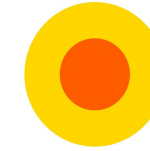


U. PORTO

U. PORTO

U. PORTO



**FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

REGENERAÇÃO ÓSSEA CRANIOFACIAL COM RECURSO A CÉLULAS ESTAMINAIS

ANA JOÃO OLIVEIRA DA SILVA

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA DA

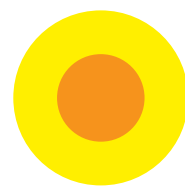
UNIVERSIDADE DO PORTO

Regeneração óssea craniofacial com recurso a células estaminais

Ana João Oliveira da Silva



FMDUP
2015



**PORTO
2015**

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



“Regeneração óssea craniofacial com recurso a células estaminais”

Autora:

Ana João Oliveira da Silva

Aluna 5º ano Mestrado Integrado Medicina Dentária

Contacto: anasilva2792@gmail.com

Orientador:

Prof. Doutor Pedro de Sousa Gomes

Professor Auxiliar

Co-orientadora:

Prof. Doutora Maria Helena Raposo Fernandes

Professora Catedrática

Porto, 2015

“(...) Vede sempre o lado melhor das coisas e não o pior.

Mas o melhor meio para alcançar a felicidade é contribuir para a felicidade dos outros. Procurai deixar o mundo um pouco melhor de que o encontrastes e quando vos chegar a vez de morrer, podeis morrer felizes sentindo que ao menos não desperdiçastes o tempo e fizestes todo o possível por praticar o bem. (...)”

Baden Powell

ABREVIATURAS

ASC – Células estaminais derivadas do tecido adiposo

BMP – Proteína óssea morfogenética

BMSC – Células estaminais derivadas da medula óssea

CPC – Cimento fosfato de cálcio

DFPC – Células estaminais derivadas do folículo dentário

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPSC – Células estaminais derivadas da polpa dentária

ESC – Células estaminais embrionárias

FEV - Fração vascular de estroma

FGF - Fator de crescimento fibroblasto

HA – Hidroxiapatite

IGF – Fator de crescimento tipo insulina

iPS – Células de pluripotencia induzida

mPEG – metoxi-polietilenoglicol

MSC – Células estaminais mesenquimais

PCL – Policaprolactona

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PGA – Ácido poliglicólico

PLA – Ácido polilático

PDLSC – Células estaminais derivadas do ligamento periodontal

RNA – Ácido ribonucleico

SHED – Células estaminais derivadas dentes decíduos exfoliados

SCAP – Células estaminais derivadas da papila apical

TGF- β – Fator de crescimento transformado

UCMSC – Células estaminais do cordão umbilical

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1. Resumo	2
2. Introdução	4
3. Material e Métodos	5
4 – Desenvolvimento	6
4.1 Defeitos ósseos craniofaciais	6
4.1.1 – Cancro da cabeça e pescoço	6
4.1.2 – Fenda Labial e Palatina	6
4.2. Tratamento dos defeitos ósseos	7
4.2.1 Enxerto ósseo autólogo	7
4.2.2 Aloenxertos e xenoenxertos	7
4.2.3 Materiais Aloplásticos	8
4.2.4 Outras técnicas	9
4.3. Engenharia tecido ósseo	10
4.3.1 <i>Scaffold</i>	11
4.3.1.1- <i>Scaffolds</i> metálicos	13
4.3.1.2 – <i>Scaffolds</i> Cerâmicos	13
4.3.1.3 – <i>Scaffolds</i> Poliméricos	14
4.3.1.4 – <i>Scaffolds</i> Compósitos	16
4.3.2 Biomoduladores	17
4.3.3 Células	19
4.3.3.1 – Células estaminais embrionárias	19
4.3.3.2 – Células estaminais mesenquimais adultas	21
4.3.3.2.1 – Células estaminais derivadas de medula óssea	22
4.3.3.2.2 – Células estaminais derivadas de tecido adiposo	24
4.3.3.2.3 – Células estaminais dos tecidos dentários	25
4.3.3.2.4 – Células estaminais perivasculares	27
4.3.3.2.5 – Células estaminais perinatais	28
4.3.3.3 – Células de pluripotência induzida	32
5. Conclusão	34
6. Bibliografia	35
Anexos	40
Anexo I	40
Anexo II	42

1. RESUMO

A existência de defeitos ósseos derivados de traumas, patologias (e.g. osteomielite, osteoporose) ou de excisão de tumores, levou à necessidade de criar estratégias de tratamento que visam a reconstrução óssea.

O tratamento destes defeitos, atualmente cursa com a utilização de enxertos ósseos. Contudo, é sabido que estes apresentam inúmeras desvantagens como complicações no segundo local cirúrgico, sobrevivência variável e ainda provável rejeição no caso de aloenxertos ou xenoenxertos. O recurso a biomateriais também se torna ineficaz em casos de defeitos de grande dimensão.

Para a aplicação clínica da engenharia de tecidos, é necessária a existência de células estaminais, de um *scaffold* biocompatível e sinais moleculares. Assim, a engenharia do tecido ósseo envolvendo células estaminais tem sido vista como uma alternativa viável e eficaz no tratamento destes problemas, permitindo uma regeneração óssea mais rápida e eficaz.

Esta monografia tem como objectivo a realização de uma revisão bibliográfica sobre a utilização das células estaminais na regeneração óssea craniofacial.

Palavras-chave: Regeneração óssea; Engenharia tecidos; Células estaminais

ABSTRACT

The existence of craniofacial defects due to trauma, diseases (e.g. osteomyelitis, osteoporosis) or tumor excision, lead to the need to create treatment strategies for bone regeneration.

The treatment of these defects currently is the use of bone grafts. However, it is known that this solution has a lot of disadvantages as complication in the second surgical site, variable survival and probably rejection in allografts or xenografts. The use of biomaterials isn't efficient too, for critical-sized defects.

The clinical application of tissue engineering implies the presence of stem cells, biocompatible scaffolds and molecular signals. In this way, the bone tissue engineering with stem cells has been available as a viable and efficient alternative on treatment of these problems, permitting the bone regeneration.

This bibliography review aims to conduct a literature search and present the use of stem cells in the craniofacial bone tissue regeneration.

Key words: Bone regeneration; Tissue Engineering; Stem cells

2. INTRODUÇÃO

O osso craniofacial tem uma função de proteção dos órgãos internos da região da cabeça (como o cérebro) e de suporte para os tecidos moles da região em questão, proporcionando assim uma ancoragem às estruturas dentárias e uma manutenção da estabilidade estrutural, necessária para as funções físicas e componentes estéticos do corpo humano.^{1,2,3}

Os defeitos do osso craniofacial resultam de diversas condições desde malformações congénitas (fenda palatina) até quadros de trauma, infeção, osteomielite ou resseções cirúrgicas de tumor.^{4,5,6} Além destas, o osso craniofacial pode ser afetado por situações sistémicas como as doenças osteodegenerativas, que têm ganho importância devido ao aumento da incidência de patologias como a osteoporose e a artrite. Considerando ainda este tipo de condições, são de referenciar a osteogénese imperfeita ou displasia fibrosa, associadas a fragilidade do tecido ósseo devido a defeitos na matriz.⁷

Face a estes defeitos ósseos da região da cabeça e face há um comprometimento de funções como a mastigação, fala e deglutição.³ É também de salientar que as consequências se estendem além das condições locais pois afetam a qualidade de vida dos pacientes.⁸ Além das despesas médicas, a existência de defeitos ósseos afeta a integração social, a capacidade de obtenção de atividade económica e afeta os pacientes em termos psico-sociais.⁵

O tratamento regenerativo mais usado atualmente cursa com o uso de enxertos ósseos autólogos, aloenxertos ou materiais aloplásticos.⁸ Apesar de estes procedimentos poderem restaurar certos defeitos craniofaciais, estes apresentam diversas desvantagens, estando longe de serem o tratamento ideal.^{2,8}

A promessa da medicina regenerativa é produzir um tecido saudável para substituir os tecidos patológicos ou danificados.⁷

A engenharia do tecido ósseo oferece abordagens interessantes para a regeneração e reparação óssea que envolve o sinergismo entre células estaminais, sinais moleculares e um *scaffold* adequado.⁹

Esta revisão bibliográfica tem como objetivo analisar a literatura científica sobre a regeneração óssea craniofacial com células estaminais, conhecendo as diferentes abordagens e as vantagens e desvantagens das mesmas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas duas pesquisas bibliográficas na base de dados Pubmed e Biblioteca Virtual da U.Porto.

A primeira pesquisa incluiu os termos “Craniofacial bone regeneration stem cells” limitados a cinco anos e com o texto disponível. Desta pesquisa resultaram cinquenta e seis artigos os quais foram lidos e selecionados consoante o interesse para o tema em questão. A exclusão de sete artigos resultou da sua referência a células estaminais hematopoiéticas, não sendo estas diretamente relacionadas com a regeneração óssea, ou por referência da regeneração de outros tecidos que não o tecido ósseo. Assim, foram selecionados quarenta e nove artigos. Foram ainda utilizados 2 livros de texto, com informação relativa à temática em análise.

4 – DESENVOLVIMENTO

A importância do osso craniofacial resulta na necessidade e preocupação em conhecer as melhores abordagens terapêuticas para os defeitos ósseos. Propõe-se então a apresentação de dois defeitos ósseos craniofaciais mais comuns e as diferentes alternativas de tratamento, sendo evidenciada a mais recente e inovadora abordagem que recorre às células estaminais: a engenharia do tecido ósseo.

4.1 DEFEITOS ÓSSEOS CRANIOFACIAIS

4.1.1 – CANCRO DA CABEÇA E PESCOÇO

O cancro da cabeça e pescoço implica diversas abordagens terapêuticas como a cirurgia, radioterapia e quimioterapia.¹⁰ A cirurgia, excisão do tumor, leva à existência de defeitos ósseos que necessitam de posterior reconstrução.^{3,11,12} A radiação, por sua vez, modifica o ambiente biológico do osso havendo uma redução da celularidade, aparecimento de fibrose, diminuição da densidade vascular e obliteração de pequenos vasos sanguíneos.¹⁰ Tal tratamento implicará uma pobre cicatrização de fraturas, crescimento debilitado e ainda poderão surgir complicações tardias devastadoras, como a osteoradionecrose.¹⁰ Assim, o osso sujeito a tratamento com radiação demonstra um aumento de reabsorção, diminuição da osteogénese e redução da força mecânica, predispondo o paciente a problemas de fraturas patológicas tardias bem como a consequências funcionais desastrosas.¹⁰

4.1.2 – FENDA LABIAL E PALATINA

A fenda labial e palatina representa uma das mais comuns malformações congénitas humanas, correspondendo a 1/3 dos defeitos de nascença.^{13,14}

A etiologia desta malformação é complexa, cursa com fatores genéticos e ambientais, resultando numa falha de fusão das placas palatinas.^{13,14} Tal resultará num fenótipo variável, desde uma simples cicatriz ou fenda no lábio até a um padrão craniofacial complexo que envolve o palato, maxila, osso zigomático, órbita e crânio.¹³

A escolha do tipo de tratamento tem como objetivo a redução do número de intervenções cirúrgicas na criança, durante o processo de reabilitação.¹³

