

Patrícia Joana Soares Mota

APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM MEDICINA DENTÁRIA

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2012

Patrícia Joana Soares Mota

APLICAÇÃO DE CÉLULAS ESTAMINAIS EM MEDICINA DENTÁRIA

UNIVERSIDADE FERNANDO PESSOA
FACULDADE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Porto, 2012

Autor: Patrícia Joana Soares Mota

Título do trabalho: "Aplicação de Células Estaminais em Medicina Dentária"

Assinatura: _____

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

RESUMO

Nos últimos anos têm-se realizado pesquisas sobre a utilidade de células estaminais em diversas áreas da saúde. Estes avanços científicos na área da bioengenharia tecidual têm levado ao desenvolvimento de novas terapias e curas de doenças que, até aos dias de hoje, não teriam cura.

Recentes pesquisas têm revelado que os dentes são ótimas fontes de células estaminais. Tanto os dentes decíduos como permanentes têm células estaminais com grande potencial proliferativo e apresentam as características de células estaminais: capacidade de autorrenovação e diferenciação em várias linhagens celulares.

Mediante este contexto, o objetivo geral desta monografia foi realizar uma revisão de literatura em foco para atualizar o conhecimento acerca das células estaminais e a sua aplicação em medicina dentária. Tendo como objetivos específicos: analisar as células estaminais dentárias, ampliando o conhecimento sobre as possibilidades do seu potencial regenerativo, como fonte de células estaminais e sistematizar os conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relativas à aplicação de células estaminais dentárias.

Com esta revisão bibliográfica, é possível esclarecer determinadas dúvidas sobre células estaminais. O futuro passará em usar estas células como tratamento terapêutico, de maneira a regenerar muitos tecidos, fazendo com que os órgãos lesados possam voltar à sua vitalidade completamente saudável. As células estaminais são, assim, de uma enorme utilidade.

Palavras-chave: Células estaminais, células estaminais dentárias, endodontia regenerativa, periodontia regenerativa.

ABSTRACT

Stem cells have been the target of abundant research focusing their potential in regenerative medicine. Scientific advances in bioengineered tissue has allowed the development of new therapies for diseases that, until recently, would not be possible.

Recent researches have revealed teeth as great sources of stem cells. Both deciduous or permanent teeth have stem cells with high proliferative potential, exhibiting the characteristics of other studied stem cells: self-renewal capacity and differentiation into various cell lines.

Under this context, the general objective of this thesis was to conduct a literature review focused on the stem cells knowledge and its application in dentistry. Having specific objectives: the study the dental stem cells, considering their regenerative potential as a source of stem cells and systematize the knowledge, scientific advances, limitations and prospects for the application of stem cells decay.

This literature review, enables the clarification of certain doubts about stem cells. The future use of these cells as a therapeutic treatment in order to regenerate different tissues, causing the damaged organs can return to its vitality completely healthy. The stem cells are therefore extremely useful.

Keywords: Stem cells, dental stem cells, regenerative endodontic, periodontal regenerative.

"Stem cells are not science fiction, but something that one day will become a part of each dentist's clinical practice."

Sreenivas *et al* (2011)

Aos meus pais, Maria e Abel,

À minha irmã, Isabel,

Que sempre fizeram tudo por mim...

...Sem vocês nada seria possível

Nada faria sentido...

Simplesmente vos amo!

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é uma grande vitória na minha vida. Muitas pessoas contribuíram e ajudaram-me a concretizar este sonho. Por isso, resta-me agradecer a todos que acreditaram em mim e tonaram este sonho uma realidade.

Ao meu orientador, Prof. Doutor José Lobato, por todos os ensinamentos e paixão pela descoberta que sempre me transmitiu.

À minha co-orientadora, Prof. Doutora Teresa Sequeira, por toda a ajuda, carinho e disponibilidade prestada ao longo deste difícil percurso.

Ao Prof. Doutor Carlos Silva, à Prof. Doutora Patrícia Manarte Monteiro e à Prof. Doutora Sandra Gavinha, vocês foram os grandes mestres e motivadores de todo o meu percurso académico. Espero um dia ser como vocês.

A todos os professores da Universidade Fernando Pessoa, que durante estes 5 anos me transmitiram os seus conhecimentos da melhor forma e tornaram-me na profissional de saúde que sou.

A todo o corpo não docente desta casa que me acompanhou de forma digna neste percurso.

À minha binómia Joana Sousa, pela amizade, carinho, paciência, foste a melhor binómia e companheira de curso que poderia ter.

Ao meu Tiago pelo amor, amizade, carinho, paciência e compreensão, contigo estes anos valeram a pena.

A todos os meus amigos vocês foram o meu pilar, a vossa amizade é para sempre.

A todos vocês: **MUITO OBRIGADA!**

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tabelas	iii
Abreviaturas e Siglas	iv
I - Introdução	1
III - Desenvolvimento	5
1- Dentes e Estruturas Associadas	5
1.1- Desenvolvimento do Dente	7
2 - Medicina Regenerativa e Células Estaminais	8
2.1 - Células Estaminais Totipotentes.....	11
2.2 - Células Estaminais Pluripotentes.....	12
2.3 - Células Estaminais Multipotentes.....	13
2.4 - Células Estaminais Embrionárias	13
2.5 - Células Estaminais Adultas	15
2.6 - Células Estaminais Pluripotentes Induzidas	19
4 - Fatores de Crescimento	23
5 - <i>Scaffolds</i>	25
6- Células Estaminais Derivadas dos Tecidos Dentários	27
6.1 - Células Estaminais da Polpa Dentária	31
6.2- Células Estaminais de Dentes Decíduos	35
6.3 - Células Estaminais do Ligamento Periodontal.....	37
6.4 - Células Estaminais da Papila Apical	39
6.5 - Células Estaminais do Folículo Dentário	41
7 - Aplicação de Células Estaminais em Medicina Dentária	41
7.1 - Regeneração Dentária	42

7.1.1 - Regeneração Óssea	43
7.1.2 - Regeneração Periodontal.....	45
7.1.3 - Endodontia Regenerativa - Regeneração do Complexo Dentino-Pulpar ...	47
7.1.4 - Regeneração do Esmalte	50
8 - Regeneração Neuronal com Células Estaminais Dentárias	50
9 - Perspetivas Futuras.....	55
10 - Aspetos Éticos.....	56
IV- Conclusão.....	58
V - Referências Bibliográficas	59
VI - Anexos	71

Índice de Figuras

Figura 1- Diagrama da pesquisa bibliográfica realizada.....	4
Figura 2 - Anatomia de um dente molar (fonte: Ilustração de Vincent Perez, 2004).....	6
Figura 3 - Imagens histológicas do desenvolvimento dentário: A - Fase de Gomo (1- Lâmina Vestibular, 2- Gomo Dentinário, 3- Lâmina Dentária Primária); B - Fase de Capuz; C - Fase de Campânula (Mandíbula e maxila (da esquerda para a direita)); D - Fase de Campânula aposicional (1- Formação da primeira camada de dentina (dentina do manto), 2- Formação do diafragma apical) (Fonte: [Em linha]. Disponível em < http://www.foar.unesp.br/Atlas/Odontogenese.html > [consultado em 07/06/2012]). ...	8
Figura 4 - Características das células estaminais: são células não especializadas com a capacidade de autorrenovação indefinida, dando origem a novas células estaminais não especializadas ou a células especializadas (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).....	9
Figura 5 - Nicho das células estaminais. Os nichos formam microambientes que fornecem sinais extrínsecos que juntamente com fatores intrínsecos das células estaminais determinam o seu comportamento e destino. Condições externas como temperatura e pH também influenciam o destino das células estaminais (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).....	10
Figura 6 - Fontes de células estaminais embrionárias e adultas suas aplicações (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).....	11
Figura 7 - Células estaminais totipotentes e pluripotentes (fonte: [em linha]. Disponível em < http://celulasestaminaiseseq.blogspot.pt/2011/01/tipos-de-celulas-estaminais.html > [consultado em 13-06-2012])	12
Figura 8 - Reprogramação das células estaminais pluripotentes induzidas (fonte: Cox e Rizzino, 2010)	20

Figura 9 - Diagrama esquemático do procedimento da engenharia tecidual com células estaminais dentárias. Formação de um dente de novo, *in vivo*, mediante gérmen dentário de um 3º Molar (fonte: Honda *et al.* 2010). 30

Figura 10 - Marcadores das células estaminais dentárias (fonte: Morszeck et al. 2008).
..... 31

Figura 11 - Fatores necessários para a bioengenharia dentária - é essencial um conjunto de CE, uma matriz (*scaffold*) para o desenvolvimento do novo tecido ou órgão e de fatores de crescimento como estímulo para diferenciação celular (fonte: Soares *et al.* 2007). 31

Figura 12 - Células estaminais de dentes decíduos: apresentam alta capacidade de se diferenciarem em odontoblastos, adipócitos ou células neurais (fonte: Soares *et al.* 2007). 35

Figura 13 - Regeneração do complexo dentino-pulpar através de DPSC (fonte: Nakashima e Akamine, 2005) 48

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Constituição química dos tecidos dentários maduros (adaptado Berkovitz, Holland e Moxham, 2004).....	6
Tabela 2 - Células Estaminais Embrionárias (Souza <i>et al.</i> 2003; Saber, 2009; Bragança, Tavares e Belo, 2010).	14
Tabela 3 - Característica das células estaminais adultas (adaptado: Watt e Hogan, 2000; Kolya e Castanho, 2007; Saber, 2009; Djouad <i>et al.</i> 2010; Malva e Bernardino, 2010; Ariffin <i>et al.</i> 2011	18
Tabela 4 - Exemplos atuais do uso de células estaminais em Medicina (adaptado: Nakashima e Akamine, 2005).	18
Tabela 5 - Principais marcadores celulares utilizados na identificação de CE (adaptado: Gomes e Pranke, 2008).	22
Tabela 6 - Os elementos-chave da engenharia tecidual (adaptado: Nakashima e Akamine, 2005).	23
Tabela 7 - Vantagens e desvantagens dos biomateriais usados em medicina regenerativa (adaptado: García-Olmo <i>et al.</i> 2007 citando Lee, Atala e Yoo, 2007)	26
Tabela 8 - Células estaminais dentárias: localização e potencial regenerativo (adaptado: Huang, Gronthos e Shi, 2009)	29
Tabela 9 - Resumo de artigos experimentais (expostos cronologicamente)	55

Abreviaturas e Siglas

BMPs - do inglês *bone morphogenetic protein* (proteínas morfogênicas ósseas)

CD - do inglês *clusters of differentiation* (molécula/antígeno presente na superfície de uma célula)

CE - células estaminais

Células NK - do inglês *Natural Killer Cell* - células citotóxicas não específicas que são importantes na resposta precoce às células tumorais e infecções virais

c-Myc - proteína que funciona como fator de transcrição devido à participação na regulação do ciclo celular, diferenciação, metabolismo, crescimento celular, apoptose, instabilidade genômica, imortalidade e angiogênese

CTGF - do inglês *connective tissue growth factor* (fator de crescimento do tecido conectivo)

DFPC - do inglês *dental follicle progenitor cells* (células estaminais do folículo dentário)

DMSO - dimetil-sulfóxido - $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$ - solvente polar aprótico

DPSC - do inglês *dental pulp stem cells* (células estaminais da polpa dentária de dentes permanentes)

DSP - sialoproteína dentinária

EGF - do inglês *epidermal growth factor* (fator de crescimento da epiderme)

FGF-2 - do inglês *fibroblast growth factor-2* (fatores de crescimento dos fibroblastos-2)
- essencial para que as células estaminais permaneçam num estado indiferenciado

FGFs - do inglês *fibroblast growth factor* (fatores de crescimento dos fibroblastos)

HLA - do inglês *human leucocitary antigen* (antigénio leucocitário humano)

IGF - do inglês *insulin growth factor* (fator de crescimento de insulina)

iPS - do inglês *induced pluripotent stem cells* (células estaminais pluripotentes induzidas)

Klf - do inglês *Kruppel-like factor* (proteína que funciona como fator de transcrição devido à relação com a proliferação e diferenciação celular)

LIM - domínio estrutural de proteínas constituídas por zinco - função regulação celular

