁽³⁾ Curiosamente, o FGF-2 inibe a mineralização e a expressão da fosfatase alcalina pelas células do ligamento periodontal, mas permite a manutenção do seu potencial de proliferação e expressão de marcadores característicos da osteogénese – como a osteopontina.⁽³⁾ Estas características, associadas ao seu forte potencial angiogénico, podem promover um ambiente favorável à regeneração periodontal, o qual inclui a formação do osso alveolar.⁽³⁾

✓ **GDF**

O GDF-5, também conhecido como a proteína morfogenética derivada da cartilagem 1 (CDMP-1), é outro membro da superfamília TGF.^(3, 63, 64)

Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão do GDF-5 é detetada nas condensações de pré-cartilagem.⁽⁶⁴⁾ À medida que o embrião se desenvolve, o GDF-5 é expresso no núcleo cartilaginoso dos ossos longos, nas superfícies articulares e nas células tipo osteoblastos dos centros de ossificação primária dos ossos longos, sugerindo que o GDF-5 é crucial para o desenvolvimento dos ossos e articulações.⁽⁶⁴⁾ Para além disso, também foi demonstrado o seu papel importante numa variedade de processos fisiológicos músculo-esqueléticos, tais como a ossificação endocondral, formação de ligamentos e tendões, e manutenção e reparação de ligamentos.⁽⁶⁴⁾

Assim, de uma forma geral, o GDF-5 é considerado um fator de crescimento responsável por estimular a proliferação das células do ligamento periodontal, a diferenciação precoce dos osteoblastos, e a síntese da matriz extracelular por ambos os tipos celulares.⁽³⁾

3.3.3.4. Interação

De forma a atingir uma reconstrução/regeneração eficaz do tecido ósseo, as células estaminais devem crescer e diferenciarem-se em condições osteogénicas em *scaffolds* para, subsequentemente, serem implantadas *in vivo*. Contudo, a nova formação óssea, ou o processo de osteointegração com o tecido ósseo residente mostra, muitas vezes, ser inefetiva, devido à falha no recrutamento e adesão das células estaminais autólogas. Para se obter uma arquitetura tecidual adequada durante a morfogénese, as células devem interagir entre si e com a matriz extracelular, num processo mediado por moléculas sinalizadoras, num microambiente suportado pelo *scaffold*, havendo, desta forma, um controlo mais adequado sobre a cinética de libertação e sua localização.^(3, 46)

Numerosos estudos têm sido realizados utilizando DPSC em *scaffolds* de HA/TCP, tendo em vista a formação de osso.⁽³⁴⁾ Também se verificou a formação de tecido ósseo quando estas populações celulares foram usadas em *scaffolds* de PLGA, e hidrogel nanofibroso.⁽⁴¹⁾ Outros estudos evidenciam também, clínica e radiograficamente, a regeneração óssea através da transplantação de DPSC em *scaffolds* de colagénio. Nestes estudos, a população celular é colhida e expandida previamente à sua colocação nos *scaffolds*, sendo posteriormente implantada. Após um determinado período de tempo observa-se, globalmente, uma indução do processo de formação óssea.^(29, 41) Estes resultados sugerem que o colagénio providencia um ambiente de retro-

regulação positiva, no sentido de guiar a diferenciação das células estaminais na linhagem osteogénica, impulsionando a sua osteodiferenciação.⁽⁶⁵⁾