4.2. TRATAMENTO DOS DEFEITOS ÓSSEOS

4.2.1 ENXERTO ÓSSEO AUTÓLOGO

Esta técnica de reconstrução óssea é considerada o *gold standard* no tratamento de defeitos ósseos, sendo usada em 90% dos casos.^{6,15,16} A sua utilização permite a substituição do tecido ósseo danificado ou perdido por osso saudável e não essencial do próprio paciente.⁷ Existem vários recursos para a obtenção de osso sendo que a fonte dos enxertos determina a sua qualidade e funcionalidade no complexo craniofacial.⁵ As áreas mais frequentes para a colheita do osso autólogo são locais extra-orais (como a crista íliaca) e locais intraorais (como a sínfise mandibular e a tuberosidade maxilar).¹⁷ É de referir que os enxertos altamente vascularizados tem a vantagem de uma incorporação rápida no osso hospedeiro, como no caso do recurso do perónio e osso íliaco.⁵

A sua referência como terapêutica de primeira escolha deve-se ao facto de ser um enxerto biocompatível e apresentar características favorecedoras ao tratamento.¹⁸ Além da sua competência mecânica, os enxertos autólogos são bioativos, osteocondutores, osteoindutores e osteogénicos.^{5,19}

Apesar das características vantajosas apresentadas, esta abordagem apresenta diversas desvantagens. O osso é obtido de um local dador no próprio paciente. Assim, a colheita envolverá um segundo local cirúrgico, sujeito a morbilidade e possíveis complicações como hematoma, inflamação e reabsorção.^{15,19,20} Tal processo levará a um aumento do tempo cirúrgico bem como dos custos associados.^{3,15,21} Além disso, a quantidade de osso obtido está limitada ao local dador, sendo geralmente insuficiente, o que limita a sua utilização nos casos de grandes defeitos.^{1,7,12} Outra desvantagem refere-se ao facto de que ossos de diferentes partes do organismo apresentarem propriedades biomecânicas diferentes, e ainda a falta de adaptabilidade ao local de implantação.⁵

Deste modo, esta técnica, ainda que considerada o *gold standard* atual, apresenta um insucesso entre 3% a 30% e algumas limitações para o paciente.⁶

4.2.2 ALOENXERTOS E XENOENXERTOS

Os aloenxertos são enxertos de tecido ósseo não vital, obtido a partir de um indivíduo e são transferidos para outro indivíduo da mesma espécie.²² Existem três formas de osso alogénico: fresco congelado, congelado-seco e osso desmineralizado congelado-seco.²²

Os xenoenxertos consistem em tecido ósseo esponjoso desproteínizado que é obtido de uma espécie e é transferido para um local receptor de outra espécie.²² O seu uso deve-se principalmente à escassez de enxertos de osso humano, sendo que, com o auxílio da esterilização e técnicas de processamento/tratamento, a utilização destes enxertos pode ser viável. Um exemplo de xenoenxerto muito usado na Medicina Dentária é o Bio-oss®.²²

Estes tipos de enxertos permitem a obtenção de elevadas quantidades ósseas e evitam a morbilidade associada ao segundo local cirúrgico, contornando assim desvantagens dos enxertos autólogos.²¹ Contudo, são metodologias que englobam riscos de carácter biológico, como a contaminação cruzada – risco de transmissão de doenças infecciosas entre dador e receptor – e de rejeição imunológica.^{5,8,20} A sua eficácia é então limitada, apresentando um insucesso entre 20% a 40%.^{4,6}

4.2.3 MATERIAIS ALOPLÁSTICOS

Estes materiais são fabricados a partir de materiais sintéticos como a hidroxiapatite, fosfato de cálcio, polímeros e metais.^{5,20} Alguns aspetos de arquitetura devem ser considerados, como a existência de poros que permitam a migração celular e o crescimento vascular, as características de superfície ideais para a adesão e proliferação celular, e ainda a existência de condutores para o transporte de nutrientes celulares e a remoção de produtos do metabolismo.⁵

O fabrico destes materiais sintéticos, *scaffolds* bioativos acelulares, pode ainda incluir o uso de fatores de crescimento de modo a haver um recrutamento de células hospedeiras para guiarem o processo regenerativo.⁵

O seu uso implica um menor risco de infeção e rejeição imune, e permite a obtenção das forças mecânicas, forma e tamanho desejadas. Apesar disso, a utilização desta abordagem é biologicamente disfuncional e apresenta outras desvantagens.¹⁹ É de referir que implica cirurgias múltiplas que ainda assim poderão resultar em não-união óssea e formação de cicatriz.^{8,19} Além disso as propriedades osteoindutoras e osteocondutoras são inferiores em relação a outras técnicas, principalmente em grandes defeitos ou em caso de infeção.^{5,20} Estes biomateriais também não proporcionam função metabólica, remodelação óssea e ainda existe a possibilidade de reação de corpo estranho.^{5,8,19}

Dadas as desvantagens, têm sido investigadas abordagens que envolvam *scaffolds* celulares (com recurso à colonização com células estaminais) dada a melhor integração no osso hospedeiro, de forma prospetiva. O acréscimo de células autólogas irá aumentar a

osteogénese, prevenir a resposta imune, bem como apresentará outras vantagens como será referido no capítulo seguinte.⁵

4.2.4 OUTRAS TÉCNICAS

Os enxertos autólogos, aloenxertos, xenoenxertos e materiais aloplásticos são as técnicas mais frequentemente utilizadas. Contudo existem outras abordagens. O uso da distração óssea evita a morbilidade de um local dador e é de baixo custo.¹⁰ Esta técnica consiste numa estimulação de formação de novo osso pela separação gradual de duas extremidades osteogénicas.¹⁰

Outra técnica descrita é a regeneração óssea guiada por membranas.³ Esta técnica baseia-se num procedimento cirúrgico que utiliza membranas barreira com ou sem enxerto/substituto ósseo.¹⁷ A regeneração do osso por este método depende exclusivamente da migração de células pluripotentes ou células osteogénicas da periferia do defeito, sendo muitas vezes difícil de prever a eficácia do aumento ósseo.¹⁷ Em todo o caso, de modo a conseguir um procedimento eficaz, quatro princípios tem de ser cumpridos: manutenção de espaço, estabilidade do coágulo de fibrina, cicatrização da ferida em primeira intenção, exclusão do tecido epitelial e conjuntivo.¹⁷

No que diz respeito à fenda palatina, tal defeito levará a uma descontinuidade da arcada superior, devido à fenda, causando má-oclusão, o que implicará posteriormente um tratamento ortodôntico.¹⁴ Uma vez que a fenda envolve geralmente a região canina superior, segundo *Boyne e Sands* (1972), a erupção do canino para a área transplantada deve ser induzida e conseqüentemente obter-se-á uma excelente forma de arcada através da realização do enxerto ósseo, antes da erupção do canino.¹⁴ A correção deste defeito pode ser desafiadora, existindo diversas hipóteses que combinam a implantação de enxerto ósseo, a gengivoperiosteoplastia, ou a combinação de três terapias: labioplastia, palatoplastia e terapia da fala.^{13,14} A correção cirúrgica requer uma disponibilidade adequada de osso na região da fenda, de modo a estabelecer uma continuidade no esqueleto craniofacial, e facilitar a erupção dentária.^{13,14} Uma abordagem mais inovadora refere-se à engenharia de tecidos com células estaminais, com obtenção das populações celulares na medula óssea ou do músculo do lábio.¹³ Numa pequena cirurgia aos três meses de idade, são retirados fragmentos do lábio que são descartados. Este tecido inclui células estaminais que poderão ser utilizadas numa abordagem terapêutica com base na engenharia de tecido ósseo.¹³

4.3. ENGENHARIA TECIDO ÓSSEO

Existe uma grande variedade de abordagens de substituição, reparação e/ou regeneração de tecidos e órgãos como foi referido nas secções anteriores.²³

Ao longo do tempo tem havido a necessidade de melhorar as estratégias regenerativas de modo a obter um melhor tratamento dos defeitos ósseos de tamanho crítico, com um menor número de cirurgias, cicatriz mínima e menor dor, resultando assim num melhor resultado estético e conforto para o paciente.⁸

A engenharia de tecidos é um campo de investigação multidisciplinar com o objetivo de investigar e aplicar clinicamente a regeneração de órgãos e tecidos, respeitando as propriedades físicas e biológicas naturais e evitando os inconvenientes do enxerto ósseo.^{2,24,25}

Esta abordagem usa vias de sinalização e componentes do organismo, formando uma construção contínua que permite a adesão, proliferação e diferenciação celular bem como a deposição de matriz extracelular.^{2,24,25} Tal é possível com o recurso a fatores de crescimento e citocinas, bem como a *scaffolds* e células.²⁶

A aplicação clínica baseada em células estaminais requer tanto uma grande quantidade de células como uma tecnologia de expansão efetiva e protocolo de diferenciação reprodutível.²⁷ Assim, será possível uma reconstrução funcional através do transplante de um número adequado de células osteoprogenitoras competentes num *scaffold*, que responderão a estímulos externos e biológicos locais.²⁸

Deste modo, a engenharia de tecidos relacionada com a regeneração óssea implica a existência de três conceitos básicos - *scaffold*, sinais moleculares (factores de crescimento) e células – que serão descritos de seguida.^{14,19,29}

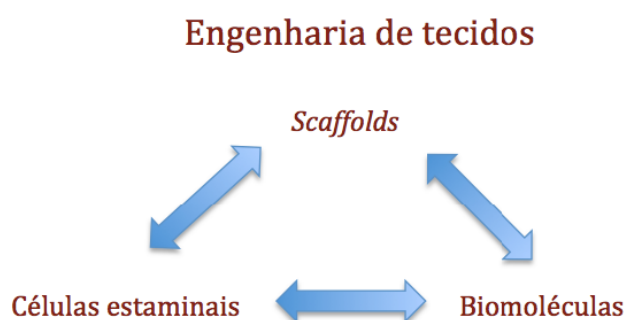


Fig. 1 – Um triângulo equilátero que ilustra os três componentes importantes na engenharia de tecidos e a interação contínua entre as células, scaffolds e moléculas bioativas ou fatores crescimento. (Adaptado de *Sándor, GKB. 2012*)²⁹

4.3.1 SCAFFOLD

Os *scaffolds* são biomateriais que podem ser usados isoladamente na reparação de defeitos ósseos. Contudo, por si só, um biomaterial não é suficiente na reparação de grandes defeitos ósseos sendo por isso importante a combinação com a terapia celular.⁴

O requisito fundamental é cumprir as propriedades funcionais e estéticas através de uma correta forma anatómica, capacidade de integração com o osso hospedeiro e tecidos moles adjacentes, e ainda possibilitar a nutrição vascular.⁵ Assim, torna-se vantajosa a existência de um *scaffold* biomimético, com propriedades mecânicas e composição semelhantes ao osso natural.³⁰

O *scaffold* desempenha diversas funções. Este é responsável pelo suporte para a adesão celular, cria espaço para a proliferação e diferenciação celular e guia o crescimento do tecido circundante.^{31,32} Estes biomateriais devem permitir a aposição óssea, guiar a regeneração, manter o volume adequado, suportar o stress externo e ainda distribuir as biomoléculas, facilitando o processo regenerativo.^{33,21,34}

As características ideais para um *scaffold* ser usado na engenharia do tecido ósseo cursam com a porosidade, resistência mecânica, biocompatibilidade, biodegradação, injetabilidade, modulação, osteocondutividade, osteoindução e capacidade de formar vasos sanguíneos.^{19,31,34}

A porosidade numa estrutura 3D deve estabelecer-se com poros de pelo menos 100µm de diâmetro, podendo estes ser de 200 a 350µm, em casos de tecido ósseo em crescimento. Assim, estas condições conciliadas com a existência de ligação entre poros (poros interconectados) permite a eficaz difusão de nutrientes e oxigénio para a sobrevivência celular.^{3,31,34} Contudo, a porosidade traz algumas desvantagens como a redução das propriedades mecânicas com o aumento do tamanho dos poros. É assim justificável a complexidade do fabrico de um *scaffold* ideal já que a obtenção das características idealizadas traz vantagens e limitações ao processo regenerativo.³⁴