LIN - marcador da linhagem celular

LIN28 - marcador das células estaminais pluripotentes induzidas

LMP1 - do inglês *latent membrane protein 1* (proteína latente da membrana 1)

MMP - do inglês *matrix metalloproteinase gene* (metaloproteinases da matriz) - envolvidas na degradação da matriz extracelular em processos fisiológicos normais e patológicos

MMP-2 - do inglês *matrix metalloproteinase gene-2* (metaloproteinases-2 da matriz)

Nanog - fator de transcrição presente no cromossoma 12 nas células estaminais

Nestina - marcador de células neuronais

Notch1 - marcador celular - importante no desenvolvimento da hematopoiese dos tecidos adultos

Oct - do inglês *octamer-binding proteins*, fator de transcrição presente nas células estaminais embrionárias

PCDH9 - do inglês *protocadherin 9*, gene relacionado com o cálcio

PDE1A - do inglês *phosphodiesterase 1A*, gene relacionado com o cálcio

PDGF - do inglês *platelet derived growth factor* (fator de crescimento derivados das plaquetas)

PDLSC - do inglês *periodontal ligament stem cells* (células estaminais do ligamento periodontal)

PDZ - domínio estrutural de 80-90 aminoácidos encontrados nas proteínas sinalizadoras

PGA - do inglês *poly glycolic acid*, material sintético de ácido poli-glicólico

PLA - do inglês *poly lactic acid*, material sintético de ácido láctico poli-glicólico

RGD - péptido Arg-Gly-Asp (Arginina-Glicina-Aspartato) - favorece os mecanismo de adesão e sinalização celular

SCAP - do inglês *stem cells from apical papilla* (células estaminais da papila apical)

SHED - do inglês *stem cells of human exfoliated* (células estaminais de dentes decíduos em esfoliação)

SHH - do inglês *sonic Hedgehog* (proteínas Hedgehog) - molécula sinalizadora que desempenha um papel central no desenvolvimento embrionário precoce, sistema nervoso e esquelético

Sox - fator de transcrição

SSEA - do inglês *stage specific embryonic antigen* (antigénio específico do estágio embrionário das células estaminais)

STRO-1 - marcador positivo para células estaminais mesenquimais estromais

TNF - do inglês *tumor necrotic factor* (fator de necrose tumoral)

TRA - antigénio de reconhecimento tumoral

VEGF - do inglês *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

Wnts - do inglês *manipulation wingless pathway*, proteínas inter-relacionadas transmembrana no processo diferenciação/proliferação

α SMA-GFP - modelo transgénico de musculo liso α -actina

β III-Tubulina - marcador neuronal

I - Introdução

Nos últimos anos têm-se realizado pesquisas sobre a utilidade de células estaminais (CE) em diversas áreas da saúde. Estes avanços científicos na área da medicina regenerativa têm proporcionado benefícios consideráveis para a humanidade, levando ao desenvolvimento de novas terapias e curas de doenças que, até aos dias de hoje, não teriam cura. Assim, assiste-se a um aumento da expectativa de vida, levando, conseqüentemente, a uma melhora da saúde e qualidade de vida das pessoas em todo o mundo.

Com os avanços da bioengenharia as CE dentárias assumem um importante papel, uma vez que estas células têm a capacidade de regenerar e formar tecidos tais como dentina, polpa dentária, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar. Assim, torna-se possível pensar-se numa terceira dentição, em que os implantes podem vir a ser substituídos por um órgão biológico semelhante aos dentes permanentes (Huang, 2009; Lin *et al*, 2011; Huang, 2012).

Hau e colaboradores (2006) afirmaram que a descodificação do genoma humano, os avanços científicos para a compreensão da regulação molecular da morfogênese dentária, da biologia das CE e a biotecnologia, dão oportunidades para viabilizar a regeneração dentária no futuro.

O interesse, por parte dos cientista, por CE derivadas dos tecidos dentários não se deu ao acaso, porque os dentes além de serem de fácil acesso não são considerados essenciais para a vida (Zhurova, Woods e Acker, 2010). Deste modo pode-se reaproveitar os dentes com extração indicada, sem ser um prejuízo para o paciente.

As CE são células percursoras que têm capacidade de diferenciação e autorrenovação, podendo dar origem a um descendente altamente diferenciado. Têm a capacidade de originar células especializadas dos tecidos dos quais fazem parte, possibilitando assim a regeneração de órgãos (Watt e Hogan, 2000; Honda *et al*. 2010).

Atualmente, os estudos mais avançados permitem uma melhor compreensão do desenvolvimento de um organismo a partir de uma única célula e a capacidade de células saudáveis substituírem células anormais num organismos adulto (Costa, Fischer e Figueiredo, 2008; Saber, 2009; Djouad *et al.* 2010; Feng *et al.* 2011).

Vários estudos têm demonstrado que a conjugação de biomateriais com CE adultas poderá, a médio prazo, gerar soluções terapêuticas funcionais na área da medicina regenerativa. É eliminado o risco de rejeição dos novos tecidos por parte dos pacientes evitando, deste modo, a necessidade de usar imunossuppressores cujos efeitos secundários podem ser graves, como a hipertensão arterial (Saber, 2009; Huang *et al.* 2010; Mangano *et al.* 2011).

O interesse por este tema surgiu por ser uma área em desenvolvimento e pouco conhecida para a maior parte dos estudantes e profissionais da área de Medicina Dentária. Mesmo sendo um tema controverso e, por enquanto, essencialmente laboratorial, é importante a atualização dos novos avanços científicos acerca das novas possibilidades de usar as CE e a bioengenharia dentária para a regeneração de tecidos dentários e periodontais. Para que num futuro próximo seja possível a regeneração de diversos tecidos/órgão, tais como o órgão dentário, o tecido ósseo, muscular ou cartilaginoso. Sendo que é importante consciencializar os médicos dentistas do enorme potencial associado ao uso de CE num ambiente clínico.

Mediante este contexto, o objetivo geral desta monografia foi realizar uma revisão de literatura em foco para atualizar o conhecimento acerca das CE e a sua aplicação em Medicina Dentária, tendo como objetivos específicos: analisar as CE dentárias, ampliando o conhecimento sobre as possibilidades do seu potencial regenerativo, fontes de CE dentárias e sistematizar os conhecimentos, avanços científicos, limitações e perspectivas relativas à aplicação de CE dentárias.

Com esta revisão bibliográfica, pretende-se esclarecer determinadas dúvidas sobre CE, tais como a sua localização e o seu potencial regenerativo. O futuro passará muito provavelmente em usar estas células como tratamento terapêutico, de maneira a

regenerar muitos tecidos, fazendo com que os órgãos lesados possam recuperar a vitalidade e saúde. As CE têm, assim, uma enorme utilidade.

II - Material e Método

Foi realizada uma pesquisa bibliográfica através de consulta à base de dados MedLine (www.ncbi.nlm.nih.gov), ScienceDirect (www.sciencedirect.com) e Lilacs (lilacs.bvsalud.org) recorrendo aos termos chave "stem cells from human exfoliated deciduous teeth", "periodontal ligament stem cells", "stem cell apical papilla" e "dental pulp stem cells". Para cada termo foram selecionados os artigos conforme a sua ordem cronológica da data de publicação, de modo a dar um cronograma de desenvolvimento à pesquisa.

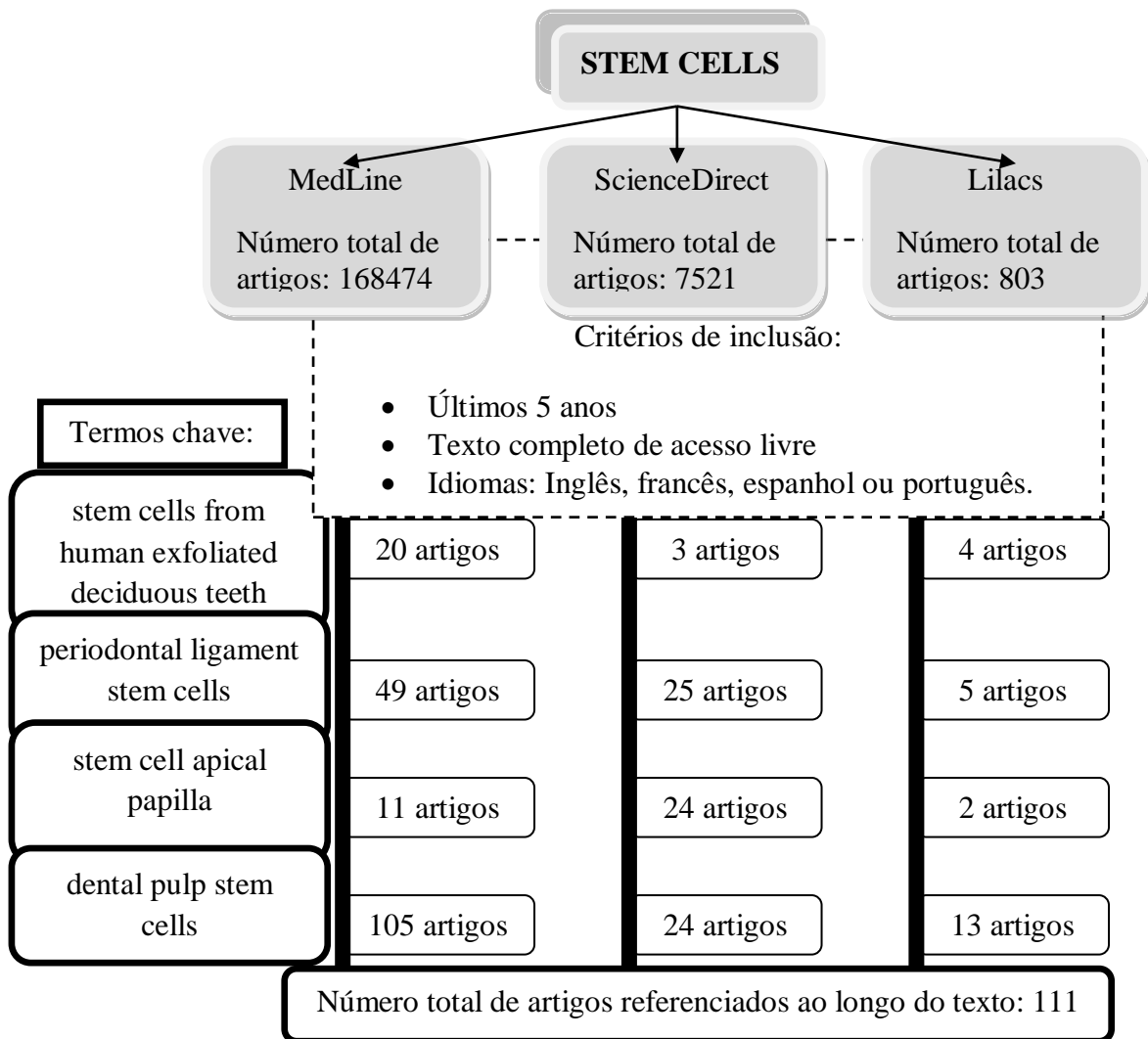


Figura 1- Diagrama da pesquisa bibliográfica realizada.

A pesquisa sobre CE a partir de nichos orais começou em 2000, com Gronthos et al, e desde então cada ano aumenta exponencialmente o número de artigos publicados. Esta revisão limitou-se aos últimos 5 anos, foram analisados apenas os artigos de acesso livre e nos idiomas inglês, francês, espanhol ou português. Esta monografia encontra-se escrita segundo o novo acordo ortográfico.

III - Desenvolvimento

Para que se possa perceber todo o funcionamento das CE na regeneração de tecidos dentários é importante que seja feita uma breve revisão sobre:

1. Dentes e estruturas associadas - como decorre todo o desenvolvimento dentário, uma vez que é através do conhecimento da evolução de duas populações celulares envolvidas - epitelial e ectomesenquimatosa – que se poderá manipular as CE no sentido de se obter determinada diferenciação e formação do(s) tecido(s) pretendido(s);
2. Medicina Regenerativa e CE;
3. Identificação e isolamento das CE;
4. Fatores de crescimento;
5. Matriz - *Scaffold*;
6. CE dentárias.