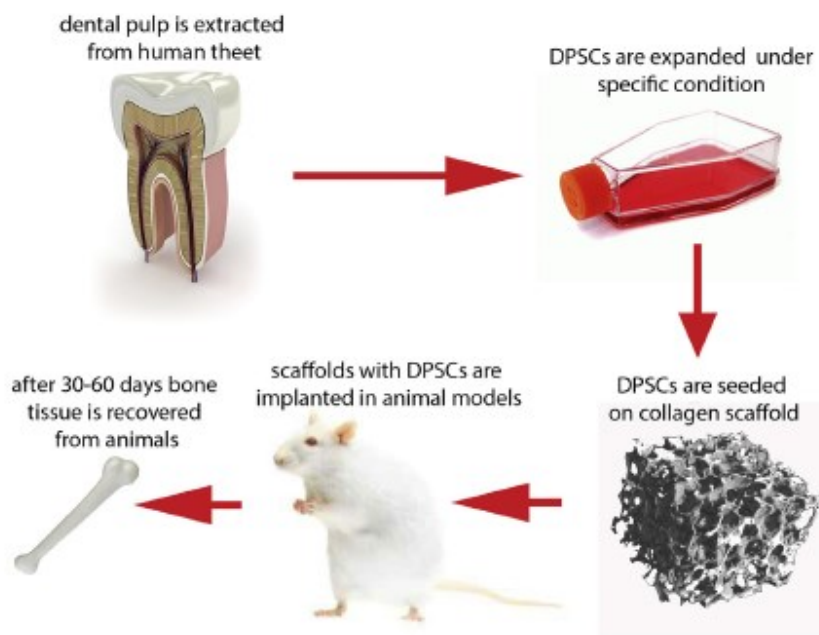


Fig. 2 - Diagrama da engenharia de tecido ósseo baseada em DPSC para a regeneração óssea em modelo animal.

(La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of dentistry*. 2014;42(7):761-8 – sem autorização do autor)

Mais recentemente, têm sido utilizadas DPSC em *scaffolds* de biocoral, originando a elevada expressão de genes osteogénicos, juntamente com elevados valores de expressão de sialoproteína e osteocalcina. É também possível observar a migração de DPSC para o interior dos poros do biocoral, onde ocorreu secreção de matriz extracelular e diferenciação osteoblástica.⁽¹⁰⁾

Noutros estudos verificou-se que a implantação subcutânea em ratos imunocomprometidos de SCAP em *scaffolds* de HA permitiu a formação de osso mineralizado.⁽⁴¹⁾

A utilização de outras populações celulares, como as SHED, em modelos caninos e suínos, implantadas em *scaffolds* de TCP e HA/TCP, mostrou igualmente induzir a regeneração óssea com sucesso.⁽⁴¹⁾

4. CONCLUSÃO

A engenharia de tecidos baseada em células estaminais provenientes da cavidade oral representa uma nova abordagem fascinante para a reparação do tecido ósseo, uma vez que estas populações celulares podem ser obtidas a partir de tecidos de dentes extraídos durante alguns tratamentos médico-dentários de rotina, o que minimiza a morbidade do procedimento de recolha. Podem também ser criopreservadas a longo prazo e, posteriormente, recuperadas, mantendo as suas características originais.

Contudo, apesar das vantagens apresentadas, verificam-se ainda algumas limitações com a utilização destas populações celulares, nomeadamente a sua disponibilidade já que nem todos os indivíduos necessitam de extrair dentes, o que limita o acesso ao isolamento de células estaminais de origem dentária ou oral. No caso das SHED, também não é possível prever com exatidão o período de exfoliação dos dentes decíduos, limitando a aplicabilidade de um protocolo de recolha adequado. Para além disto, as condições de cultura, quantidade de células implantadas, número de implantações e a via de entrega, necessitam ainda de ser otimizadas, além de potenciais problemas relacionados com a biossegurança, uma vez que o risco de transmissão de doenças, vírus, fungos ou príões – associadas potencialmente aos protocolos de expansão celular *ex vivo* - podem também limitar a sua aplicabilidade clínica.

Para além dos problemas relacionados com as células estaminais, há também fatores a considerar nos *scaffolds*, nomeadamente a sua arquitetura e degradação. Continua a ser difícil a fabricação de arquiteturas internas permissivas às células, sendo ainda facto que as propriedades mecânicas são ainda subótimas em muitos tipos de *scaffolds*.