Relativamente à resistência mecânica, é essencial obter um *scaffold* com propriedades mecânicas coincidentes com a do osso hospedeiro, tornando-o assim biocompatível, ou seja, capaz de suportar a atividade celular normal sem que haja quaisquer efeitos tóxicos locais ou sistémicos.^{31,34} Quanto à biodegradação, um biomaterial a ser usado deve ter a capacidade de se degradar *in vivo* através de uma reabsorção, que esteja em sintonia com o crescimento do novo tecido. Esta degradação, no caso da aplicação craniofacial, ocorre num período de 3 a 6

meses, e deve acontecer numa razão semelhante à da incorporação, proliferação e migração celular, para formação do novo tecido.^{3,19,31}

A injetabilidade de um biomaterial apresenta diversas vantagens. Esta característica proporciona uma melhor performance no envolvimento da região dos defeitos craniofaciais e ainda permite a incorporação de vários fatores de crescimento e células, evitando uma “cirurgia aberta” para o procedimento cirúrgico propriamente dito.⁸ Deste modo, o tempo de cirurgia é diminuído e esta torna-se menos traumática, e com melhor recuperação.^{8,30} Contudo, além das vantagens de tempo, dano e custo reduzido, segundo *Drury e Mooney* (2003), esta característica não proporciona força mecânica suficiente para que o biomaterial seja usado em osso sujeito a cargas biomecânicas efetivas.³⁰ Em todo o caso, um biomaterial deve ser ainda moldável para se adaptar aos contornos do defeito ósseo.¹⁹

No que diz respeito à osteocondutividade, um *scaffold* deve ser osteocondutor de modo a permitir a adesão e proliferação celular, resultando na formação de uma matriz extracelular.³⁴ A osteoindução, por sua vez, faz com que haja uma indução da formação de novo osso através de sinais biomoleculares e recrutamento de células osteoprogenitoras.³⁴

A característica ideal referente à capacidade de formar novos vasos sanguíneos permite a distribuição de nutrientes e oxigénio, essenciais à regeneração óssea.³⁴ A angiogénese é um processo que visa a formação de novos vasos a partir dos vasos já existentes, respondendo ao aumento da massa tecidual com expansão da componente vascular.³⁵ É de atender que este processo pode ser fisiológico ou patológico.³⁵ O primeiro ocorre na cicatrização de feridas, regeneração de um órgão, enquanto que o segundo tipo é desencadeado no crescimento de metástases de tumores ou patologias como osteoporose, artrite reumatoide, aterosclerose, entre outras.³⁵ A angiogénese deve ser conciliada com a porosidade uma vez que o tamanho dos poros influencia o crescimento vascular e a difusão do oxigénio existente.²⁴ Apesar da porosidade elevada melhorar a oxigenação e vascularização, a existência de poros grandes influencia negativamente a resistência mecânica.³¹

O *scaffold* deve então ter todas as características para tornar possível a existência de um microambiente favorável para a deposição de matriz extracelular, que permita a definição de uma geometria 3D da regeneração óssea, proporcionando composição química e estrutura física biologicamente funcionais.³

No que diz respeito aos tipos de *scaffold*, existem diversas composições. Geralmente estes são divididos em metálicos, cerâmicos, poliméricos e compósitos como será descrito de seguida.

4.3.1.1- *SCAFFOLDS* METÁLICOS

Os *scaffolds* metálicos foram primeiramente aplicados por *Greenfield* em 1909 sob a forma de rede metálica de modo a criar uma raiz dentária artificial que fixasse o osso em crescimento.³⁶ Posteriormente, em 1971, *Galante* desenvolveu fibras metálicas monoporo para uso clínico.³⁶

Estes materiais, predominantemente constituídos por titânio, tântalo e aço inoxidável, têm elevada força compressiva e excelente resistência à fadiga.^{34,36} Contudo, são materiais com diversas desvantagens que os tornam menos favoráveis ao uso como *scaffold* para a engenharia de tecido ósseo. O facto de serem metálicos faz com que haja libertação de iões ou partículas tóxicas devido ao processo de corrosão, podendo causar inflamação ou alergias.³⁶ Tal contribui para a ausência de duas características ideais referidas: biocompatibilidade e biodegradação.^{34,36}

Além disso, os *scaffolds* metálicos não permitem a incorporação de biomoléculas e apresentam um módulo de elasticidade diferente do osso natural, o que se traduzirá numa reduzida estimulação do crescimento de novo osso.^{34,36}

Apesar das boas propriedades mecânicas, o uso de *scaffolds* metálicos compromete a eficaz abordagem regenerativa na engenharia de tecido ósseo, que implica um microambiente favorável com biomoléculas e células.

4.3.1.2 – *SCAFFOLDS* CERÂMICOS

Os biomateriais cerâmicos podem ser distinguidos em dois grandes grupos: bioinertes e bioativos.³⁶ O último grupo pode ainda ser dividido em materiais reabsorvíveis e não reabsorvíveis.³⁶ Estes apresentam excelente biocompatibilidade, bioatividade, bem como propriedades químicas semelhantes aos componentes do osso mineral, sendo por isso muito usados.³⁶ As desvantagens deste tipo de *scaffolds* relacionam-se com as propriedades mecânicas em termos de fadiga e fratura.³⁶

Como exemplos deste tipo de biomaterial existem os biovidros, a hidroxiapatite e os materiais à base de fosfato de cálcio.^{34,36} Os biovidros tiveram a sua origem numa composição apresentada por *Hench* em 1969.³⁶ Este biovidro apresenta diversas vantagens como a capacidade de mimetizar a componente mineral do tecido ósseo, de facilitar a ligação e função celular, e de se ligar ao osso, formando uma interface funcional.^{9,26,32} Além disso, o biovidro é um material bioativo com excelente osteocondutividade e *ratio* de degradação

controlada.^{26,37,36} As desvantagens deste biomaterial cursam com as reduzidas propriedades mecânicas, nomeadamente baixa força e tenacidade.³⁶ Relativamente à hidroxiapatite, a sua força mecânica, capacidade de união ao osso e a semelhança com os minerais ósseos são vantagens ao seu uso como *scaffold*.^{6,11} Contudo, é um material pré-formado, sendo por isso incapaz de se adaptar na cavidade óssea resultante do defeito, e apresenta ainda um processo de reabsorção muito lento.⁶

Dos exemplos de *scaffolds* referidos, os que são baseados em cimento de fosfato de cálcio (CPC) são dos mais utilizados nas aplicações craniofaciais. O fosfato de cálcio, por si só, foi usado primeiramente por *Albee e Morrison* em 1920, sob a forma de fosfato tricálcico.³⁶ O CPC consiste numa mistura de fosfato tricálcico e fosfato dicálcico anidro, que surgiu em 1986, por *Brown e Chow*, tendo tido a aprovação da FDA para comercialização, cerca de 10 anos depois.^{6,33,30} Este tipo de *scaffold* cerâmico é injetável, moldável, biocompatível, osteocondutor, biodegradável e bioativo.^{37,33,36} Apesar da elevada fragilidade mecânica, limitação ao seu uso, as características referidas fazem com que o CPC se torne um biomaterial bastante próximo do descrito como ideal.⁹ O CPC pode ainda ser reforçado com a adição de vários elementos e agentes biofuncionais.⁹ A combinação com o colagénio melhora as propriedades mecânicas e aumenta a adesão celular, diferenciação e expressão de marcadores osteogénicos como Runx-2 e fosfatase alcalina.³³ Outro elemento que também pode reforçar a composição do CPC é o quitosano.⁹ Outros exemplos são os agentes biofuncionais como RGD, fibronectina, FEPP (proteína tipo fibroblasto modificado), Geltrex (forma solúvel de matriz da membrana basal, usado como matriz extracelular 3D) e concentrado de plaquetas.^{11,26} Estes contribuem para a melhoria das propriedades biológicas.^{11,26}

4.3.1.3 – SCAFFOLDS POLIMÉRICOS

Os materiais poliméricos podem ser divididos, de acordo com a sua origem, em materiais: naturais e sintéticos.^{34,36} Entre os polímeros naturais, os mais usados são o colagénio, alginato, ácido hialurónico e quitosano.^{34,36}

O alginato é um heteropolissacarídeo natural isolado a partir de algas marinhas castanhas.¹⁵ É um polímero natural biocompatível, biodegradável, solúvel em água e com um comportamento de gelificação suave à temperatura ambiente.^{8,15,36} Além disto, o alginato apresenta baixo custo e baixa imunogenicidade.⁸

Relativamente ao colagénio, é sabido que é o principal componente orgânico do tecido ósseo.³⁶ É também biocompatível, biodegradável e tem a capacidade de estimular a

proliferação e diferenciação de células.³⁶ Este biomaterial é geralmente usado como base, sendo posteriormente adicionados polímeros e biomoléculas de forma a melhorar a osteoindução.³⁶

O ácido hialurónico é um polímero hidrofílico, não imunogénico, que pode ser encontrado no citoplasma de células osteoprogenitoras e tem sido demonstrado o seu potencial como material para *scaffold* em aplicações regenerativas do tecido ósseo.³⁶ Tem sido usado em combinação com outros materiais ou fatores para aumento do potencial osteogénico.³⁶

Outro polímero usado é o quitosano, sendo este biodegradável, biocompatível, antibacteriano e com propriedades de bioadesão.³⁶ As propriedades osteogénicas podem ser modificadas através da adição de outros polímeros, células ou fatores indutores ósseos.³⁶

Existem outros polímeros naturais disponíveis como o hidrogel peptídeo e a seda, que também apresentam biocompatibilidade e biodegradabilidade, e o caso da fibroína de seda que apresenta boas propriedades mecânicas.^{36,38}

No que diz respeito a polímeros sintéticos existem, globalmente, os poliésteres e os co-polímeros.³⁶

Os poliésteres alifáticos como o ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático (PLA) e policaprolactona (PCL) são os mais usados na engenharia de tecidos.^{34,36} Os seus produtos de degradação estão presentes no corpo humano e por isso podem ser eliminados por vias metabólicas naturais.³⁴ Estes são geralmente usados em combinação com outros elementos como a hidroxiapatite (HA) que permitirão uma melhoria das propriedades mecânicas e biológicas dos *scaffolds*.³⁶

Os co-polímeros, por sua vez, são atrativos pelo facto de apresentarem propriedades físico-químicas altamente controláveis.³⁶ A gelificação, densidade, propriedades mecânicas e biodegração podem ser controladas através da regulação do peso molecular, das estruturas e das ligações degradáveis.³⁶ Como exemplo deste tipo de polímeros sintéticos referencia-se o co-polímero tribloco mPEG-PCL-mPEG, que contém PCL, material aprovado pela FDA, que apresenta fácil aplicação clínica e biodegradação, e ainda mPEG que permite uma melhoria do ângulo de contacto e da hidrofobia (desfavoráveis no PCL).³¹ Outro exemplo é o biocomposto formado pelo tribloco referido anteriormente com adição da hidroxiapatite que irá tornar o co-polímero mais hidrofílico.³¹ Este biocomposto terá maior porosidade, maior resistência mecânica, permitirá maior proliferação celular e terá ainda melhores propriedades osteocondutoras e osteoindutoras devido á presença da componente cerâmica.³¹

4.3.1.4 – SCAFFOLDS COMPÓSITOS

Os *scaffolds* compósitos são fabricados pela combinação de dois ou mais materiais diferentes, como cerâmicas e polímeros, tirando proveito das vantagens de ambos materiais, e assim visando obter uma sinergia nas propriedades finais.^{34,36} Por exemplo, considera-se a combinação de uma cerâmica à base de fosfato de cálcio para melhorar a integridade mecânica e com um material polimérico, para a indução da bioatividade.³⁴

Smith e colaboradores, em 1963 desenvolveram Cerosium®, que consiste num scaffold compósito cerâmico-plástico para uso em próteses mandibulares.³⁶ É constituído por uma mistura de alumina, sílica, carbonato de cálcio e carbonato de magnésio, apresentando força e elasticidade semelhante ao osso.³⁶

Assim, existem vários tipos de combinações possíveis e viáveis.