1- Dentes e Estruturas Associadas

O Homem tem dois tipos de dentição: a dentição decídua e a dentição permanente. A dentição decídua é uma dentição temporária que precede a dentição permanente. Tanto os dentes decíduos como os permanentes, estão dispostos em dois arcos bilateralmente simétricos, na maxila e na mandíbula (Junqueira e Carneiro, 2004; Berkovitz, Holland e Moxham, 2004).

Os dentes são formados por uma coroa e uma ou mais raízes. A coroa - parte visível do dente na cavidade oral - está acima da gengiva e é recoberta por esmalte - o tecido mais mineralizado do organismo. Internamente ao esmalte, o dente é constituído por dentina que é também um tecido mineralizado e que envolve a cavidade pulpar. A cavidade pulpar está preenchida por um tecido conjuntivo laxo quando jovem, muito vascularizado e inervado. A raiz encontra-se abaixo da gengiva e é recoberta por cimento - um tecido mineralizado com algumas analogias com o osso e no qual se inserem as fibras do ligamento periodontal. O ligamento periodontal é um tecido

conjuntivo denso com feixes grossos de fibras de colagénio I inseridas quer no cimento quer no osso alveolar, fixando assim o dente firmemente no alvéolo ósseo (Junqueira e Carneiro, 2004; Berkovitz, Holland e Moxham, 2004).

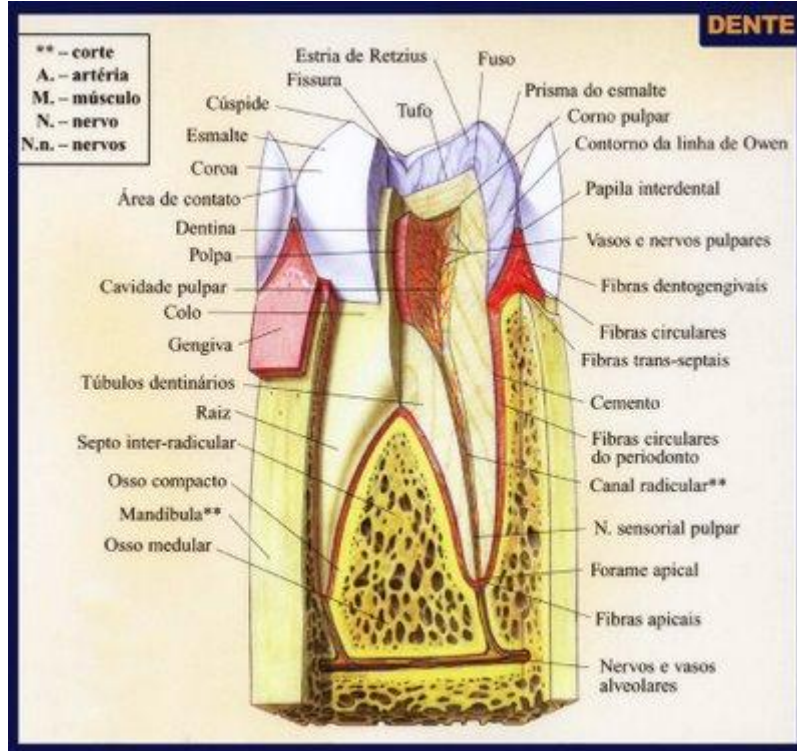


Figura 2 - Anatomia de um dente molar (fonte: Ilustração de Vincent Perez, 2004).

	Matéria Inorgânica	Matéria Orgânica	Água
Esmalte	96%	1%	3%
Dentina	70%	20%	10%
Polpa Dentária	-	25%	75%
Cimento	65%	23%	12%
Osso Alveolar	60%	25%	15%

Tabela 1 - Composição química dos tecidos dentários maduros (adaptado: Berkovitz,

Holland e Moxham, 2004).

1.1- Desenvolvimento do Dente

O desenvolvimento dentário, tal como todas as estruturas que formam o ser humano, é complexo, envolvendo vários processos e diferentes origens embriológicas. Embriologicamente o dente deriva da ectoderme, de natureza epitelial e de ectomesênquima - população celular proveniente das cristas neurais. Da ectoderme origina-se o órgão de esmalte, estrutura epitelial que irá formar o esmalte, enquanto que a evolução do ectomesênquima irá depender das duas posições distintas que poderá ocupar e, por isso, a diferenciação das células será distinta: a população que ficará mais próxima do órgão de esmalte - a papila - irá evoluir, por interação com as células epiteliais, no sentido de formar a futura dentina e polpa dentária. A população de ectomesênquima que se irá posicionar mais periféricamente ao germen dentário em formação - o folículo dentário - irá diferenciar-se mais tarde nas estruturas periodontais: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Koussoulakou, Margaritis e Koussoulakos, 2009).

Na sexta semana de desenvolvimento do embrião o epitélio oral começa a proliferar ficando mais espesso e invagina no ectomesênquima de modo a formar a lâmina epitelial primitiva. À medida que as células epiteliais da camada basal se multiplicam, mudam o seu plano de divisão mitótica e começam a sofrer condensação dando início à formação da lamina dentária que se separa assim da lâmina vestibular. Será da interação das células epiteliais da lâmina dentária com as células do ectomesênquima subjacente que resultará a formação do todo o dente (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004).

Tais interações resultam da contínua proliferação e progressiva histodiferenciação das células – quer as ectodérmicas quer as do ectomesênquima – determinado assim o desenvolvimento dentário que pode ser morfológicamente dividido em quatro fases: gomo (botão ou broto), capuz (casquete), campânula e campânula aposicional (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004).

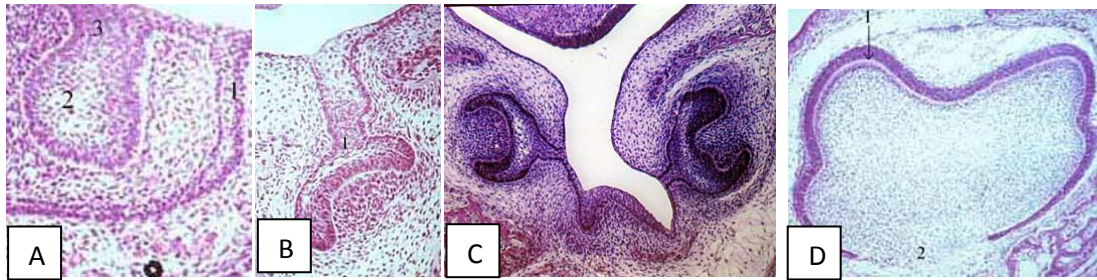


Figura 3 - Imagens histológicas do desenvolvimento dentário: **A** - Fase de Gomo (1- Lâmina Vestibular, 2- Gomo Dentinário, 3- Lâmina Dentária Primária); **B** - Fase de Capuz; **C** - Fase de Campânula (Mandíbula e maxila (da esquerda para a direita)); **D** - Fase de Campânula aposicional (1- Formação da primeira camada de dentina (dentina do manto), 2- Formação do diafragma apical) (Fonte: [Em linha]. Disponível em <<http://www.foar.unesp.br/Atlas/Odontogenese.html>> [consultado em 07/06/2012]).

As quatro fases morfológicas descritas correspondem alterações fisiológicas, celulares e moleculares também distintas: na fase de gomo dominam os processos de iniciação, a fase de capuz é caracterizada pela condensação celular, na fase de campânula ocorre uma intensa histodiferenciação e finalmente, na fase de campânula aposicional ocorre a mineralização, primeiro da dentina sendo imediatamente seguida pelo esmalte. Todas estas fases ocorrem de uma forma gradual e rápida (Berkovitz, Holland e Moxham, 2004; Koussoulakou; Margaritis; Koussoulakos, 2009).

2 - Medicina Regenerativa e Células Estaminais

A medicina regenerativa, engenharia tecidual ou bioengenharia é a ciência da concepção e produção de novos tecidos para substituir os tecidos danificados ou alterados. Para que seja possível esta produção tecidual é necessário haver uma combinação entre CE, morfogenes ou fatores de crescimento que regulem a diferenciação destas células e uma matriz - *scaffold* - adequada, que deve ser uma matriz extracelular que promove um microambiente adequado para o crescimento e diferenciação celular (Ripamonti e Reddi, 1997; Saber, 2009).

Nos últimos anos, as CE têm despertado um grande interesse da comunidade científica devido à possibilidade de possibilitarem tratamentos regenerativos em tecidos e órgãos.

Os organismos pluricelulares caracterizam-se por apresentarem tecidos com capacidade de renovação fisiológica. Esta renovação celular é constituída por uma constante proliferação e diferenciação celular, de modo a que haja uma manutenção do número de células, matriz celular, arquitetura e função dos órgãos. Para que estes processos ocorram é necessário existirem células com capacidade de autorrenovação e diferenciação, tais como as CE.

As CE, também designadas como células tronco ou células-mãe, são células indiferenciadas ou com um baixo grau de diferenciação e alto grau de imutabilidade que têm três características fundamentais:

- Capacidade de se manterem indiferenciadas ao longo do tempo;
- Capacidade de autorrenovação, dando origem a células indiferenciadas como elas próprias;
- Origina células filhas que se diferenciam e constituem as células dos tecidos/órgãos.

(Watt e Hogan, 2000; Junqueira e Carneiro, 2004; Costa, Fischer e Figueiredo, 2008; Telles *et al.* 2011).

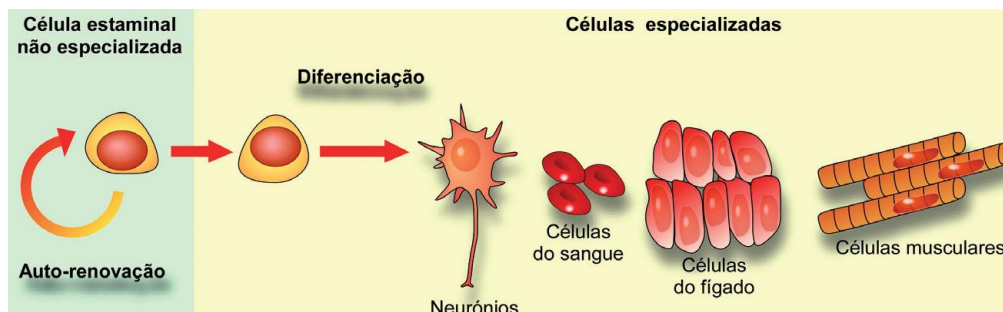


Figura 4 - Características das células estaminais: são células não especializadas com a capacidade de autorrenovação indefinida, dando origem a novas células estaminais não especializadas ou a células especializadas (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).

As CE têm a responsabilidade de manter a homeostasia dos tecidos em reposta a uma agressão ou, de forma fisiológica, garantir a renovação dos tecidos (Costa, Fischer e Figueiredo, 2008).

Em condições fisiológicas normais, as CE encontram-se em aglomerados que se designam por nichos. Um nicho define-se como um microambiente que interage e controla o futuro das CE, regulando o equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação (Bragança, Tavares e Belo, 2010; Correia e Bragança, 2010; Estrela *et al.* 2011). Deste modo, o nicho pode ser considerado como uma identidade tridimensional que incorpora e transmite informações às CE (Harada e Ohshima, 2004; Morrison e Spradling, 2008; Voog e Jones, 2010; Bianco, 2011).