Assim, apesar da investigação em células estaminais de origem dentária ter aumentado numa taxa exponencial, as aplicações terapêuticas progridem de forma mais lenta. A engenharia de tecidos ósseos baseada em células estaminais da cavidade oral tem um futuro promissor na medicina regenerativa. Contudo, uma vez que a tecnologia das células estaminais está ainda na sua infância, a cooperação interdisciplinar é necessária para atingir aplicações clínicas bem-sucedidas. É urgente mais investigação para que os estudos *in vitro* e *in vivo* (em modelos animais) possam passar a uso clínico com a garantia efetiva da sua biossegurança.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang P, Zhao L, Chen W, Liu X, Weir MD, Xu HH. Stem Cells and Calcium Phosphate Cement Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of dental research*. 2014;93(7):618-25.
2. Bueno EM, Glowacki J. Cell-free and cell-based approaches for bone regeneration. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(12):685-97.
3. Pilipchuk SP, Plonka AB, Monje A, Taut AD, Lanis A, Kang B, et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2015;31(4):317-38.
4. Paduano F, Marrelli M, Alom N, Amer M, White LJ, Shakesheff KM, et al. Decellularized bone extracellular matrix and human dental pulp stem cells as a construct for bone regeneration. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2017;28(8):730-48.
5. Aghaloo TL, Hadaya D. Basic Principles of Bioengineering and Regeneration. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2017;29(1):1-7.
6. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian dental journal*. 2014;59 Suppl 1:117-30.
7. Hao J, Zhang Y, Jing D, Shen Y, Tang G, Huang S, et al. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Perspective into mechanical induction of MSC fate. *Acta biomaterialia*. 2015;20:1-9.
8. Konopnicki S, Troulis MJ. Mandibular Tissue Engineering: Past, Present, Future. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;73(12 Suppl):S136-46.
9. Murphy CM, O'Brien FJ, Little DG, Schindeler A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. *European cells & materials*. 2013;26:120-32.
10. Rodrigues R. Dental Stem Cells Characterization and Bone Regenerative Potential in Oral Medicine 2015.
11. Heng BC, Lim LW, Wu W, Zhang C. An Overview of Protocols for the Neural Induction of Dental and Oral Stem Cells In Vitro. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2016;22(3):220-50.
12. Patil S, Paul S. A comprehensive review on the role of various materials in the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells with a special focus on the association of heat shock proteins and nanoparticles. *Cells, tissues, organs*. 2014;199(2-3):81-102.
13. Yi S, Yu M, Yang S, Miron RJ, Zhang Y. Tcf12, A Member of Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors, Mediates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation In Vitro and In Vivo. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2017;35(2):386-97.
14. Heliotis M, Ripamonti U, Ferretti C, Kerawala C, Mantalaris A, Tsiridis E. The basic science of bone induction. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2009;47(7):511-4.
15. Wang P, Zhao L, Liu J, Weir MD, Zhou X, Xu HH. Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone research*. 2014;2:14017.
16. Wang J, Ma H, Jin X, Hu J, Liu X, Ni L, et al. The effect of scaffold architecture on odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Biomaterials*. 2011;32(31):7822-30.
17. Chen JC, Jacobs CR. Mechanically induced osteogenic lineage commitment of stem cells. *Stem cell research & therapy*. 2013;4(5):107.
18. Javed A, Chen H, Ghori FY. Genetic and transcriptional control of bone formation. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2010;22(3):283-93, v.
19. Liu YJ, Su WT, Chen PH. Magnesium and zinc borate enhance osteoblastic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth in vitro. *Journal of biomaterials applications*. 2017;885328217740730.
20. Ripamonti U, Petit JC. Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(5-6):489-99.
21. Thompson EM, Matsiko A, Farrell E, Kelly DJ, O'Brien FJ. Recapitulating endochondral ossification: a promising route to in vivo bone regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015;9(8):889-902.

22. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *International orthopaedics*. 2013;37(12):2491-8.
23. 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.
24. Khanna-Jain R, Mannerstrom B, Vuorinen A, Sandor GK, Suuronen R, Miettinen S. Osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells on beta-tricalcium phosphate/poly (l-lactic acid/caprolactone) three-dimensional scaffolds. *Journal of tissue engineering*. 2012;3(1):2041731412467998.
25. Gamradt SC, Lieberman JR. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Annals of biomedical engineering*. 2004;32(1):136-47.
26. Buxton PG, Cobourne MT. Regenerative approaches in the craniofacial region: manipulating cellular progenitors for oro-facial repair. *Oral diseases*. 2007;13(5):452-60.
27. Estrela C, Alencar AH, Kitten GT, Vencio EF, Gava E. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian dental journal*. 2011;22(2):91-8.
28. Vina JA, El-Alami M, Gambini J, Borrás C, Vina J, Penarrocha MA. Application of mesenchymal stem cells in bone regenerative procedures in oral implantology. A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(1):e60-5.
29. Machado E, Fernandes MH, Gomes Pde S. Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2012;113(6):728-33.
30. Tatullo M, Marrelli M, Paduano F. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells. *International journal of medical sciences*. 2015;12(1):72-7.
31. Luo Y, Shen H, Fang Y, Cao Y, Huang J, Zhang M, et al. Enhanced proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on graphene oxide-incorporated electrospun poly(lactic-co-glycolic acid) nanofibrous mats. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(11):6331-9.
32. Aurrekoetxea M, Garcia-Gallastegui I, Irastorza I, Luzuriaga J, Uribe-Etxebarria V, Unda F, et al. Dental pulp stem cells as a multifaceted tool for bioengineering and the regeneration of craniomaxillofacial tissues. *Frontiers in physiology*. 2015;6:289.
33. Mikos AG, Herring SW, Ochareon P, Elisseeff J, Lu HH, Kandel R, et al. Engineering complex tissues. *Tissue engineering*. 2006;12(12):3307-39.
34. La Noce M, Paino F, Spina A, Naddeo P, Montella R, Desiderio V, et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of dentistry*. 2014;42(7):761-8.
35. Rodriguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramirez MD, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal*. 2012;17(6):e1062-7.
36. Asatrian G, Pham D, Hardy WR, James AW, Peault B. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem cells and cloning : advances and applications*. 2015;8:39-48.
37. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczech C. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of oral science*. 2010;52(4):541-52.
38. Rodriguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramirez MC, Blanquer M, et al. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International endodontic journal*. 2011;44(9):800-6.
39. Saito MT, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World journal of stem cells*. 2015;7(2):399-407.
40. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PloS one*. 2012;7(12):e51777.

41. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, et al. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells* (Dayton, Ohio). 2015;33(3):627-38.
42. Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem cell reviews*. 2008;4(1):21-6.
43. Lucaciu O, Soritau O, Gheban D, Ciuca DR, Virtic O, Vulpoi A, et al. Dental follicle stem cells in bone regeneration on titanium implants. *BMC biotechnology*. 2015;15:114.
44. Yu G, Wang J, Lin X, Diao S, Cao Y, Dong R, et al. Demethylation of SFRP2 by histone demethylase KDM2A regulated osteo-/dentinogenic differentiation of stem cells of the apical papilla. *Cell proliferation*. 2016;49(3):330-40.
45. Heng BC, Zhang C, Deng X. Biomedical Applications of Dental and Oral-Derived Stem Cells. 2017;2017:2931054.
46. Di Benedetto A, Brunetti G, Posa F, Ballini A, Grassi FR, Colaianni G, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from dental bud: Role of integrins and cadherins. *Stem cell research*. 2015;15(3):618-28.
47. 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. *Journal of dental research*. 2009;88(9):792-806.
48. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell and tissue research*. 2008;331(1):359-72.
49. Spina A, Montella R, Liccardo D, De Rosa A, Laino L, Mitsiadis TA, et al. NZ-GMP Approved Serum Improve hDPSC Osteogenic Commitment and Increase Angiogenic Factor Expression. *Frontiers in physiology*. 2016;7:354.
50. Tatullo M, Marrelli M, Shakesheff KM, White LJ. Dental pulp stem cells: function, isolation and applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2015;9(11):1205-16.
51. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *Journal of dental research*. 2006;85(11):966-79.
52. Chalisserry EP, Nam SY, Park SH, Anil S. Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal of tissue engineering*. 2017;8:2041731417702531.
53. Um S, Choi JR, Lee JH, Zhang Q, Seo B. Effect of leptin on differentiation of human dental stem cells. *Oral diseases*. 2011;17(7):662-9.
54. D'Alimonte I, Mastrangelo F, Giuliani P, Pierdomenico L, Marchisio M, Zuccarini M, et al. Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells: A Comparative Analysis Between Human Subcutaneous Adipose Tissue and Dental Pulp. *Stem cells and development*. 2017;26(11):843-55.
55. Tasli PN, Aydin S, Yalvac ME, Sahin F. Bmp 2 and bmp 7 induce odonto- and osteogenesis of human tooth germ stem cells. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172(6):3016-25.
56. Alkaisi A, Ismail AR, Mutum SS, Ahmad ZA, Masudi S, Abd Razak NH. Transplantation of human dental pulp stem cells: enhance bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013;71(10):1758.e1-13.
57. Wang T, Kang W, Du L, Ge S. Rho-kinase inhibitor Y-27632 facilitates the proliferation, migration and pluripotency of human periodontal ligament stem cells. 2017;21(11):3100-12.
58. Zhao L, Wu Y, Tan L, Xu Z, Wang J, Zhao Z, et al. Coculture with endothelial cells enhances osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via cyclooxygenase-2/prostaglandin E2/vascular endothelial growth factor signaling under hypoxia. *Journal of periodontology*. 2013;84(12):1847-57.
59. Ripamonti U. Soluble osteogenic molecular signals and the induction of bone formation. *Biomaterials*. 2006;27(6):807-22.
60. El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M. Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. 2017;34(6):1152-70.

61. Kim YK, Lee J, Um IW, Kim KW, Murata M, Akazawa T, et al. Tooth-derived bone graft material. *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2013;39(3):103-11.
62. Majidinia M, Sadeghpour A, Yousefi B. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. 2018;233(4):2937-48.
63. Lee J, Wikesjo UM. Growth/differentiation factor-5: pre-clinical and clinical evaluations of periodontal regeneration and alveolar augmentation--review. *Journal of clinical periodontology*. 2014;41(8):797-805.
64. Feng C, Liu H, Yang Y, Huang B, Zhou Y. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;35(1):1-16.
65. Fang TJ, Wang DH, Wang CY, Poongodi R, Liou NH, Liu JC, et al. Osteogenic prospective of deriving human dental stem cells in collagen matrix boost. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2017;28(12):192.

6. ANEXOS

DECLARAÇÃO

Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 17 de Maio de 2018

A Investigadora,

Cláudia Raquel Aniceto Resende
Cláudia Raquel Aniceto Resende

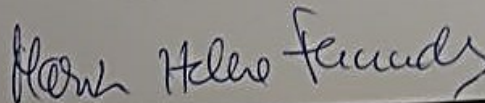
PARECER

(Entrega do trabalho final de Monografia)

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Cláudia Raquel Aniceto Resende com o título: “Regeneração Óssea através da Engenharia de Tecidos Baseada em Células Estaminais Dentárias – revisão bibliográfica”, está de acordo com as regras estipuladas na Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 17 de Maio de 2018

A Orientadora,



Maria Helena Raposo Fernandes

(Professora Catedrática)