Os *scaffolds* compósitos metálico/polímero apresentam propriedades físicas e químicas com papel crucial na osteointegração.³⁶ Estes podem ser implantes metálicos com revestimento de poliéster ou implantes de biodegradação parcial como o desenvolvido por *Laagoa et al.*³⁶ Este era constituído por titânio, ácido polilático, hidroxiapatite e carbonato de cálcio, conseguindo-se obter estabilidade mecânica e biocompatibilidade.³⁶

Também será possível a combinação de *scaffolds* metálicos com cerâmica, cujas características de adesão, propriedades mecânicas e bioatividade são favoráveis.³⁶ Outra possibilidade é a combinação de polímeros e cerâmicas.³⁶ *Kaplan e colaboradores* combinaram o fosfato de cálcio com poliésteres para a produção de um *scaffold*.³⁶ Neste tipo de *scaffold* compósito, vários estudos *in vitro* demonstraram a viabilidade e proliferação celular, bem como a capacidade de promover a diferenciação osteogénica.³⁶

4.3.2 BIOMODULADORES

As citocinas funcionam como agentes biomoduladores da função celular, e constituem outro componente essencial na engenharia de tecidos para a regeneração óssea, compreendendo biomoléculas ou fatores de crescimento integrados no *scaffold*.²⁹ Este componente controla e promove a osteogénese, a regeneração do tecido ósseo e a formação de matriz extracelular, através do recrutamento e diferenciação de células osteoprogenitoras, na linhagem específica.³⁴ Além disso, têm como funções aumentar a proliferação celular, o *homing* de células mesenquimais em circulação, a diferenciação das células em osteoblastos, entre outras atividades biológicas.¹⁸

Como exemplos de fatores existem o NELL-1, TGF- β , BMP, IGF, FGF, VEGF entre outros.³⁴

O fator de crescimento NELL-1 apresenta propriedades vasculogénicas, pró-angiogénicas e de osteoindução.¹⁶ A sua utilização inibe a adipogénese e torna a resposta osteogénica mais específica.^{16,39} Além de promover a expressão de BMPs, que favorecem a regeneração óssea, o uso do fator NELL-1 assegura uma proliferação apropriada e um microambiente osteoindutor.⁴⁰ A sua presença contribui também para uma sobre-regulação da expressão dos genes Runx2 e Ocn.⁴⁰

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são um grupo de glicoproteínas reguladoras, membros da família do TGF- β , que estimulam a diferenciação de células estaminais mesenquimais em osteoblastos e condroblastos.⁴¹ O nome BMP foi dado em 1965 por *Urist* e colaboradores.⁴¹ O genoma humano codifica várias BMPs, estando essas divididas em grupos: o primeiro grupo, com as BMP-2 e BMP-4; o segundo com BMP-3 e BMP-3B, o terceiro com BMP-5, BMP-6, BMP-7 e BMP-8 e por último, a subfamília que inclui GDF-5, GDF-6 e GDF-7.⁴¹ A função das BMPs é a regulação das atividades mesenquimais e osteoblásticas, como a adesão celular, diferenciação, atividade da fosfatase alcalina, mineralização e quimiotaxia.⁴¹ Relativamente à proteína BMP-2, esta apresenta um efeito poderoso no desenvolvimento e regeneração óssea.⁴² Este fator induz uma elevada densidade óssea, sendo o principal fator osteoindutor aprovado pela FDA.^{16,39} Ainda assim, o uso desta proteína acarreta como efeitos indesejáveis o edema no local de implantação, a ativação de osteoclastos, ocorrência de diferenciação adipogénica e o risco de formação de cisto ósseo.^{39,40}

O fator de crescimento fibroblástico (FGF) desempenha um papel crucial em múltiplos processos: diferenciação, proliferação e sobrevivência celular.⁴³ A família FGF

inclui 24 membros.⁴³ O FGF-4 é o primeiro membro detectado durante o desenvolvimento embrionário, sendo um fator autócrino e/ou parácrino requerido em múltiplos eventos celulares na embriogénese.⁴³ Além disso, este fator aumenta a proliferação de células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea.⁴³ O FGF-2, FGF-5 e FGF-6 são sobre-regulados no início da formação do calo ósseo e mantêm os seus níveis elevados durante o processo de cicatrização óssea.⁴² O FGF-2, por si só, estimula a proliferação das células periosteais, osteoprogenitoras, condroprogenitoras, aumentando a formação do calo.⁴²

Outros fatores apresentam também um papel importante no processo de regeneração óssea. O IGF ajuda a migração de diferentes células ósseas, o VEGF pode ser usado para induzir uma rede complexa de vasos sanguíneos ao longo do *scaffold* e os fatores IFN- γ e TNF- α induzem a apoptose das células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea.³⁴

Neste componente da engenharia de tecidos existem ainda vias de sinalização como a via do fator de crescimento derivado plaquetas (PDGF) que está envolvida nos processos de cicatrização em vários tecidos, incluindo o osso.⁴² Os ligandos e receptores desta via são expressos nos osteoblastos e células estaminais mesenquimais.⁴² Outra via de sinalização é a via Notch, que regula o desenvolvimento do esqueleto, aumentando a diferenciação de células osteoprogenitoras e a massa de osso trabecular.⁴² Na cicatrização de uma fratura, a sinalização Wnt também contribui significativamente para o processo.⁴²

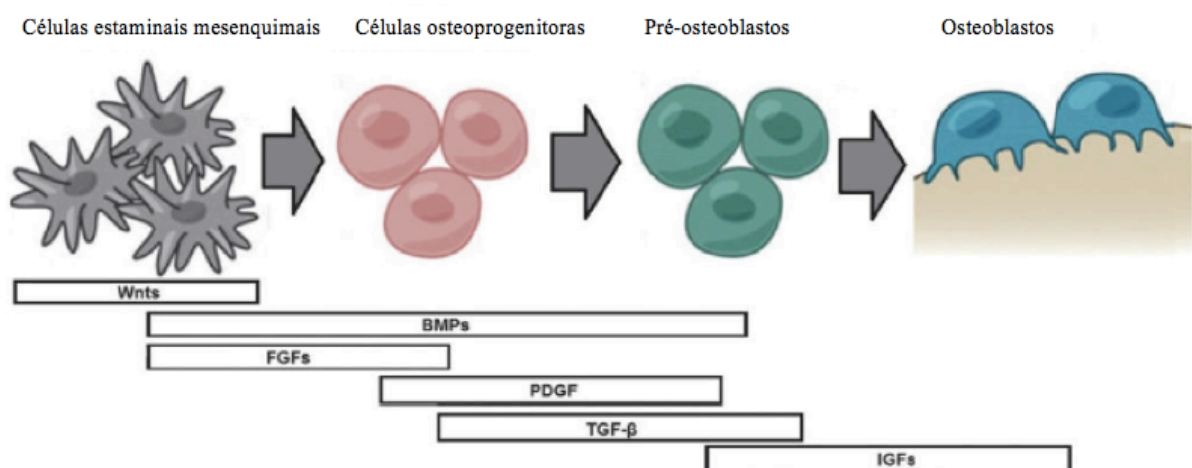


Fig.2 Diferenciação de células osteoprogenitoras e o papel dos fatores de crescimento durante a progressão temporal. (Adaptado de *Polo-Corrales, L. 2014*)³⁶

4.3.3 CÉLULAS

Na engenharia de tecido ósseo, as células têm a função de se diferenciarem em osteoblastos que, por sua vez, produzirão a matriz extracelular e irão secretar as proteínas específicas do osso.⁴ As células estaminais podem ser guiadas para a diferenciação osteogénica e distribuídas via *scaffold*, tendo estas demonstrado imenso potencial para a regeneração óssea.^{37,12}

As células estaminais são um tipo especial de células, pois, possuem a capacidade de se autorregenerarem e de se diferenciarem em diferentes tipos de células de vários tecidos e assim regenerá-los.³⁵

Estas células indiferenciadas podem ser classificadas em: totipotentes, pluripotentes, multipotentes, e unipotentes.³⁵ As células totipotentes tem capacidade de se diferenciarem nos 216 tipos de tecidos do corpo humano, incluindo a placenta e anexos embrionários.³⁵ No caso das células pluripotentes e multipotentes, a diferenciação em células de tecidos extraembrionários não é possível.³⁵ As células unipotentes são aquelas em que a diferenciação só é possível para um único tipo de tecido.³⁵ As células destes dois últimos tipos descritos são considerados células somáticas e podem ser classificadas em hematopoiéticas, queratinócitas, adipócitas e mesenquimais.³⁵

No âmbito da medicina regenerativa, existem dois grandes tipos de recursos celulares usados: células estaminais embrionárias e células estaminais adultas.⁹

4.3.3.1 – CÉLULAS ESTAMINAIS EMBRIONÁRIAS

As células estaminais embrionárias (ESC) são células pluripotentes que podem ser isoladas da massa interna do embrião pré-implantado durante o estado de blastocisto, e assim constituem um recurso celular alogénico na engenharia de tecidos^{7,23,29} Este tipo de células expressa níveis elevados de antigénios de superfície característicos de células estaminais mesenquimais: CD44, CD49a, CD73 e CD105.²⁸ Um exemplo de células estaminais embrionárias, são as células do gérmen embrionário que derivam da crista gonodal do feto com 5-10 semanas, sendo estas que darão posteriormente origem aos óvulos e esperma no adulto.²³

As células tipo osteoblastos pretendidas na engenharia do tecido ósseo surgirão através da indução osteogénica de células estaminais mesenquimais, derivadas de células estaminais embrionárias.²⁸ Esta indução osteogénica poderá ocorrer pela diferenciação

osteogénica direta de corpos embrióides num meio osteogénico durante vinte e cinco dias, ou após a co-cultura de corpos embrióides com células ósseas primárias, catorze dias antes do transplante para implantação subcutânea.²⁸

Uma das principais características das células estaminais embrionárias é a capacidade elevada de proliferação em estado indiferenciado, isto é, estas células conseguem-se autorrenovar.^{4,9,28} Além disso, este tipo de recurso celular é acessível, evita um segundo local cirúrgico e as células são relativamente homogéneas.^{9,28}

Contudo, o uso destas células acarreta diversos problemas éticos relacionados com a necessidade de destruir um embrião humano para o isolamento das mesmas, e com instabilidade genómica, risco de tumorigénese e rejeição imune associadas.^{2,7,18} Além disso existe uma grande dificuldade em controlar a diferenciação destas células. Tal dificuldade pode culminar no aparecimento de um teratoma após a implantação, isto é, um tumor constituído por tecidos somáticos diferenciados das camadas endoderme, ectoderme e mesoderme.^{4,18,44} É assim importante referir que este tipo de células só pode ser utilizado após a diferenciação total num tipo celular, não restando quaisquer células indiferenciadas que possam contribuir para o desenvolvimento de um teratoma.³⁵

Deste modo, o uso destas células implicará ultrapassar dois desafios: criar técnicas que possam remover com segurança as populações celulares com risco tumorigénico, e conseguir a reprodução celular deste tipo de células na via osteogénica.⁴⁴