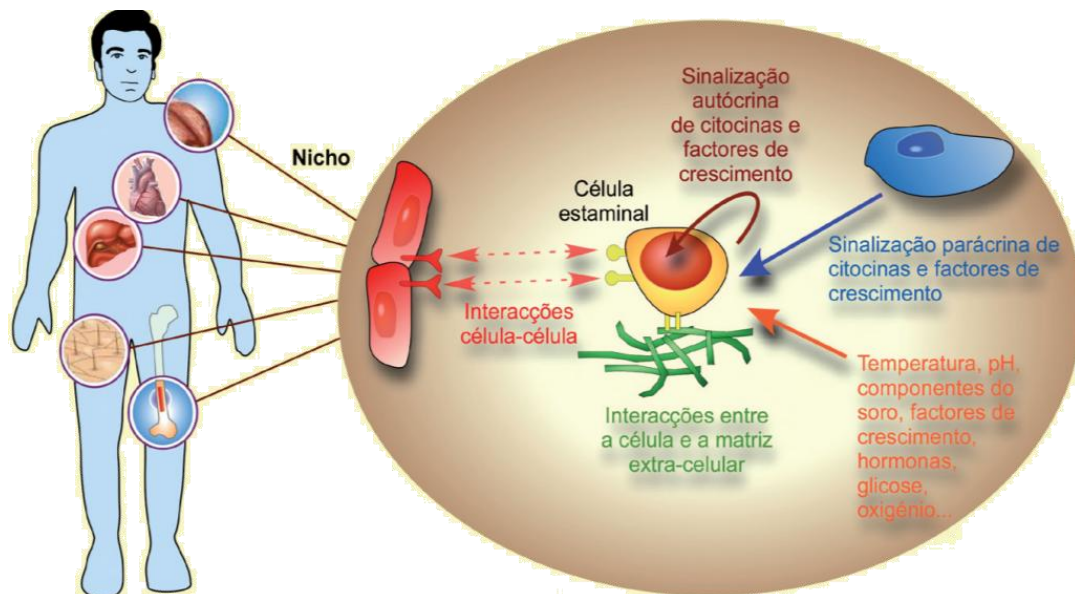


Figura 5 - Nicho de células estaminais. Os nichos formam microambientes que fornecem sinais extrínsecos que juntamente com fatores intrínsecos das células estaminais determinam o seu comportamento e destino. Condições externas como temperatura e pH também influenciam o destino das células estaminais (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).

Em 2011, Klein e Simons, desafiaram o conceito de CE definindo-a como células imortais com um ciclo celular lento e uma divisão celular assimétrica.

Estas células podem ser classificadas segundo a sua potencialidade - totipotentes, pluripotentes e multipotentes - e segundo a sua origem - embrionárias ou adultas.

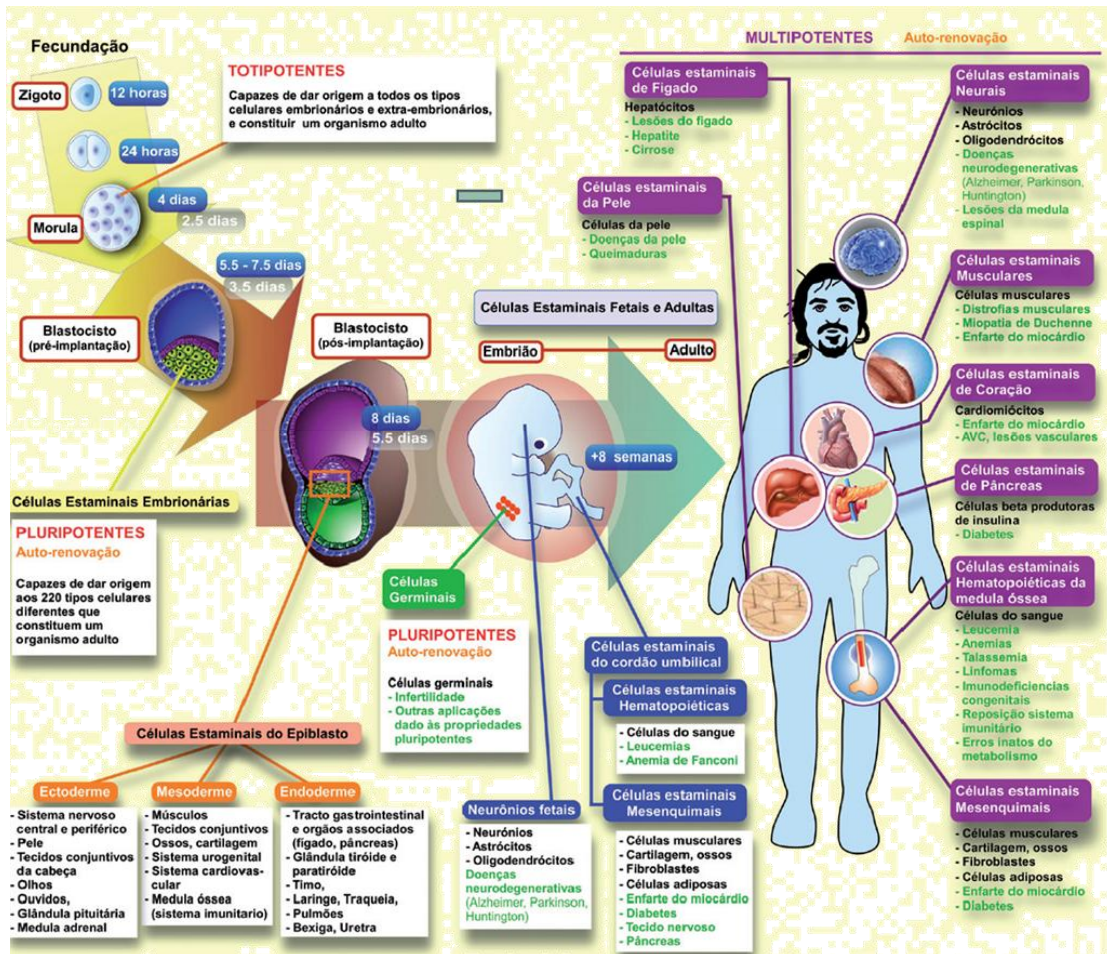


Figura 6 - Fontes de células estaminais embrionárias e adultas e suas aplicações (fonte: Bragança, Tavares e Belo, 2010).

2.1 - Células Estaminais Totipotentes

O primeiro passo no desenvolvimento humano ocorre quando o ovo recém fertilizado ou o zigoto começa a dividir-se, produzindo um grupo de CE totipotentes. Estas células têm a capacidade de se autorrenovarem e se diferenciarem em todos os tipos de células do organismo adulto (Saber, 2009).

As CE totipotentes são células que têm a capacidade de originar todas as células diferenciadas que compõem todos os tecidos do organismo adulto. Podem proliferar *in*

in vitro indefinidamente sem se diferenciar, sob as condições apropriadas são capazes de gerar um embrião viável, incluindo a parte fetal da placenta, cordão umbilical e as membranas extraembrionárias. São originárias do embrião na fase mórula, com 16 a 32 células, ou seja, com 3 a 4 dias (Souza *et al* 2003; Junqueira e Carneiro, 2004; Bragança, Tavares e Belo, 2010).

2.2 - Células Estaminais Pluripotentes

São células com a capacidade de se diferenciarem em todos os tecidos do organismo adulto, excluindo a placenta e as membranas extraembrionárias, isto é, não podem originar um indivíduo de maneira independente. Estas células são encontradas no embrião com 32 a 64 células, na massa interna do blastocisto (Souza *et al* 2003; Junqueira e Carneiro, 2004; Bragança, Tavares e Belo, 2010).

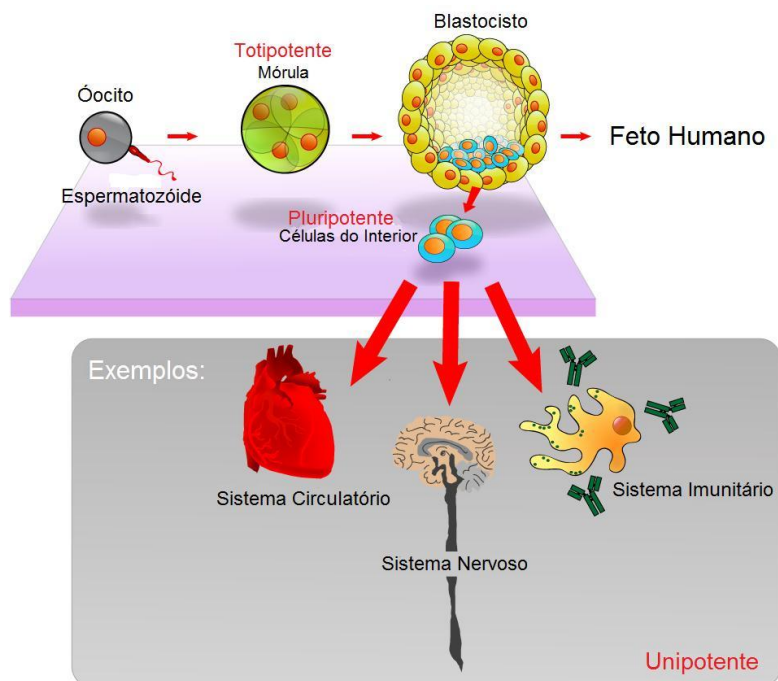


Figura 7 - Células estaminais totipotentes e pluripotentes (fonte: [em linha]. Disponível em <<http://celulasestaminaiseq.blogspot.pt/2011/01/tipos-de-celulas-estaminais.html>> [consultado em 13-06-2012])

A proliferação das CE pluripotentes origina células filhas com uma menor potencialidade. Essas células filhas são as células progenitoras uni- ou bipotentes que produzem as células precursoras. É nas células precursoras que aparecem as características morfológicas diferenciais das linhagens. As CE pluripotentes e as CE progenitoras são indistinguíveis morfológicamente (Junqueira e Carneiro, 2004).

2.3 - Células Estaminais Multipotentes

São células com capacidade de originarem um número ilimitado de células de várias linhagens, ou seja, podem dar origem a diferentes tipos de células especializadas. No entanto, ao contrário das CE pluripotentes, são restritas a um determinado órgão ou tipo de tecido, sendo a sua capacidade de diferenciação menor (Souza *et al* 2003; Junqueira e Carneiro 2004)

2.4 - Células Estaminais Embrionárias

As CE embrionárias encontram-se transitoriamente nos embriões e rapidamente se diferenciam em células somáticas ao longo do desenvolvimento (Alves, Lins e Barboza 2010).

As pesquisas de CE embrionárias têm gerado controversas de ordem política, moral e religiosa, pois a falta de consenso sobre a origem da vida e a moralidade do seu uso faz com que não se possam fazer pesquisas mais avançadas. Por um lado, devido às questões éticas, os avanços de estudos com esta fonte primária de células totipotentes e pluripotentes é restrito. Por outro lado, estas células, sendo isoladas a partir de embriões, surge a dificuldade de controlar o seu potencial proliferativo e de diferenciação, havendo o risco de histo-incompatibilidade e formação de tumores. Assim estas células devido à sua instabilidade genética, só poderiam ser usadas em hospedeiros imunocomprometidos (Alves, Lins e Barboza 2010).

Segundo Souza *et al.* (2003), considerando as CE embrionárias podem ser distinguidos dois tipos de células: as células do carcinoma embrionário e as células germinativas embrionárias.

Células Estaminais Embrionárias

<p><u>Derivados do Blastocisto</u></p>	<p>Cinco dias depois da fertilização, o embrião assume a forma de esfera oca - blastocisto. Os embriões nesta fase de blastocisto contêm dois tipos de células: trofoblasto que é a camada externa de células que formará a placenta e anexos embrionários, e um grupo de células na camada interna conhecido como a massa celular interna - embrioblasto - que formará o embrião propriamente dito.</p> <p>Quando são removidas do seu ambiente embrionário normal e cultivadas sob condições apropriadas, estas células dão origem a células que proliferam e se renovam indefinidamente.</p>
<p><u>Fetais do Cordão Umbilical</u></p>	<p>Após oito semanas do desenvolvimento, o embrião evolui para feto. Por esta altura, o feto começa a ter o desenvolvimento de uma forma humana.</p> <p>Capacidade de se diferenciarem em células da linhagem hematopoiética e mesenquimal - multiplicam-se rapidamente em culturas e têm uma grande plasticidade, o que faz com que sejam promissoras para fins terapêuticos, tanto no tratamento de doenças malignas como não malignas.</p> <p>Foram criados bancos públicos de CE fetais do cordão umbilical - maior disponibilização de CE hematopoiéticas e mesenquimatosas para serem usadas em transplantes e em futuras terapias celulares.</p>

Tabela 2 - Células estaminais embrionárias (adaptado: Souza *et al.* 2003; Saber, 2009; Ariffin *et al.* 2011).

2.5 - Células Estaminais Adultas

As CE encontradas em diferentes órgãos e tecidos do corpo designam-se por CE adultas ou somáticas. Estas células encontram-se tanto em crianças como em adultos e têm como principal função a manutenção e reparação dos tecidos específicos e dos órgãos onde se encontram, fazendo com que através da autorrenovação fisiológica seja possível promover homeostasia tecidual (Watt e Hogan, 2000; Costa, Fischer e Figueiredo, 2008; Correia e Bragança, 2010)

As CE adultas são multipotentes pela capacidade de diferenciação em várias linhagens celulares e comparativamente com as CE embrionárias, têm um potencial de diferenciação mais reduzido (Saber, 2009).

As CE adultas morfológicamente são muito idênticas às células dos tecidos ou órgãos onde se encontram dificultando o seu isolamento (Correia e Bragança, 2010). Vários investigadores conseguiram isolar CE adultas da medula óssea, do sangue periférico, do cérebro, da medula espinal, da polpa dentária, dos vasos sanguíneos, do músculo esquelético, do epitélio da pele, do sistema digestivo, da córnea, da retina, do coração, do fígado, do pâncreas, entre outros. Contudo, há tecidos em que não é possível definir a exata localização do nicho de CE, sendo necessário desenvolver um painel de marcadores moleculares para este fim (Watt e Hogan, 2000; Souza *et al.* 2003; Costa, Fischer e Figueiredo, 2008)

Devido a estas características, as CE adultas têm sido úteis no desenvolvimento da medicina regenerativa e bioengenharia tecidual, levando ao desenvolvimento de novas terapias e curas de doenças crónicas, tais como doenças cardiovasculares e doença de Parkinson. (Watt e Hogan, 2000; Souza *et al.* 2003; Costa, Fischer e Figueiredo, 2008; Correia e Bragança, 2010)

Células Estaminais Adultas

Hematopoiéticas

Mais conhecidas e melhor caracterizadas.

Origem comum - derivam de uma única CE totipotente.

Capacidade de autorrenovação e diferenciação em várias células especializadas.

Sofrem apoptose.

Expressam marcadores de superfície celular específicos que permitem o isolamento destas células .

Originam todas as células sanguíneas (tais como eritrócitos, linfócitos e as plaquetas),

Localizam-se, principalmente, na medula óssea, no sangue periférico, baço, fígado, placenta e no sangue do cordão umbilical.

Nos últimos anos têm sido usadas como transplante alogénico e no tratamento de diversas patologias imunes hereditárias ou adquiridas

CE adultas multipotentes

Originam diferentes tipos celulares, como condrócitos, miócitos, células adiposas, células do tecido conectivo e osteoblastos.

Encontram-se nos tecidos conjuntivos de quase todos os órgãos, mas para uso terapêutico, normalmente são isoladas através da medula óssea e do sangue do cordão umbilical, tal como as hematopoiéticas.

Mesenquimais

Capacidade de se propagarem em culturas e quando são estimuladas adquirem propriedades específicas, tais como, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Através da criação de um ambiente favorável há recuperação funcional das células endógenas dos órgãos e tecidos, promoção da angiogénese e remodelação cardíaca. Assim, estas células são benéficas na regeneração de órgãos, tal como, o fígado e o coração.

	<p>A medula óssea representa a fonte mais comum de células progenitoras mesenquimais e, consecutivamente, é a fonte mais utilizada, no entanto, também têm sido isolados a partir de uma grande variedade de tecidos, tais como osso, pele e ligamento periodontal.</p>
<p><u>Do Tecido Muscular</u></p>	<p>Células multipotentes com capacidade de autorrenovação e importante função no desenvolvimento muscular pós-natal, regeneração e hipertrofia muscular.</p> <p>Capazes de se diferenciarem em osteoblastos <i>in vitro</i>, melhorar a regeneração óssea <i>in vivo</i> e promover a reconstituição do sistema hematopoiético.</p> <p>Proliferação limitada e são obtidas numa quantidade restrita.</p>
<p><u>Epiteliais</u></p>	<p>Ciclo celular lento, elevado potencial proliferativo, grande plasticidade e capacidade de manutenção e reparo tecidual ao longo da vida.</p> <p>Localizam-se na epiderme - fácil obtenção.</p> <p>Quando são transplantadas para um ambiente embrionário podem ser reprogramadas e originam os estratos germinativos.</p>
<p><u>Do Cancro</u></p>	<p>Células resistentes à quimioterapia e à radioterapia.</p> <p>Capacidade de autorrenovação e proliferação, podendo originar e manter as células que formam o tumor - recorrências dos tumores e formação de metástases.</p> <p>Inicialmente identificadas nas leucemias mielóides agudas, mas com o avanço das pesquisas conseguiu-se identificar noutros tipos de cancro, tais como, cancro da mama e cancro da próstata.</p>

<u>Neurais</u>	<p>Derivam do sistema nervoso - estão presentes em aglomerados restritos do sistema nervoso.</p> <p>Também, foram encontradas na polpa dentária, no periodonto e na mucosa olfativa.</p> <p>Participam na formação de diferentes tecidos e órgãos oriundos das três camadas embrionárias (ectoderme, mesoderme e endoderme) - dão origem às três principais linhagens de células do sistema nervoso: neurónios, astrócitos e oligodendrócitos.</p> <p>Expressam marcadores celulares específicos.</p> <p>Tratamento de diversas patologias neurológicas e neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer e a Esclerose Múltipla.</p>
-----------------------	---

Tabela 3 - Característica das células estaminais adultas (adaptado: Watt e Hogan, 2000; Kolya e Castanho, 2007; Saber, 2009; Djouad *et al.* 2010; Malva e Bernardino, 2010; Ariffin *et al.* 2011; Feng *et al.* 2011).

<ul style="list-style-type: none">⇒ Transplante de medula óssea (por exemplo na leucemia)⇒ Injeção direta no coração após enfarte para produzir cardiomiócitos⇒ Regeneração do fígado, ossos, rins e neurónios⇒ Regeneração de células musculares, ósseas e sanguíneas⇒ Enxertos de pele e enxertos vasculares
--

Tabela 4 - Exemplos atuais do uso de células estaminais em Medicina (adaptado: Nakashima e Akamine, 2005).

Os maiores obstáculos das CE assentam na formação de teratomas e rejeição imunológica. A formação de teratomas está associada, principalmente, com o uso de CE embrionárias. Quanto à rejeição imunológica, apesar de CE embrionárias serem menos imunogénicas do que as CE adultas, as CE e derivados estão sujeitos a rejeição imunológica, quando transplantadas para um organismo (García-Olmo *et al.* 2007).

As CE expressam determinados genes associados ao seu estado indiferenciado e de pluripotência, como a proteína Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*), o gene Nanog, o antígeno específico para o estágio embrionário - SSEA (*stage specific embryonic antigen*) e outros marcadores de CE como o TRA (*tumor recognition antigen*) (Kerkis et al. 2006).

A proteína Oct-4 é um fator de transcrição presente nas CE na fase embrionária do blastocisto e epiblasto. O gene Nanog é um fator de transcrição expresso, também, na fase embrionária das CE (Kerkis et al. 2006).

Em 2011, Jewett e Tseng demonstraram que as CE são suscetíveis à citotoxicidade das células NK, provocando lise celular. Com base neste estudo, as células NK têm duas principais funções: limitar o número de CE, removendo as células defeituosas ou alteradas e selecionando as células com maior potencial na reparação tecidual, suportando a diferenciação das CE e promovendo regeneração dos tecidos subsequentes. Assim, as células NK desempenham um papel significativo na diferenciação celular e qualquer perturbação na função destas células pode resultar num processo inflamatório crônico, causando um contínuo dano tecidual.

2.6 - Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

Em 2006, Takahashi e Yamanaka relataram a surpreendente descoberta de que as CE poderiam ser reprogramadas como CE pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells* - iPS). Estes autores, num estudo com ratos, demonstraram que para que se formem iPS são necessários pelo menos quatro fatores de transcrição: Oct-4, Sox2, c-Myc e Klf4 .

Os genes Oct3/4 e certos membros da família dos genes Sox (Sox1, Sox2, Sox3, e Sox15) foram identificados como reguladores transcricionais cruciais envolvidos no processo de indução, os genes de certos membros da família Klf (Klf1, Klf2, KLF4, e Klf5), da família Myc (c-myc, L-myc, e N-myc), Nanog, e LIN28, foram identificados para aumentar a eficiência da indução (Takahashi e Yamanaka , 2006; Papapetrou *et al.* 2009; Kim *et al.* 2009; Cox e Rizzino, 2010).

As iPS definem-se como células somáticas diferenciadas que são reprogramadas em células que têm propriedades semelhantes às das CE embrionárias, podem ser geradas a partir de tecidos acessíveis e têm potencial em aplicações clínicas (Bragança, Tavares e Belo, 2010; Egusa *et al.* 2010).

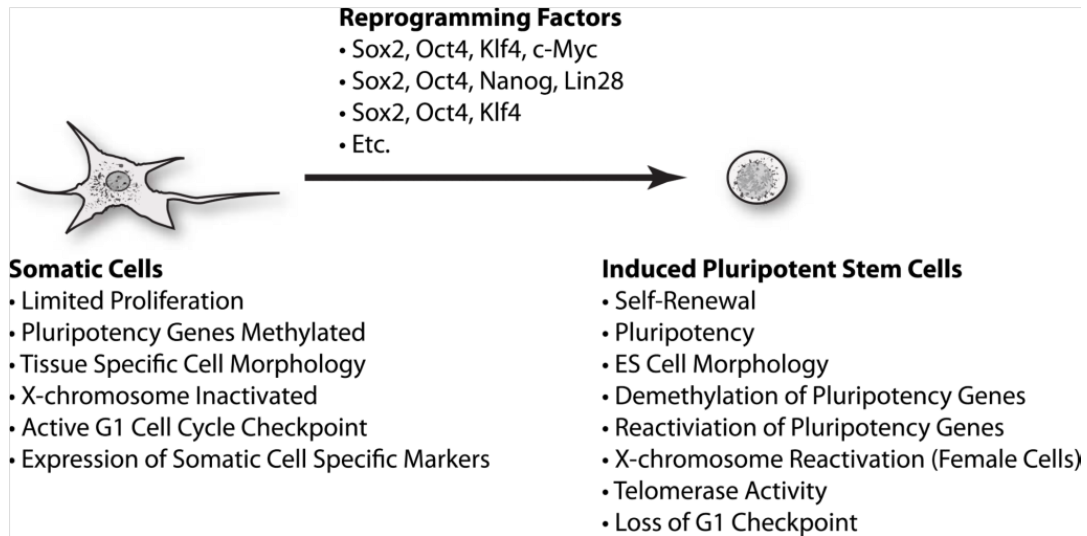


Figura 8 - Reprogramação das células estaminais pluripotentes induzidas (fonte: Cox e Rizzino, 2010)

Estas células têm a capacidade ilimitada de manter as propriedades de CE quando se dividem. Como vantagem são uma fonte limitada de células autólogas indiferenciadas e têm uma grande capacidade de diferenciação, não apresentando problemas éticos. Por outro lado, as desvantagens devem-se ao risco de formação de teratomas e outros cancros devido ao processo de reprogramação celular (Bragança, Tavares e Belo, 2010; Demarco *et al.* 2011).

Em 2010, Egusa *et al.*, sugeriram que através da gengiva se pode obter fibroblastos gengivais que são reprogramados em iPS. Do ponto de vista de acessibilidade, a gengiva é um tecido conveniente para biópsia e que, rotineiramente, é ressecado durante os tratamentos dentários, como no caso de extrações dentárias. Os autores definem a gengiva como tecidos que, por vezes, são tratados como lixo biomédico. Assim, a reprogramação eficiente de fibroblastos gengivais podem fazer da gengiva uma fonte ideal de iPS.

Yan *et al.* (2010), concluíram que as células de origem mesenquimatosa são uma fonte rica para gerar iPS, sendo que todas as CE de origem dentária podem ser reprogramadas com sucesso em IPS. Deste modo, estas células constituem uma nova abordagem para gerar CE possam ser usadas em regeneração tecidual.

Segundo Saber (2009), as CE geram células intermediárias antes de atingirem o estado totalmente diferenciado. A célula intermédia é conhecida como célula progenitora. Acredita-se que estas células geralmente diferenciam-se ao longo de uma via particular de desenvolvimento celular. Estas células indiferenciadas são consideradas progenitoras até que as propriedades de diferenciação e autorrenovação sejam demonstradas - CE (Saber, 2009 citando Ivanovski *et al.* 2006).