Apesar das características favoráveis e conhecimento das desvantagens das células estaminais embrionárias, o uso destas ainda se encontra limitado devido á falta de entendimento dos requisitos para a diferenciação.⁴⁴ Ainda assim, as células osteogénicas derivadas de células estaminais embrionárias humanas representam um avanço significativo do conceito celular da engenharia de tecidos.⁴⁴ Estas servirão de recurso para o estudo de patologia ósseas bem como uma fonte inesgotável de precursores osteogénicos para a regeneração óssea, desde que se resolvam os problemas de rejeição imune do hospedeiro e os riscos de desenvolvimento tumoral.^{29,44}

4.3.3.2 – CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS ADULTAS

As células estaminais mesenquimais adultas foram alvo de investigação para a engenharia do tecido ósseo em 1992 por *Caplan et al.*, que recorreram à combinação de MSC com um *scaffold*, pela primeira vez.³⁵

Estas células residem em vários tecidos como a polpa dentária, ligamento periodontal, perióstio, músculo esquelético, medula óssea, tecido adiposo, entre outros.^{6,25,45} Além de serem encontradas em diversos tecidos, estas células, sendo multipotentes, tem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares como osteoblastos, condrócitos e adipócitos.^{25,29,35}

É sabido que a maioria dos tecidos relevantes na reparação cirúrgica são de origem mesenquimal. Assim, dada a origem, multipotência, variedade de recursos, autorrenovação e capacidade de reparação de tecidos danificados, as MSC são as mais usadas clinicamente na reparação de tecidos.^{18,25,29}

A utilização destas células implica três etapas principais: isolamento, purificação e expansão *in vitro* sendo esta última essencial para a obtenção de um número adequado de células de elevada qualidade.⁵

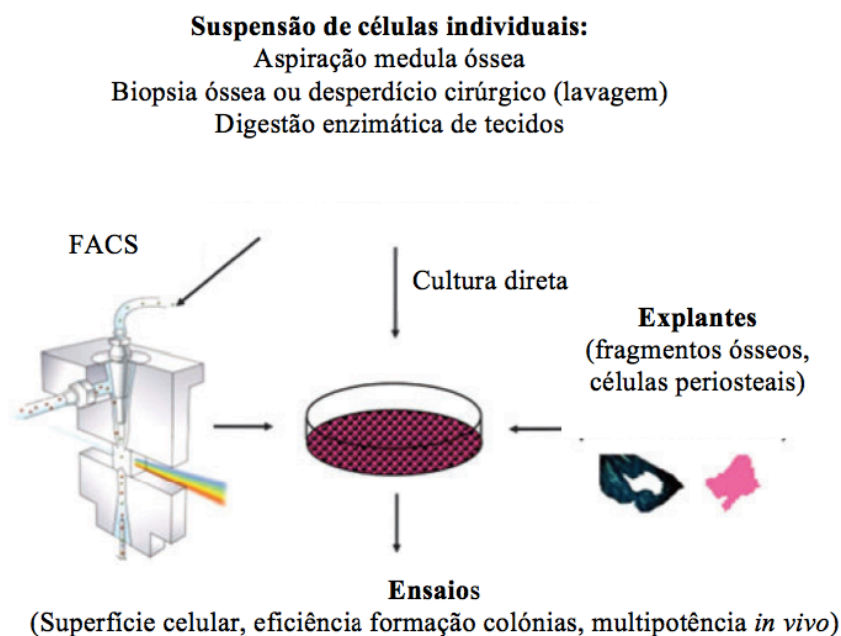


Fig.3. Métodos de isolamento e caracterização de potenciais recursos celulares para regeneração óssea. (Adaptado de *Robey, PG.2011*)⁴

Relativamente às suas características, as MSC adultas são células heterogéneas, isto é, apenas uma pequena porção das células são consideradas células estaminais com potencial de diferenciação osteogénica, aderentes, alongadas e com capacidade de auto-renovação.^{9,45}

O uso destas células tem como vantagens a eliminação do procedimento de colheita óssea de um segundo local, o baixo risco de transmissão de doenças e ainda a presença de imunorregulação, isto é, existe um baixo risco de rejeição auto-imune.¹⁵

A definição destas células é feita através de um conjunto de critérios. São consideradas células estaminais mesenquimais adultas aquelas que apresentem aderência à placa de cultura em condições de cultura *standard*, que tenham capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, que expressem marcadores de superfície característicos como CD73, CD90 e CD105 e ainda que não apresentem expressão dos marcadores de superfície hematopoiéticos CD14, CD11b, CD34, CD79 α , CD45, antigénio leucocitário humano (HLA) e complexo de histocompatibilidade major II (MHC II).^{18,45}

Para regeneração óssea, estas células irão sofrer diferenciação osteogénica que pode ser induzida pela cultura de células na presença de dexametasona, insulina, indometacina e ainda pelo uso de proteínas biológicas da matriz extracelular no *scaffold*. A diferenciação é também regulada pelo padrão espacial, rigidez e composição da matriz extracelular.⁴⁵

Apesar dos critérios de definição de MSC e características comuns, existem diferenças entre as diversas MSC consoante a origem tecidual. Posteriormente serão descritos alguns tipos de MSC de diferentes locais.

4.3.3.2.1 – CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA

A primeira descrição das células estaminais derivadas da medula óssea (BMSC) foi realizada por *Friedenstein*, sendo este o primeiro a isolá-las pela capacidade das mesmas aderirem à superfície das placas de cultura, ao contrário das células hematopoiéticas, que não apresentam tal capacidade.^{4,18,25}

As BMSC são células estaminais mesenquimais não hematopoiéticas, que têm origem na mesoderme e correspondem a 0,01% do número total de células nucleadas da medula óssea.^{14,38,46,47} Estas células caracterizam-se pela sua forma fusiforme, tipo fibroblasto, e pela expressão de marcadores de superfície como CD106, CD29, CD73, CD90, CD105 CD166, CD44, CD13, CD49 α , CD63, CD146 e ainda Stro1.^{4,46,48} É ainda característica a ausência de expressão de marcadores hematopoiéticos como CD34, CD45, CD14 e CD11b, e endoteliais

como CD31, CD36 e CD14.^{4,45,48} As BMSC são ainda caracterizadas pela sua multipotência, autorrenovação, capacidade de libertarem naturalmente o fator de crescimento endotelial vascular, e pelo efeito imunomodulador.^{28,49,50}

Apesar das vantagens apresentadas, o uso de BMSC apresenta algumas desvantagens. A colheita das células é feita por aspiração a partir da crista ilíaca de modo a isolar as células do estroma da medula óssea.^{23,32,46} Tal procedimento invasivo apresenta alguma dificuldade, dor e possíveis complicações associadas.^{33,16,18} Além disso, o rendimento celular final de uma aspiração de medula óssea é reduzido sendo de extrema importância a expansão *in vitro*, o que limita o uso destas células em situações de emergência.^{16,48,39} Outra desvantagem cursa com a multipotência destas células. Ainda que multipotentes, a capacidade destas células proliferarem e se diferenciarem em vários tipos celulares diminui com a idade, bem como pela presença de patologias associadas.^{2,16,26}

Na engenharia do tecido ósseo, as BMSC, após colheita, são isoladas, expandidas *in vitro* e combinadas com *scaffolds* para a reparação dos defeitos ósseos.³⁰ A colheita tem diversos métodos possíveis: aspiração a partir da crista ilíaca, biopsias, colheita através de desperdícios cirúrgicos, tratamento enzimático, explante de cultura e através do sangue periférico.⁴ A aspiração a partir da medula óssea é um método menos invasivo que as biopsias, mas muitas vezes implica a contaminação pelo sangue periférico, quando ocorre aspiração de grandes vasos.⁴ O método mais invasivo é o da biopsia em que após a colheita do material, tal como o recurso dos desperdícios cirúrgicos, são feitas lavagens repetidas que libertam grande número de células.⁴ O tratamento enzimático é realizado para obtenção de células de osso trabeculado de maior maturação.⁴ O explante de cultura é feito a partir de fragmentos ósseos, com ou sem pré-tratamento com colagenase e o recurso ao sangue periférico baseia-se na existência de progenitores osteogénicos no sangue, mas tal é raro nos humanos.⁴ Quanto ao isolamento pode ser feito por várias técnicas: separação de células ativadas por fluorescência (FACS), separação de células ativadas magneticamente (MACS), centrifugação com gradiente e ainda podem ser isoladas através da adesão seletiva.⁴⁵

O seu sucesso na aplicação clínica é conhecido, desde 1950, no tratamento de leucemias, e desde então tem sido cada vez mais estudadas novas aplicações.³⁸ Uma vez que são as células estaminais mais conhecidas e melhor caracterizadas, estas são um recurso autólogo, o principal recurso celular na engenharia do tecido ósseo, sendo consideradas o *gold standard*.^{5,9,38}

4.3.3.2.2 – CÉLULAS ESTAMINAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSO

As células estaminais derivadas do tecido adiposo (ASC) são obtidas por lipoaspiração, procedimento que envolve a digestão do tecido adiposo pela collagenase, e a centrifugação subsequente das células obtidas (do estroma vascular) que contem diversas populações celulares distintas (incluindo as células estaminais do tecido adiposo).^{18,45} A colheita é um procedimento simples, fácil, repetível, sem desconforto ou complicações, existindo ainda um elevado rendimento final.^{18,29} O isolamento das células pode ser feito com base no perfil de expressão de marcadores antigénicos de superfície usando FACS ou MACS.⁴⁵ O número de células disponíveis diminui com a idade bem como a produção de citocinas pró-angiogénicas.^{28,48} Contudo, é possível manter as células *in vitro* por longos períodos, mas tal acarreta um risco acrescido de contaminação.¹⁸ Quanto ao potencial osteogénico, este parece não apresentar qualquer alteração com o aumento da idade.¹⁸

Estando categorizadas nas células estaminais mesenquimais, as ASC apresentam carácter de adesão à superfície das placas de cultura e a capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos, miócitos e osteoblastos.^{45,42,51} As células estaminais adipócitas expressam marcadores CD36, CD34 e não expressam os marcadores de superfície CD106, CD45, CD235a e CD31.⁴⁸

O uso destas células poderá ser autólogo, mas limitado em situações de emergência, pois é necessária a expansão *in vitro* para a obtenção de um número de células suficientes para utilização clínica.^{16,29}

Historicamente, as células estaminais derivadas do tecido adiposo foram isoladas de ratos por *Rodbell* em 1960 e mais tarde, em 2001, *Zuk et al.* isolaram-nas a partir de gordura humana.⁴⁸

4.3.3.2.3 – CÉLULAS ESTAMINAIS DOS TECIDOS DENTÁRIOS

Relativamente às células estaminais derivadas dos tecidos dentários, estas têm a capacidade de formar dentina, cimento e ligamento periodontal. Contudo, o tamanho e forma dos cristais dos minerais bem como a organização mineral da matriz e as propriedades mecânicas são muito diferentes no osso, dentina e cimento, encontrados no tecido ósseo e estruturas dentárias.⁴ Ainda assim estas células obtidas a partir de tecidos dentários têm sido consideradas um potencial recurso na engenharia de tecido óssea.²⁵

Diversos tecidos dentários são usados para a obtenção de células estaminais desde a polpa dentária até à gengiva.