Em 2010, Mohyeldin, Muvdi e Hinojosa, estudaram a influencia do Oxigénio nas iPS, uma vez que, em ambientes de hipóxia (pouco oxigénio) podem influenciar a proliferação celular e destino da célula. Estes investigadores concluíram que o oxigénio pode regular as CE, sendo considerado como um regulador metabólico da biologia da CE e permite que as células se autorrenovem e se diferenciem.

3 - IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS

Para diferenciar e identificar os diferentes tipos de CE são precisos marcadores específicos que permitam o isolamento destas células e, posteriormente, a sua identificação.

Os marcadores citológicos mais usados são glicoproteínas presentes na superfície celular e fatores de transcrição das células. Cada célula tem proteínas com recetores específicos à superfície, o que faz com que seja possível haver distinção celular. Através da combinação destes marcadores com moléculas fluorescentes é permitido determinar a linhagem e o grau de maturidade das células (Gomes e Pranke, 2008; Correia e Bragança, 2010).

Segundo Gomes e Pranke (2008) citando Darena *et al.* (1996) e Kim *et al.* (2004), referem que as CE hematopoiéticas podem ser identificadas através dos antígenos CD34+, ausência de CD38 e outros antígenos envolvidos na linhagem mielóide e linfóide. As CE mesenquimatosas podem ser identificadas através dos antígenos CD13, CD28, CD33, CD44, CD105, CD166 e HLA I.

Marcador Celular	Tipo Celular
CD34	CE hematopoiéticas, progenitor endotelial
CD38	CE hematopoiéticas, precursores hematopoiéticos da linhagem linfóide
CD45	Marcador leucocitário
CD184	Progenitor/ CE hematopoiéticas e CE mesenquimais
CD33	Células estaminais neurais, identificação de neurónios e células da glia
CD44	CE mesenquimais

Tabela 5 - Principais marcadores celulares utilizados na identificação de células estaminais (adaptado: Gomes e Pranke, 2008).

De acordo com, *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (ISCT), as CE mesenquimais em 95% da população expressam os marcadores CD73 , CD90 e CD105, e menos 2% expressa marcadores CD34, CD45, CD11b ou CD14, CD19 ou CD79a e HLA-DR.

O fato de cada tipo de CE apresentar marcadores específicos em conjugação com a utilização de marcadores fluorescentes faz com que seja possível diferenciar cada tipo celular (Gomes e Pranke, 2008; Correia e Bragança, 2010).

Como já foi referido, para que possa haver proliferação e utilização de CE é necessário existir interação entre três componentes essenciais: CE, *scaffolds* - uma espécie de arcabouço adequado, e fatores de crescimento - morfogenes - interatuam com as CE levando à sua manutenção e proliferação (Demarco *et al.* 2011).

Células Estaminais	Capazes de se diferenciarem em células especializadas, Capazes de responder a morfogenes indutores de proliferação ou diferenciação.
Morfogenes	Fatores biológicos que regulam as CE para formar o tipo de célula desejável, 5 grandes famílias (BMPs, FGFS e Wnts, SHH, TNF), BMPs são os morfogenes mais importante para a regeneração dentária.
Scaffolds	Fornecem uma estrutura tridimensional biocompatível para a adesão celular e migração <div style="background-color: #cccccc; padding: 5px;">Biológicos - bioscaffolds • Exemplos: colagénio, glicosaminoglicanos, ...</div> <div style="padding: 5px;">Artificiais • Exemplos: PLA (Poly lactic acid), PGA (Poly glycolic acid), ...</div>

Tabela 6 - Os elementos-chave da engenharia tecidual (adaptado: Nakashima e Akamine, 2005).

4 - Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento são proteínas que interatuam com as CE e designam-se por morfogenes, ou seja, são sinais excretados extracelularmente que guiam a morfogênese ou a organogênese durante interações epiteliais e mesenquimais (Saber, 2009; Demarco *et al.* 2011). Estes morfogenes regulam a divisão celular, síntese da matriz e proliferação das CE e são classificados de acordo com sua atividade (Demarco *et al.* 2011).

Ao longo dos anos, vários fatores de crescimento têm sido descritos. Nakashima e Akamine (2005) definem que existem cinco famílias proteicas: proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs - *bone morphogenic proteins*); fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs - *fibroblast growth factors*); proteínas *Hedgehog* (SHH); proteínas interrelacionadas *wingless* (Wnts); e fatores de necrose tumoral (TNFs - *tumor necrotic fator*).

As BMPs são proteínas que ativam múltiplas vias de sinalização relacionadas com processos de biomineralização. Desempenham uma papel fundamental na morfogênese dentária, estando envolvidas nas interações entre o epitélio dentário e o mesênquima durante o desenvolvimento craniofacial (Kolya e Castanho, 2007). Estas proteínas são expressas na fase de capuz e de campânula e estão associadas com a diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos (Nakashima e Akamine, 2005).

As FGFs atuam em vários gradientes de diferenciação durante a odontogênese. A FGF-2 em associação com outros fatores de crescimento liberados da matriz dentinária, assim como células endoteliais, promovem a angiogênese e podem ser mitogénicas para as CE pulpaes (Nakashima e Akamine, 2005).

As SHHs são uma das três proteínas pertencentes à família *Hedgehog* de transdução de sinais dos vertebrados, responsáveis pelo controlo da divisão celular das CE adultas, e o único ligante covalente expresso nas células pulpaes nos estágios iniciais da odontogênese. Estas proteínas regulam a proliferação e a manutenção das células durante o desenvolvimento do germe dentário (Nakashima e Akamine, 2005; Soares *et al.* 2007). As proteínas SHH e a via Wnt sinalizam os locais de formação dos futuros germes dentários na lâmina dentinária. Enquanto que os TNF são importantes na formação das cúspides dos molares (Soares *et al.* 2007).

Embora as cinco classes de morfogenes estejam envolvidas no desenvolvimento embriogénico do dente, as BMPs são as proteínas que exercem a maioria das sinalizações para que haja regeneração dentária (Nakashima e Akamine, 2005).

Saber (2009) ao longo da sua revisão bibliográfica refere fatores que regulam a angiogênese - fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGF - *platelet-derived growth factor*); fator de crescimento de insulina (IGF - *insulin growth factor*); fator de crescimento da epiderme (EGF - *epidermal growth factor*); e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - *vascular endothelial growth factor*).

5 - Scaffolds

Os *Scaffolds* são estruturas que servem de matriz extracelular e fornecem um ambiente que permite a migração e a proliferação celular. Esta matriz proporciona condições biológicas e físico-químicas tri-dimensionais para o crescimento e diferenciação celular, estimulando a adesão e migração celular. Serve como transportador dos morfogenes e das proteínas para que haja terapia celular. Um *scaffold* ideal deve: ser poroso, de modo a que seja possível colocar CE e fatores de crescimento; efetivos no transporte de nutrientes e oxigênio; ser biodegradável e biocompatível, não produzindo produtos tóxicos; ao ser substituído por tecido regenerativo deve manter a forma e o tamanho do tecido final; e deve proporcionar resistência física e mecânica. (Nakashima e Akamine, 2005; Saber, 2009; Demarco *et al.* 2011).

Têm sido usados polímeros naturais (*bioscaffolds*) e sintéticos ou artificiais. Os polímeros naturais, tais como colagénio e glicosaminoglicanos, em geral, são mais biocompatíveis, enquanto os polímeros sintéticos permitem um melhor controle das propriedades físico-químicas, tais como taxa de degradação, microestrutura e resistência mecânica. As características dos *scaffolds* são determinantes para o comportamento da célula e, conseqüentemente, formação de tecido (Demarco *et al.* 2011).

	Biomateriais	Vantagens	Desvantagens
Polímeros Naturais	Proteínas (Colagénio, Albumina, Fibrina, etc.)	Biocompatíveis Incorporação de moléculas bioativas	Difícil de controlar a biodegradação Estabilidade mecânica pobre
	Polissacarídeos (Alginato, Quitosano, Amido, etc.)	(citoquinas, fatores de crescimento)	Sensíveis à temperatura
	Glicosaminoglicanos (Heparina, Ácido hialurónico, etc.)	Mimetiza a estrutura e composição da matriz extracelular natural	Transferência de possíveis agentes patogénicos

Polímeros Sintéticos		Fácil de processar	
	Poliésteres - PGA, PLA	Controlo da taxa de biodegradação pode ser	
	Hidrogéis	controlada	Menos biocompatível
	Policianoacrilatos	Livre de agentes patogénicos	Degradação a partir de derivados
	Entre outros.	Incorporação moléculas bioativas (citoquinas, fatores de crescimento)	

Tabela 7 - Vantagens e desvantagens dos biomateriais usados em medicina regenerativa (adaptado: García-Olmo *et al.* 2007).

Em 2010 Ravindran, Song e George demonstraram que a mistura de colagénio I e quitosano formam um *scaffold* de biopolímeros naturais que permitem a migração, proliferação e diferenciação das CE epiteliais e mesenquimais, permitindo neovascularização *in vivo*.

Zhao *et al.* (2011) referem que a proteína LMP1 (proteína latente membrana 1) é um *scaffold* intracelular que contém o domínio PDZ (domínio estrutural com 80-90 aminoácidos, encontrados em proteínas sinalizadoras) e três domínios LIM. A proteína LMP1 regula as células mesenquimais na osteogénese, sendo capaz de induzir a formação óssea *in vivo*.

O desenvolvimento dos *scaffolds* é um passo crítico para a aplicação clínica da engenharia tecidual da polpa dentária. O desenvolvimento de *scaffolds* para a regeneração dentária constitui uma oportunidade importante para o futuro da investigação de biomateriais dentários, esta área requer uma abordagem multidisciplinar, em que pesquisadores com experiência em materiais dentários devem colaborar com a bioengenharia.

Deste modo, as CE, os *scaffolds* e os fatores de crescimento são componentes essenciais para que possam haver regeneração tecidual. No entanto, também é necessário haver o

envolvimento de vasos sanguíneos funcionais para que seja possível uma completa regeneração tecidual (Demarco *et al.* 2011).

6- Células Estaminais Derivadas dos Tecidos Dentários

As CE dentárias têm sido amplamente estudadas, uma vez que, a capacidade de diferenciação destas células, faz com que sejam consideradas com um enorme potencial regenerativo. Estas células podem ser usadas, não só para regeneração de tecidos dentários, mas também para facilitar a reparação de tecidos não dentários como tecido ósseo e nervoso. Como as CE dentárias têm propriedades semelhantes às CE mesenquimais, existe um grande interesse no uso destas células no tratamento de desordens que envolvam derivados das células mesenquimais ou não-mesenquimais, tais como na doença de Parkinson (Volponi, Pang e Sharpe, 2010). Existem estudos que apoiam a utilização de CE dentárias como uma terapêutica viável na cura de doenças genéticas, sendo uma grande promessa como fonte alternativa para a terapia celular pessoal (Snyder *et al.* 2011; Nourbakhsh *et al.* 2011).

As CE dentárias podem ser obtidos com facilidade, tornando-as numa fonte atraente de células autólogas para uso na reparação de tecido pulpar vital, removido devido a uma infecção; na regeneração do ligamento periodontal perdido na doença periodontal e para produzir estruturas dentárias, de modo a formar implantes biológicos (Morsczeck *et al.* 2008; Suchánek *et al.* 2010; Vasconcelos *et al.* 2011).

Segundo Volponi, Pang e Sharpe (2010), por um lado, o facto dos dentes não serem essenciais para a vida, não são atrativos na área da medicina regenerativa, em comparação com as doenças neuronais ou cardíacas, por exemplo. Este facto faz com que os dentes sejam ideais para testar novos tratamentos baseados em terapias celulares, uma vez que a investigação, em princípio, não compromete a vida do paciente, pondo-a em risco; a acessibilidade a esta terapia não implica uma cirurgia invasiva e a existência de populações de CE altamente proliferativas que podem ser facilmente obtidas a partir de dentes naturalmente perdidos ou removidos cirurgicamente. Assim, nos últimos anos a investigação de CE derivadas dos dentes ganhou interesse por parte dos investigadores.

As CE, como já foi referido, são células indiferenciadas ou com baixo grau de diferenciação que têm a capacidade de autorrenovação e originar células especializadas dos tecidos dos quais fazem parte, tais como regeneração de órgãos (Handrigan, Leung e Richman, 2010).

Várias populações celulares com propriedades de CE têm sido isoladas a partir de diferentes partes do dente. Atualmente sabe-se que os tipos de CE derivadas dos tecidos dentários que existem são:

1. CE da polpa dentária de dentes permanentes (*dental pulp stem cells - DPSC*);
2. CE da polpa dentária de dentes em esfoliação (*stem cells of human exfoliated - SHED*);
3. CE do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cells - PDLSC*);
4. CE da papila apical (*stem cells from apical papilla - SCAP*);
5. CE do folículo dentário (*dental follicle progenitor cells - DFPC*);

Todas estas células partilham uma linhagem comum e têm propriedades semelhantes às células mesenquimais, partilhando a expressão de marcadores genéticos e de diferenciação em linhagens de células mesenquimais, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos, *in vitro* e, em certa medida, *in vivo* (Mokry *et al.* 2010). No entanto estas células diferem entre si em alguns aspetos, nomeadamente, na taxa de crescimento, na expressão de marcadores genéticos e na diferenciação celular (Giordano, 2011).

Em 2011, Kim e colaboradores, publicaram um estudo que comparava o perfil de expressão dos genes de CE mesenquimais derivadas dos tecidos dentários e da medula óssea de modo a caracterizar as CE dentárias. Neste estudo, através do marcador STRO-1 (marcador comum das CE mesenquimais) concluíram que as CE dentárias têm características semelhantes às CE mesenquimais.

	Localização	Análise <i>in vitro</i> -Potencialidade	Análise <i>in vivo</i> -Formação de tecido
DPSC	Polpa de dentes permanentes	Osteogénica Dentinogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica	Complexo dentino-pulpar Odontoblastos Tecido ósseo
SHED	Dentes decíduos em esfoliação	Dentinogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica Osteoindutora	Tecido dentina-polpa Sem formação de complexo dentino-pulpar Odontoblastos Formação óssea
PDLSC	Ligamento periodontal	Osteogénica Cementogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica	Cemento Ligamento periodontal
SCAP	Papila apical	Dentinogénica Adipogénica Condrogénica Miogénica Neurogénica	Complexo dentino-pulpar Odontoblastos
DFPC	Folículo dentário	Cementogénica Odontogénica Adipogénica, Condrogénica Miogénica Neurogénica	Ligamento periodontal Cemento formação da matriz

Tabela 8 - Células estaminais dentárias: localização e potencial regenerativo (adaptado: Huang, Gronthos e Shi, 2009)

Apesar dos resultados promissores observados com as CE, o acesso para a sua obtenção é, muitas vezes, um impedimento para a bioengenharia tecidual. Nestes casos, as CE pluripotentes induzidas surgem como uma alternativa viável para ultrapassar obstáculos, como por exemplo, éticos. Contudo, devem ser eliminados os riscos de formação de teratomas e outros cancros devido aos processo de reprogramação das células (Demarco *et al.* 2011).

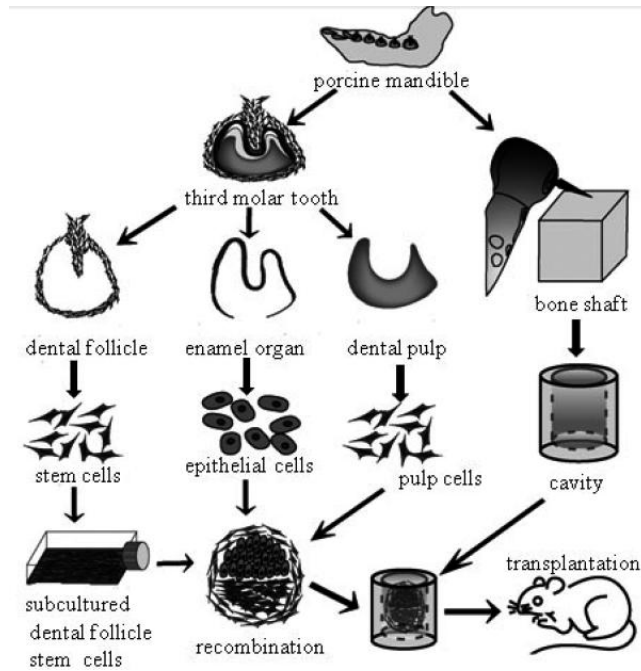


Figura 9 - Diagrama esquemático do procedimento da engenharia tecidual com células estaminais dentárias. Formação de um dente de novo, *in vivo*, mediante gérmen dentário de um 3º Molar (fonte: Honda *et al.* 2010).

O potencial de diferenciação das CE dentárias situa-se dentro da formação de tecidos da dentina ou associados ao periodonto, se essas células são derivadas da polpa, do ligamento periodontal ou do folículo dentário. As CE dentárias podem ser classificadas em dois grupos diferentes no que diz respeito ao seu potencial de diferenciação. O primeiro grupo está associado com a polpa dentária, contendo DPSC, SHED e SCAP; o segundo grupo contém PDLSC e DFPC (Morszeck *et al.* 2008). No entanto, é difícil de caracterizar estas CE por marcadores celulares, uma vez que são diferentes ao longo do desenvolvimento da célula. Algumas proteínas de superfície, como Stro-1 e CD73, são expressas por todas as CE dentárias.

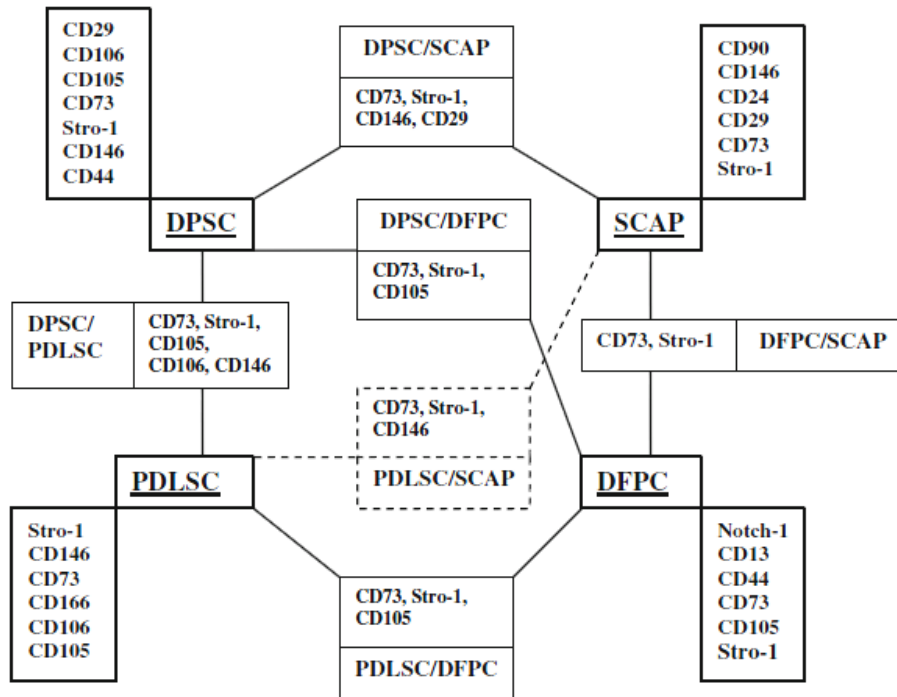


Figura 10 - Marcadores das células estaminais dentárias (fonte: Morsczeck et al. 2008).

6.1 - Células Estaminais da Polpa Dentária

As DPSCs multipotentes que se caracterizam pela capacidade de diferenciação e elevada proliferação (Zhurova, Woods e Acker, 2010).

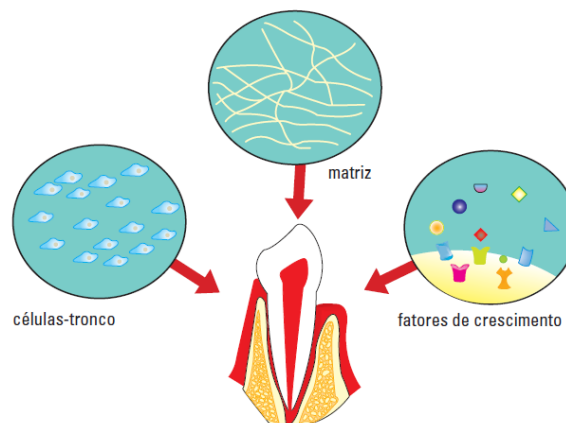


Figura 11 - Fatores necessários para a bioengenharia dentária - é essencial um conjunto de CE, uma matriz (*scaffold*) para o desenvolvimento do novo tecido ou órgão e de

fatores de crescimento como estímulo para diferenciação celular (fonte: Soares *et al.* 2007).

A diferenciação destas células para uma linhagem celular específica é determinada, principalmente, por fatores que influenciam o microambiente local, tal como, fatores de crescimento, moléculas recetoras, moléculas de sinalização, fatores de transcrição e proteínas da matriz extracelular. As DPSCs podem ser reprogramados em múltiplas linhagens celulares, tais como, odontoblastos, osteoblastos, condrócitos, miócitos, adipócitos, entre outras (Grottkau, Purudappa e Lin, 2010). Alge e colaboradores (2010) demonstraram que as DPSC e as CE mesenquimais têm uma morfologia semelhante, ambas formam colónias *in vitro* e promovem a diferenciação osteogénica, condrogénica e adipogénica. No entanto, as DPSCs têm uma maior taxa de proliferação e uma maior quantidade de CE. Neste estudo os investigadores demonstraram que as DPSCs são úteis na regeneração de tecido mineralizado.

Estudos demonstram que as DPSCs desempenham um papel vital na regeneração do complexo dentino-pulpar (Gronthos *et al.* 2000; Huang *et al.*, 2010).

Gronthos e colaboradores (2000) isolaram pela primeira vez DPSC. Estas células foram isoladas a partir de terceiros molares permanentes e após transplantar-se, as CE formaram um tecido conjuntivo semelhante ao complexo dentino-pulpar, composto por uma matriz mineralizada com túbulos dentinários, odontoblastos e tecido fibroso que continha vasos sanguíneos, como um dente humano normal. Estas células são capazes de responder a sinais específicos e gerar novas CE ou promover diferenciação celular. Estes autores, demonstraram que as células progenitoras da polpa dentária de um dente permanente estão dispostas hierarquicamente.

Em 2009, Yu *et al.* demonstraram que a pressão hidrostática regula a sobrevivência das DPSCs, promove a diferenciação osteogénica, mineralização *in vitro* e regeneração óssea *in vivo*, com capacidade de resposta à estimulação da proteína BMP-2 (proteína morfogenética do osso - 2). Sendo possível que a pressão hidrostática aumente ou interrompa a atividade das DPSCs.

Woods *et al.*(2009) relataram que o isolamento DPSC é viável até 5 dias após a extração do dente, e que a criopreservação precoce da cultura de DPSC conduz a uma maior recuperação pós-descongelamento. Neste estudo, os autores investigaram o processamento e as características de criopreservação das DPSC e determinaram que DMSO₂ (dimetil-sulfóxido) a uma concentração entre 1 e 1,5M é considerado o melhor meio de criopreservação. Foi ainda demonstrado que a viabilidade das DPSC, após a criopreservação, não é limitada pela concentração das células congeladas e que estas células podem ser armazenadas a -85°C ou -196°C durante seis meses, sem perda de funcionalidade. Um ano mais tarde, Zhurova, Woods e Acker demonstraram que DMSO₂ a 10% é um excelente método de criopreservação das CE, uma vez que as CE mostraram uma taxa de sobrevivência boa pós-descongelamento.

Em 2010, Balic e Mina demonstraram que a polpa dentária de incisivos inclusos contém CE do tipo mesenquimal, uma vez que, expressam fatores característicos das CE mesenquimais (CD90+, CD117+, Sca-1+), contudo, contrariamente às CE mesenquimais, as células dos incisivos expressaram grandes valores do fator CD45+. O estudo *in vitro* demonstrou que estas células exibem potencial osteo-dentinogénico, mas são incapazes de se diferenciar em condrócitos e adipócitos. Estes resultados fornecem evidência de que a contínua geração de odontoblastos e dentina é suportado por uma população progenitora e não pelas CE mesenquimais multipotentes.