As células estaminais derivadas da polpa dentária (DPSC) são células multipotentes com a mesma origem embrionária que o osso craniofacial.³⁸ Estas apresentam um potencial de colonização e de proliferação superior às células derivadas da medula óssea, e o potencial osteogénico pode ser aumentado através da adição de carga mecânica e fatores osteogénicos.^{4,38} Ainda que com características de proliferação superiores às BMSC, as células derivadas da polpa dentária apresentam expressão génica semelhante às BMSC, em 4000 genes humanos.²⁵ Estas células também apresentam expressão de marcadores ósseos como a sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteonectina e colagénio tipo I e II, mas não expressam sialofosfoproteína dentinária que é uma proteína precursora específica dos odontoblastos.²⁵ Ainda assim, não existe nestas células capacidade osteoindutora mas também não são detetados sinais de senescência, com a cultura por longos períodos.²⁵

A obtenção destas células pode ocorrer no momento da extração dentária e posterior armazenamento para uso futuro.⁵ Quanto ao isolamento, este é efectuado com tratamento enzimático de tecidos pulpaes humanos, havendo formação de unidades formadoras de colónias (CFU), sendo o valor de CFU formadas superior ao das BMSCs.²⁵

Apesar de serem células menos estudadas, as DPSC, em condições favoráveis, são capazes de produzir depósitos minerais. A sua aplicação em estratégias de regeneração óssea parece resultar na formação de um osso mais compacto e poroso, que com o uso de BMSC.^{5,25,38}

Atendendo ao ligamento periodontal, existe a possibilidade de obter, a partir deste tecido, células estaminais multipotentes.³ Este é um recurso acessível no ambiente oral e

também disponível em amostras de tecidos descartados.¹⁵ As células estaminais derivadas do ligamento periodontal (PDLSC) expressam marcadores de MSC como Stro1 e CD44, e têm a capacidade de diferenciação em células semelhantes a cementoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblastos, *in vitro* e *in vivo*.^{3,25} Comparando com as BMSC, estas células apresentam um crescimento mais rápido e uma melhor capacidade colonização.²⁵

Outro tipo de recurso muito acessível são os dentes decíduos exfoliados que providenciam células estaminais suficientes para a aplicação clínica na regeneração óssea.⁴⁹ A coroa de um dente decíduo exfoliado contém polpa viva remanescente que por sua vez contém células estaminais.⁴⁹ As células estaminais derivadas dos dentes decíduos exfoliados (SHED) são uma população heterogénea com morfologia fibroblástica que tem capacidade de reconstruir osso trabecular e inibir a atividade osteoclástica.^{25,49} Estas células estaminais que existem nos remanescentes pulpaes são multipotentes e capazes de formar colónias aderentes. Dada a característica osteoindutora, os seus clones parecem induzir a formação óssea através da organização de uma matriz responsável pelo recrutamento de células osteogénicas.²⁵ Relativamente à expressão, tal como as MSC, as SHED expressam marcadores típicos como Stro-1 e CD146 e igualmente às DPSC, não expressam sialofosfoproteína dentinária.²⁵ Outra característica destas células é a elevada capacidade de proliferação, sendo esta superior que a das DPSC e BMSC. Verifica-se também uma atividade imunomoduladora, de forma superiores à das populações de células estaminais derivadas da medula óssea.^{25,49}

Outros tecidos possíveis para recurso celular são a gengiva, papila apical e o folículo dentário. A gengiva é um meio muito acessível no ambiente oral e a partir de desperdícios biológicos, contendo células estaminais com capacidade de diferenciação *in vivo* e *in vitro*.¹⁵

As células estaminais derivadas da papila apical (SCAP) podem ser obtidas a partir deste tecido, localizado nos tecidos moldes à volta do ápice radicular dos dentes permanentes em desenvolvimento, sendo estas células precursoras da polpa radicular.²⁵ Estas células tem capacidade de se diferenciarem em células de diversas linhagens celulares (osteogénica, odontogénica, adipogénica e neurogénica) e tem também capacidade de se diferenciarem em complexos pulpo-dentinários com vascularização funcional.²⁵ As SCAP representam uma população em estado precoce de diferenciação.²⁵

O folículo dentário corresponde a uma estrutura ectomesenquimal que envolve o esmalte e a papila dentária do germen do dente em desenvolvimento, antes da erupção.²⁵

Relativamente às células precursoras do folículo dentário, estas formam um número baixo de colónias com morfologia típica fibroblástica.²⁵ As células apresentam multipotência e elevada heterogeneidade.²⁵ Estas células foram usadas na regeneração óssea de defeitos ósseos cranianos de tamanho crítico em ratos e, quando transplantadas, promoveram a diferenciação óssea.²⁵

4.3.3.2.4 – CÉLULAS ESTAMINAIS PERIVASCULARES

As células estaminais mesenquimais perivasculares são encontradas nos tecidos vascularizados e exibem uma identidade definida de CD146+, NG2+, PDGF-R β , CD34-, CD45-, CD31- e CD56 -.^{16,52,40} Estas células exibem também uma potencia definida no que diz respeito à duplicação da população celular, condrogénese, miogénese e adipogénese *in vivo*, bem como osteogénese estimulada por BMP-2, *in vivo*.⁴⁰

Dada a localização variada de tecidos vascularizados, estas células são abundantes no organismo, sendo fácil a sua colheita.¹⁶ Ainda assim, o recurso preferencial é o tecido adiposo devido à sua localização superficial e abundância.^{16,52} Através de um procedimento de lipoaspiração estima-se que menos de 200mL de colheita sejam suficientes para a aplicação clínica de células perivasculares, uma vez que este volume, estima-se que renda cerca de 31 milhões de células, não havendo diferenças de rendimento com a idade.⁵² Contudo, existe uma maior prevalência de células estaminais perivasculares nos homens, sendo neste género maior a diferenciação osteogénica das mesmas.⁵²

Morfologicamente as células estaminais perivasculares são semelhantes às células estaminais mesenquimais, no que diz respeito ao crescimento, expressão de marcadores e multipotencia.⁵² Relativamente às ASC, estas células secretam mais fatores pró-angiogénicos como o fator de crescimento fibroblasto básico e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).⁴⁰

As células estaminais perivasculares correspondem a 39,6% da fração vascular do estroma (FEV) do tecido adiposo e podem ser divididas em dois tipos: perícitos e células adventícias.⁵³ Os perícitos encontram-se nos capilares e microvasos, e apresentam uma origem primitiva de MSC, partilhando fenótipo e expressão de marcadores.^{16,40} Estes apresentam multipotência e secretam fatores angiogénicos como VEGF e FGF-2. Estando associados anatomicamente às células endoteliais, os perícitos mantem as funções das mesmas. Quanto ao seu potencial para a regeneração óssea, os perícitos tem a capacidade de se diferenciarem em osteoblastos dada a sua multipotência.^{16,40} Ainda assim, *Zangh X. et al*,

em 2011 isolaram pericitos do pâncreas para mostrar o seu potencial osteogénico.⁴⁰ Apesar do pâncreas não estar relacionado tipicamente com a formação óssea, tal serviu para mostrar que, independentemente da localização do tecido vascularizado, os pericitos tem potencial para a osteogénese.⁴⁰ Tal foi evidenciado pela expressão dos genes Runx-2, Osx-2, Ocn e pela mineralização da cultura celular estabelecida *in vitro*.⁴⁰ Relativamente às células adventícias, estas encontram-se na túnica adventícia dos grandes vasos, têm expressão dos marcadores típicos de MSC e, tal como elas, apresentam multipotência.¹⁶

A atratividade deste recurso celular cursa então pela pureza, viabilidade e abundância existentes. Em relação aos recursos de células estaminais convencionais, estas têm diversas vantagens como a possibilidade de uso após triagem, uma vez que dispensa expansão *in vitro*. Tal traduzir-se-á num menor tempo requerido e prevenirá as complicações associadas à expansão.¹⁶ Outras vantagens referidas são a pureza, abundância e o efeito positivo na vascularização, evidenciado pela maior secreção de VEGF, pelo aumento significativo do número e tamanho de vasos sanguíneos, bem como pelo facto de permitirem o tratamento de defeitos ósseos em condições de pobre fluxo sanguíneo (e.g., feridas diabéticas e defeitos ósseos crónicos).¹⁶

4.3.3.2.5 – CÉLULAS ESTAMINAIS PERINATAIS

As células perinatais são células derivadas do líquido amniótico, placenta, membranas fetais ou cordão umbilical, sendo facilmente isoladas dos tecidos extraembrionários uma vez que são geralmente descartados após o nascimento.^{2,23} Dada a sua localização, este recurso evita problemas éticos pelo que a colheita e manipulação são fáceis, e sem quaisquer danos para o bebé ou para a mãe.² Estas apresentam tanto propriedades de células estaminais embrionárias como células estaminais adultas.^{2,23} Relativamente às suas características, estas células tem a mesma origem que o osso craniofacial e apresentam capacidade de proliferação e multidiferenciação *in vitro* e *in vivo*.² Tal como as células estaminais embrionárias, estas tem boa capacidade de autorrenovação, mas apresentam baixa imunogenicidade e não há risco de formação de teratomas.^{2,23} Existem várias células estaminais perinatais de acordo com o tecido utilizado como recurso.

O líquido amniótico é um líquido protetor localizado dentro do saco fetal durante o estado gestacional.² Anker *et al.* demonstraram que o líquido amniótico contém células com a morfologia fibroblástica que são positivas para marcadores mesenquimais CD90, CD105,

CD73 e CD166 e negativas para marcadores hematopoiéticos, como CD45, CD34 e CD14.² *Coppi et al.* isolaram com sucesso, do líquido amniótico, uma subpopulação de células estaminais multipotentes através da separação das células ativadas por fluorescência.² Estas células isoladas apresentaram morfologia arredondada uma semana após o isolamento, alterando para forma fibroblasto na segunda semana.² Além disso, as células apresentavam expressão de alguns marcadores pluripotentes SSEA4 e OCT4 e também marcadores mesenquimais típicos, o que traduz o facto de serem células de um estadio intermediário, entre embrionárias e adultas.² Outras características evidenciadas foram a capacidade elevada de autorrenovação e o tempo de duplicação de 36 horas. O interesse nestas células cursa com a sua multipotência, podendo formar osso e suportar a hematopoiese.⁴

A membrana amniótica é uma membrana fetal íntima da placenta que limita a cavidade amniótica e também assegura o normal crescimento e desenvolvimento do feto durante a gestação.² Geralmente o recurso usado é proveniente de material descartado ao nascimento e podem ser isoladas dois tipos de células através da digestão enzimática: as células epiteliais amnióticas e as células estaminais mesenquimais amnióticas.² As primeiras exibem uma morfologia de epitélio arredondado e desenvolvem-se a partir da região central do epiblasto, criando uma camada única adjacente ao líquido amniótico.² Relativamente às células estaminais mesenquimais amnióticas estas tem morfologia fibroblástica, residem na matriz de estroma da membrana amniótica e são diferenciadas a partir de células da mesoderme da somatopleura.²

As células derivadas do âmnion, tal como as células derivadas do líquido amniótico, são consideradas intermediárias de células embrionárias e adultas, expressando marcadores típicos de células pluripotentes como OCT4, SOX2, SSEA4, SSEA3 bem como marcadores típicos de células mesenquimais.² O uso destas para a regeneração óssea baseia-se no seu potencial de diferenciação em linhagens múltiplas e na capacidade imunomoduladora.²

A membrana coriônica da placenta humana é uma fonte rica de células estaminais.² Tal como as anteriores são células com fenótipo intermédio de células mesenquimais adultas e células embrionárias.² Ainda assim, estas células tem maior capacidade de autorrenovação e maior potencial de diferenciação que as células mesenquimais adultas. Quando usadas *in vivo*, as células estaminais derivadas do córion tem efeito terapêutico em lesões do fígado e na osteogénese imperfeita.²

Outro recurso perinatal utilizado é o cordão umbilical, que conecta o feto à placenta, durante a gravidez.² Anatomicamente este é constituído por duas artérias umbilicais e uma veia umbilical, estando estes componentes envolvidos pela mucosa conetiva de matriz

enriquecida com proteoglicano – gelatina de Wharton's.² As células estaminais do cordão umbilical (UCMSC) podem ser isoladas de diversas partes do cordão como a artéria umbilical, veia umbilical, gelatina de Wharton's ou sangue.² Estas células são jovens e têm o potencial de se diferenciarem em adipócitos, osteoblastos, condrócitos, e outras linhagens celulares^{26,30,32}. O procedimento de colheita não implica métodos invasivos, até porque o cordão umbilical é um desperdício biológico e assim, os custos associados à utilização deste recurso são relativamente reduzidos.^{37,33,32} Outras características vantajosas destas células são a boa capacidade de expansão, a elevada plasticidade e flexibilidade, imunorrejeição mínima, ausência de formação de teratoma, sendo eliminados os problemas éticos^{37,33,32}. Quanto à expressão de marcadores, as populações isoladas expressam os típicos mesenquimais e ainda alguns marcadores pluriportentes.^{2,33} O interesse nestas células para a regeneração de tecido ósseo cursa com a sua elevada potência, na capacidade de sintetizar uma quantidade superior de matriz mineralizada que as BMSC, excelente viabilidade, osteodiferenciação, sendo estas últimas evidenciadas pela elevada expressão de fosfatase alcalina, Runx-2, colagénio e OC.^{33,30}

As células perinatais são um recurso com vantagens tanto a nível de multipotência, plasticidade e características imuno-privilegiadas, bem como no âmbito do acesso aos tecidos biológicos, minorando o risco de problemas éticos.²

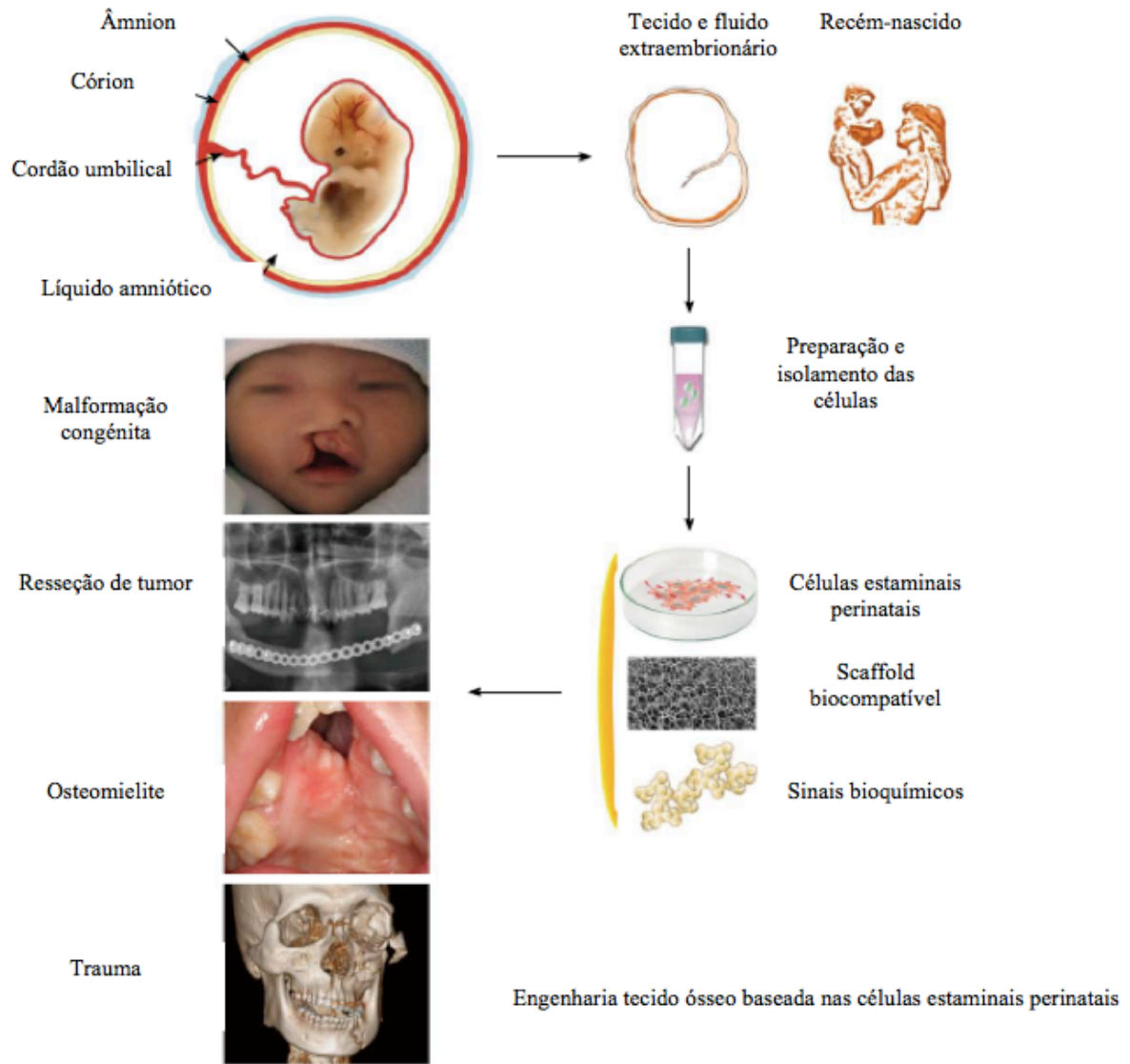


Fig.4 Esquema ilustrativo da engenharia do tecido ósseo baseada nas células estaminais perinatais. Geralmente as células estaminais perinatais são facilmente colhidas sem dano para o bebé ou mãe, e asseguram uma perspectiva mais promissora da aplicação extensiva da engenharia de tecidos. Numa abordagem mais visionária, através do controlo sofisticado das células estaminais, scaffolds biocompatíveis e sistemas de sinalização, será possível tornar a estratégia de engenharia tecidos baseada nas células estaminais perinatais numa reconstrução clínica personalizada e funcional para defeitos ósseos craniofaciais resultantes de malformações congénitas, osteomielites, trauma e resseção de tumor. (Adaptado Si, JW. 2015)²

4.3.3.3 – CÉLULAS DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA

Uma alternativa às células estaminais propriamente ditas, são as células de pluripotência induzida, que são o resultado da reprogramação de uma células somática adulta, transformando-a numa célula estaminal pluripotente (iPS).²³ Este conceito foi introduzido por *Davis et al.* quando descobriram que o gene MyoD (fator de transcrição regulador chave durante o desenvolvimento do músculo) pode converter fibroblastos embrionários (MEFs) em mioblastos através sobre-expressão ectópica.⁷

A reprogramação nuclear é então um processo em que uma célula somática é convertida em outra, através da troca do padrão de expressão de genes.⁷ Tal procedimento, requer a combinação da terapia génica e celular.³ As estratégias de produção de iPS cursam com a utilização de lentivírus, adenovírus, plasmídios, transposões e proteínas recombinantes.³ É de atender que o uso de transgenes virais pode resultar na integração dos mesmos no genoma somático, sendo que, até à data, o método mais seguro consiste na reprogramação dos fatores através do uso de proteínas recombinantes, por um período de tempo definido.^{3,7} Após a reprogramação resultam células pluripotentes do tipo células estaminais embrionárias, com sobre-expressão de quatro genes em fibroblastos humanos.⁷ Assume-se que os fatores responsáveis pela manutenção da pluripotência nas células estaminais embrionárias possam induzir a pluripotência nas células somáticas.⁷ Segundo *Takahashi e Yamanaka*, os genes responsáveis são Oct4, SOX2, Klf4 e C-myc, enquanto que para *James Thomson*, serão os genes Oct4, SOX2, Nanog e Lin28.⁷

As iPS são então células semelhantes às células estaminais embrionárias podendo, tal como estas, levar à formação de teratomas, existindo também problemas éticos e sociais na sua utilização, bem como limitações biológicas associadas à instabilidade genómica, tumorigénese e rejeição imune.^{2,4,23} A semelhança com as células estaminais embrionárias é evidente na morfologia celular, proliferação ilimitada, expressão génica, tempo de duplicação e capacidade de auto-renovação.^{3,7,11}

Estas células tem capacidade de se diferenciarem em células das três camadas embrionárias (endoderme, ectoderme e mesoderme) e em células maduras, *in vitro*.^{7,11}

Contudo, antes da utilização clínica das iPS, devem ser superados dois impedimentos existentes, relacionados com o baixo rendimento e as inserções genéticas de sequencias transgénicas.⁷ O baixo rendimento resulta do facto de as iPS evoluírem de células diferenciadas e por a reprogramação ser um processo escolástico contínuo.⁷ Quanto às

inserções genéticas, as células devem ser livres de sequências transgênicas que possam resultar em alterações genéticas graves.⁷

Deste modo, as células de pluripotência induzida são úteis em vários campos da medicina desde a descoberta de fármacos, estudo do desenvolvimento embrionário e investigação de doenças monogénicas até à medicina regenerativa, já que está demonstrado o potencial osteogénico destas células em defeitos ósseos de tamanho crítico.^{2,7}

Tabela I. Comparação de diferentes tipos de células estaminais

(Adaptado de Robey, PG., 2011)⁴

	Células estaminais adultas	Células estaminais embrionárias	Células estaminais pluripotência induzida
Origem	Protocolos específicos consoante os diferentes tecidos	Massa celular íntima do blastocisto	Transdução viral, ou plasmídeos, ou pequenas moléculas ou mRNAs de células adultas
Vantagens	Divisão moderada; Podem ser autólogas; Compromisso para tipos celulares específicos;	Divisão ilimitada; Pluripotentes; Sem alteração molecular;	Divisão ilimitada; Pluripotentes; Sem destruição do blastocisto; Autólogas
Desvantagens	Podem não ser capazes de gerar células suficientes para a terapia;	Destruição do embrião; Diferenciação incompleta; Possibilidade formação de teratomas; Alogénicas	Integração viral; Equivalentes a hESCs; Memória genética; Diferenciação incompleta; Possibilidade formação de teratomas

5. CONCLUSÃO

A regeneração óssea é essencial para a reparação de fraturas, bem como para a cicatrização de enxertos ósseos usados durante a reconstrução de defeitos após um trauma ou excisão de tumor. Com o aumento do número de pessoas idosas, é maior o número de intervenções, impondo-se a necessidade de otimizar as técnicas de regeneração óssea.

Ao longo dos tempos foram realizados estudos com diferentes técnicas e analisadas as vantagens e desvantagens das mesmas. O enxerto de osso autólogo é ainda considerado o tratamento de escolha mas esta terapêutica apresenta diversas desvantagens relacionadas com a necessidade de intervenção num segundo local para a colheita óssea.

Surge, então, a engenharia de tecidos como alternativa regeneradora. Esta técnica implica o uso de *scaffolds*, células estaminais e biomoléculas. O *scaffold* deve cumprir determinados critérios para ser aplicado e possibilitar o tratamento. As biomoléculas, por sua vez, são essenciais para regular todos os processos envolvidos. As células têm sido cada vez mais estudadas, principalmente o recurso utilizado para a sua obtenção. Existem três tipos principais: embrionárias, mesenquimais adultas e de pluripotência induzida. Todas elas apresentam características que permitem a diferenciação osteogénica. Contudo existem características que vão diferenciando os diferentes tipos e permitindo a seleção das células a utilizar. Aquelas que são consideradas *gold standard*, as BMSC, estão melhor caracterizadas mas apresentam um procedimento de colheita doloroso. Dada tal desvantagem, outros recursos vão sendo descritos de modo a facilitar a terapêutica regenerativa.

Atualmente existem já estudos em diversos modelos animais com diversos tipos celulares. Serão, no entanto, necessários mais estudos, nomeadamente na definição de um protocolo ideal para as situações encontradas, no estudo progressão do enxerto ao longo dos anos no que diz respeito à regulação da proliferação celular após a regeneração óssea.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Ferreira JR, Padilla R, Urkasemsin G, et al. Titanium-enriched hydroxyapatite-gelatin scaffolds with osteogenically differentiated progenitor cell aggregates for calvaria bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(15-16):1803-1816. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0520.
2. Si J, Wang X, Shen SGF, Si J, Wang X, Shen SGF. Perinatal stem cells : A promising cell resource for tissue engineering of craniofacial bone. 2015;7(1):149-159. doi:10.4252/wjsc.v7.i1.149.
3. Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile W V. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1310-1319. doi:10.1016/j.addr.2012.03.005.
4. Robey PG. Cell Sources for Bone Regeneration: The Good, the Bad, and the Ugly (But Promising). *Tissue Eng Part B Rev*. 2011;17(6):423-430. doi:10.1089/ten.teb.2011.0199.
5. Bhumiratana S, Vunjak-Novakovic G. Concise Review: Personalized Human Bone Grafts for Reconstructing Head and Face. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(1):64-69. doi:10.5966/sctm.2011-0020.
6. Weir MD, Xu HHK. Culture human mesenchymal stem cells with calcium phosphate cement scaffolds for bone repair. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2010;93(1):93-105. doi:10.1002/jbm.b.31563.
7. Illich DJ, Demir N, Stojković M, et al. Concise review: Induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming: Prospects for bone regeneration. *Stem Cells*. 2011;29(4):555-563. doi:10.1002/stem.611.
8. He X, Dziak R, Mao K, et al. Integration of a novel injectable nano calcium sulfate/alginate scaffold and BMP2-gene modified MSCs for bone regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2012;19:120921022538006. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0244.
9. Chen W, Zhou H, Weir MD, Tang M, Bao C, Xu HHK. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate cement-chitosan-RGD scaffold for bone repair. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(7-8):915-927. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0172.
10. Deshpande SS, Gallagher KK, Donneys A, et al. Stem cell therapy remediates reconstruction of the craniofacial skeleton after radiation therapy. *Stem Cells Dev*. 2013;22(11):1625-1632. doi:10.1089/scd.2012.0472.
11. TheinHan W, Liu J, Tang M, Chen W, Cheng L, Xu HHK. Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on biofunctionalized calcium phosphate cements. *Bone Res*. 2013;4:371-384. doi:10.4248/BR201304008.

12. Liu X, Liao X, Luo E, Chen W, Bao C, Xu H. Mesenchymal stem cells systemically injected into femoral marrow of dogs home to mandibular defects to enhance new bone formation. *Tissue Eng Part A*. 2013;20:140120073424008. doi:10.1089/ten.TEA.2012.0677.
13. I CER, Shigeru G, Ii K, et al. Models , Biological Alveolar osseous defect in rat for cell therapy . Preliminary report 1 Defeito ósseo alveolar em ratos para terapia celular . Estudo preliminar. 2010;25(4):313-317.
14. Yoshioka M, Tanimoto K, Tanne Y, et al. Bone regeneration in artificial jaw cleft by use of carbonated hydroxyapatite particles and mesenchymal stem cells derived from iliac bone. *Int J Dent*. 2012;2012. doi:10.1155/2012/352510.
15. Moshaverinia A, Chen C, Xu X, et al. Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(3-4):611-621. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0229.
16. Askarinam A, James AW, Zara JN, et al. Human Perivascular Stem Cells Show Enhanced Osteogenesis and Vasculogenesis with Nel-Like Molecule I Protein 1–3, *. 2013;19:1386-1397. doi:10.1089/ten.tea.2012.0367.
17. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J*. 2014;8:56-65. doi:10.2174/1874210601408010056.
18. Liao H-T, Chen C-T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014;6(3):288-295. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.288.
19. He X, Dziak R, Yuan X, et al. BMP2 Genetically Engineered MSCs and EPCs Promote Vascularized Bone Regeneration in Rat Critical-Sized Calvarial Bone Defects. *PLoS One*. 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0060473.
20. Corre P, Merceron C, Vignes C, et al. Determining a clinically relevant strategy for bone tissue engineering: an “all-in-one” study in nude mice. *PLoS One*. 2013;8(12):e81599. doi:10.1371/journal.pone.0081599.
21. Mcallister B, Haghighat K. Clinical Applications of a Stem Cell Based Therapy for Oral Bone Reconstruction. In: *Stem Cell and Tissue Engineering*.; 2011:277-296.
22. Nazirkar G, Singh; S, Dole; V, Nikam A. Effortless Effort in Bone Regeneration : A Review. 2014;6(March):120-124.
23. Nerem RM. Tissue Engineering : From Basic Biology to Cell-Based Applications. In: *Stem Cell and Tissue Engineering*.; 2011:1-11.
24. Jin H, Zhang K, Qiao C, et al. Efficiently engineered cell sheet using a complex of polyethylenimine-alginate nanocomposites plus bone morphogenetic protein 2 gene to promote new bone formation. *Int J Nanomedicine*. 2014;9(1):2179-2190. doi:10.2147/IJN.S60937.

25. MacHado E, Fernandes MH, De Sousa Gomes P. Dental stem cells for craniofacial tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113(6):728-733. doi:10.1016/j.tripleo.2011.05.039.
26. Thein-Han W, Liu J, Xu HHK. Calcium phosphate cement with biofunctional agents and stem cell seeding for dental and craniofacial bone repair. *Dent Mater*. 2012;28(10):1059-1070. doi:10.1016/j.dental.2012.06.009.
27. Turhani D, Watzinger E, Weißenböck M, et al. Three-dimensional composites manufactured with human mesenchymal cambial layer precursor cells as an alternative for sinus floor augmentation: An in vitro study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(4):417-424. doi:10.1111/j.1600-0501.2005.01144.x.
28. Arpornmaeklong P, Wang Z, Pressler MJ, Brown SE, Krebsbach PH. Expansion and characterization of human embryonic stem cell-derived osteoblast-like cells. *Cell Reprogram*. 2010;12(4):377-389. doi:10.1089/cell.2009.0079.
29. Sándor GB. Tissue engineering of bone: Clinical observations with adipose-derived stem cells, resorbable scaffolds, and growth factors. *Ann Maxillofac Surg*. 2012;2(1):8. doi:10.4103/2231-0746.95308.
30. Xu HHK, Zhao L, Weir MD. Stem cell-calcium phosphate constructs for bone engineering. *J Dent Res*. 2010;89(12):1482-1488. doi:10.1177/0022034510384623.
31. Liao H-T, Chen Y-Y, Lai Y-T, Hsieh M-F, Jiang C-P. The osteogenesis of bone marrow stem cells on mPEG-PCL-mPEG/hydroxyapatite composite scaffold via solid freeform fabrication. *Biomed Res Int*. 2014;2014:321549. doi:10.1155/2014/321549.
32. Chen W, Liu J, Manuchehrabadi N, Weir MD, Zhu Z, Xu HHK. Umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cell seeding on macroporous calcium phosphate for bone regeneration in rat cranial defects. *Biomaterials*. 2013;34(38):9917-9925. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.002.
33. Thein-Han W, Xu HHK. Collagen-calcium phosphate cement scaffolds seeded with umbilical cord stem cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(23-24):2943-2954. doi:10.1089/ten.tea.2010.0674.
34. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30(10):546-554. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
35. Oliveira CS, Nascimento M, Almeida Junior E De, Crusoé M, Bahia P, Rosa FP. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. *Rev Ciências Médicas e Biológicas*. 2010;9:28-36.
36. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. *J Nanosci Nanotechnol*. 2014;14(1):15-56. doi:10.1166/jnn.2014.9127.
37. Tang M, Weir MD, Xu HHK. Mannitol-containing macroporous calcium phosphate cement encapsulating human umbilical cord stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2012;6(3):214-224. doi:10.1002/term.419.

38. Woloszyk A, Holsten Dircksen S, Bostanci N, Müller R, Hofmann S, Mitsiadis T a. Influence of the mechanical environment on the engineering of mineralised tissues using human dental pulp stem cells and silk fibroin scaffolds. *PLoS One*. 2014;9(10):e111010. doi:10.1371/journal.pone.0111010.
39. James AW, Zara JN, Zhang X, et al. Perivascular stem cells: a prospectively purified mesenchymal stem cell population for bone tissue engineering. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(6):510-519. doi:10.5966/sctm.2012-0002.
40. Perivascular H, Zhang X, Ph D, et al. The Nell-1 Growth Factor Stimulates Bone Formation. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(19-20):2497-2509. doi:10.1089/ten.tea.2010.0705.
41. P.Sasikumar K, Elavarasu S, S.Gadagi J. The application of bone morphogenetic proteins to periodontal and peri-implant tissue regeneration A literature review.pdf. doi:10.4103/0975-7406.100320.
42. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res*. 2014;93(2):109-116. doi:10.1177/0022034513506445.
43. Kook S, Jeon Y, Lim S, et al. Fibroblast growth factor-4 enhances proliferation of mouse embryonic stem cells via activation of c-Jun signaling. *PLoS One*. 2013;8(8):e71641. doi:10.1371/journal.pone.0071641.
44. Kuznetsov SA, Cherman N, Robey PG. In vivo bone formation by progeny of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2011;20(2):269-287. doi:10.1089/scd.2009.0501.
45. Huang NF, Li S. Mesenchymal Stem Cells for Tissue. In: *Stem Cell and Tissue Engineering*.; 2011:49-70.
46. Kassem M, Al-Nbaheen M, Ali D, Aldahmash A. Human (Skeletal) Mesenchymal Stem Cells: Basic Biology and Clinical Applications for Bone Tissue Regeneration. In: Lee, Eng Hin A, ed. *Stem Cell : From Bench to Bedside*.; 2011.
47. Liu Y, Wang L, Kikuri T, et al. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med*. 2011;17(12):1594-1601. doi:10.1038/nm.2542.
48. Senarath-Yapa K, McArdle A, Renda A, Longaker MT, Quarto N. Adipose-derived stem cells: a review of signaling networks governing cell fate and regenerative potential in the context of craniofacial and long bone skeletal repair. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):9314-9330. doi:10.3390/ijms15069314.
49. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):5. doi:10.1186/srct5.

50. Chang J, Liu F, Lee M, et al. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(23):9469-9474. doi:10.1073/pnas.1300532110.
51. Lo DD, Hyun JS, Chung MT, et al. Repair of a critical-sized calvarial defect model using adipose-derived stromal cells harvested from lipoaspirate. *J Vis Exp*. 2012;(68):1-7. doi:10.3791/4221.
52. James AW, Zara JN, Corselli M, et al. An Abundant Perivascular Source of Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(9):673-684. doi:10.5966/sctm.2012-0053.
53. James AW, Zara JN, Corselli M, et al. Use of Human Perivascular Stem Cells for Bone Regeneration. *J Vis Exp*. 2012;(63):1-5. doi:10.3791/2952.

ANEXOS

ANEXO I



Parecer

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela estudante Ana João Oliveira da Silva com o título “Regeneração óssea craniofacial com recurso a células estaminais” está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 29 de Maio de 2015

O orientador,

(Pedro de Sousa Gomes)

Professor Auxiliar da FMDUP

ANEXO II



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, 29 de Maio de 2015

A autora,

Ana João Oliveira da Silva

(Ana João Oliveira da Silva)