Wang Z. *et al.* (2010), demonstraram, pela primeira vez, que dentes clinicamente comprometidos - pulpíte irreversível, contém CE com as mesmas capacidade autorrenovação e proliferação celular.

Em 2010, Riccio *et al.*, demonstraram que as DPSCs são capazes de se diferenciar numa linhagem osteogénica, tanto em culturas 2D como 3D de *bioscaffold*, criando células do tipo osteoblástico que são capazes de expressar marcadores osteogénicos e produzir uma matriz extracelular mineralizada. Segundo estes autores, a combinação com *bioscaffolds* 3D foi realizada a fim de produzir um dispositivo de CE dentárias - *bioscaffold* que possa ser facilmente utilizado pelo cirurgião, durante uma intervenção cirúrgica para reparar qualquer deficiência óssea. Esta abordagem torna-se numa

ferramenta promissora para restaurar defeitos ósseos e deficiências que, atualmente, são tratadas cirurgicamente através da aplicação de implantes artificiais.

Li *et al.* (2011), avaliaram a diferenciação osteogénica de DPSC *in vitro* e formação de tecido ósseo quando transplantados num *scaffold* tridimensional de gelatina *in vivo*, verificando se as DPSCs são adequadas para promover a regeneração óssea. Neste estudo, concluiu-se que as DPSCs expressam marcadores osteogénicos e estas células diferenciam-se em osteoblastos. Neste mesmo ano, Liu *et al.*, estudaram a adesão e o crescimento das DPSCs num substrato de fluorapatite, de modo a ser avaliada a biocompatibilidade, resposta celular e crescimento destas células. Estes autores, concluíram que uma estrutura de fluorapatite melhora a resposta celular das CE, uma vez que proporciona um ambiente favorável para o crescimento e interação das CE, a longo prazo.

Mangano *et al.* (2011), avaliaram o comportamento das DPSCs perante um *bioscaffold* de hidroxiapatite porosa natural. Estes autores, concluíram que as células perante um *bioscaffold* são capazes de promover mineralização dos osteoblastos e produzir proteínas morfogenéticas ósseas.

Em 2010, Kenmotsu *et al.*, investigaram as características das CE da polpa de ratos jovens e idosos. O estudo, através da análise da fluorescência, demonstrou uma diminuição de CE com a idade e um aumento de senescência celular. Neste mesmo ano, Yu *et al.*, avaliaram o potencial de diferenciação das DPSCs através da expressão de STRO-1. Com este estudo, os autores, sugerem que as DPSCs que expressam STRO-1 conseguem criar subpopulações progenitoras de odontoblastos, osteoblastos e condrócitos, que podem formar dentina, osso e cartilagem.

Paino e colaboradores (2010) demonstraram pela primeira vez que as DPSCs diferenciam-se *in vitro* numa linhagem melanocítica, apresentam características morfológicas e moleculares dos melanócitos e são capazes de formar os melanócitos funcionalmente ativos.

Em 2012, Miyagi *et al.*, demonstraram que as DPSCs podem ser precursoras de um tipo de tumor odontogénico - mixoma. As CE da polpa dentária tal como o mixoma expressam MMP-2 (metaloproteinases da matriz) - degradam os componentes da matriz extracelular e são encontradas nos tumores invasivo, e ácido hialurónico. Contudo são necessários mais estudos que possam comprovar e esclarecer a histogénese dos tumores odontogénicos.

6.2- Células Estaminais de Dentes Decíduos

A transição de dentição decídua para dentição permanente é um processo evolutivo, dinâmico e complexo, no qual o desenvolvimento e a erupção dos dentes permanentes devem estar em sintonia com a reabsorção das raízes dos dentes decíduos. As SHEDs apresentam características semelhantes às CE do cordão umbilical, daí serem células em constante estudo na área da bioengenharia tecidual (Telles *et al.* 2011).

As CE também podem ser isoladas a partir da polpa dentária de dentes em esfoliação e da polpa dentária imatura de dentes decíduos. Estas células têm uma maior taxa de proliferação, são capazes de induzir a formação de osso e dentina e diferenciam-se em tecidos não-dentários, derivados de células mesenquimais (Suchánek *et al.* 2010; Estrela *et al.* 2011). No entanto, ao contrário das DPSC, não são capazes de regenerar completamente a dentina e a polpa (Gronthos *et al.* 2000).

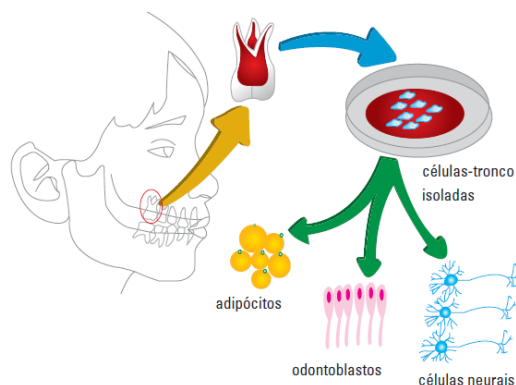


Figura 12 - Células estaminais de dentes decíduos: apresentam alta capacidade de se diferenciarem em odontoblastos, adipócitos ou células neurais (fonte: Soares *et al.* 2007).

Com base na capacidade das SHEDs suprimirem as respostas imunes e promoverem imunomodulação vários estudos e avanços se tem dado na medicina regenerativa (Jorgensen, 2010).

Em 2003, Miura *et al.*, isolaram pela primeira vez SHEDs e demonstraram que estas células distinguem-se das DPSCs, uma vez que têm: uma maior taxa de proliferação; maior número de divisões celulares; formam colónias; são osteo-indutoras *in vivo* e formam dentina, embora não sejam capazes de originar um complexo dentino-pulpar organizado. Estes autores definem as SHEDs como imaturas comparativamente com as outras CE dentárias.

Com o potencial osteoindutor, as SHEDs, podem reparar defeitos ósseos críticos, promovendo a formação óssea. Dada à capacidade de produzir e excretar fatores neurotróficos, as CE dentárias podem ser benéficas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como Parkinson, e reparação neuronal após lesão (Estrela *et al.* 2011).

Em 2009, Koyama *et al.* demonstraram que as SHEDs expandem-se *in vitro* e tem capacidade de diferenciação osteoblástica, condrogénica e adipogénica.

Em 2010, Alipour *et al.*, analisaram e compararam a expressão de marcadores de CE derivados do tecido adiposo e de dentes decíduos humanos. Concluíram que ambas as populações de CE mesenquimais expressam marcadores CD44, CD90 e CD13 com intensidade similar, e não expressam marcadores hematopoiéticos como CD11b, CD19 e CD34, nem antigénios de linfócitos ou leucócitos, como CD3, CD7, CD20, CD14, CD45, CCR5 (CD195), CD11B e CD10. Os dois tipos de células demonstraram diferentes níveis de expressão em CD56 e CD146, sendo que as CE de dentes decíduos em esfoliação foram positivos para CD105. Concluindo-se que ambas as populações de CE mesenquimais têm marcadores fenotípicos comuns, podendo ser possível que CE mesenquimais sejam isoladas e cultivadas a partir da polpa de dentes decíduos em esfoliação. Um ano depois, Nourbakhsh *et al.*, provaram que as SHEDs expressam marcadores específicos das células mesenquimais, nomeadamente os antigénios STRO-1, CD 146, CD45, CD90, CD106 e CD166, e não expressam nem marcadores

hematopoiéticos nem endoteliais, como CD34 e CD31. Concluindo que as SHEDs são capazes de expressar vários marcadores neurais, como nestina e β III tubulina, *in vitro*. Assim, estas CE, perante um ambiente apropriado, são capazes de produzir tecidos do tipo neural.

Eslaminejad *et al.*(2010), publicaram um artigo que comparava, *in vitro*, as DPSCs com as SHEDs. Estes autores concluíram que as DPSCs têm maior capacidade de proliferação e expansão que as SHEDs, tornando os dentes permanentes mais apropriados para serem usados na medicina regenerativa.

Gomes *et al.* (2010), demonstraram, num estudo animal, que as SHEDs têm a capacidade de regenerar tecido da córnea.

Em 2011, Janebodin *et al.*, mostraram que as SHEDs de ratos têm propriedades das CE da crista neural. Segundo estes autores, alguns estudos demonstram que na polpa dentária de dentes decíduos podem ser encontradas células derivadas da crista neural tal como células não derivadas da crista neural durante o desenvolvimento do dente.

Contrariamente às DPSCs que são altamente proliferativas e mantêm as características após uma cultura prolongada, estudos com as SHED demonstram estas células não mantêm as suas propriedades após a criopreservação de 2 anos (Volponi, Pang e Sharpe, 2010 citando Papaccio *et al*, 2006).

6.3 - Células Estaminais do Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado que fixa o dente ao osso alveolar e apresenta CE. Estas células têm a capacidade de se autorrenovarem, expressar marcadores de CE mesenquimais e diferenciarem-se em diferentes linhagens de células mesenquimais - cimentoblastos, osteoblastos, fibroblastos, adipócitos e tecido conjuntivo rico em colagénio tipo I (Volponi, Pang e Sharpe, 2010; Demarco *et al.* 2011; Estrela *et al.* 2011; Choi *et al.* 2011).

A noção de que existem PDLSCs, deve-se à capacidade reparadora que as células do ligamento periodontal apresentam, uma vez que são capazes de se diferenciar em diferentes linhagens de CE (Alves, Lins e Barboza, 2010).

Em 2009, Kadar *et al.*, relataram o isolamento, cultura e caracterização das DPSCs e PDLSCs. Estes autores mostraram que estas células têm um elevado potencial na reconstrução dentária, óssea e em tratamentos de doenças neurodegenerativas.

Em 2010, Yuan *et al.*, testaram o papel da sialoproteína dentinária (DSP) na indução de CE mesenquimais e na reparação de tecido dentário. Esta sialoproteína é uma proteína da matriz extracelular da dentina, sendo considerada como um marcador único da dentinogênese, desempenha um papel vital na diferenciação dos odontoblastos e mineralização da dentina. Este estudo sugere que a DSP é um agente efetivo, com natureza terapêutica, sem quaisquer efeitos colaterais para estimular a regeneração da polpa dentária, formação de dentina e reparação dos tecidos dentários. Neste contexto, os autores sugerem que a DSP seja usada como um procedimento restaurador, em que é implantado na lesão (cárie ou fratura), de modo a promover a regeneração do complexo dentino-pulpar.

Ding *et al.* (2010), demonstraram, em modelos suínos, que através de PDLSCs é possível reparar defeitos ósseo, sem haver rejeição imunológica, devido à baixa imunogenicidade e função supressora das células PDLSCs. Estes autores, desenvolveram um procedimento padrão para que seja possível usar PDLSCs alogénicas no tratamento da doença periodontal.

Em 2010, Kim *et al.*, investigaram os efeitos imunomoduladores das PDLSCs dos dentes caninos em células mononucleares do sangue periférico alogénicas e xenogénicas. Este estudo foi o primeiro a estudar a inibição imuno-celular xenogénica das PDLSCs. Concluiu-se que, de facto, existe um efeito imunomodulador e que este efeito não é resultado da apoptose das células do sistema imunológico, mas causado pela inibição da divisão celular dessas mesmas células.

Okubo *et al.*(2010), avaliaram a capacidade dos fibroblastos derivados do ligamento periodontal se diferenciarem em células vasculares e construir estruturas dos vasos sanguíneos. Também avaliaram as características morfológicas e o mecanismo intracelular molecular subjacente à atividade angiogénica destas células. Estes autores concluíram que a linhagem fibroblástica do ligamento periodontal poderia ser um precursor candidato para a construção de um sistema vascular em torno do tecido danificado, facilitando a sua regeneração.

Estrela e colaboradores (2011) têm demonstrado que as PDLSCs retêm propriedades de CE e são capazes de promover regeneração tecidual. Estas descobertas sugerem que, esta população de células, pode ser usada para criar uma raiz biológica - poderia ser usada como um implante metálico, por capeamento com uma coroa artificial dental.

Em 2011, Choi *et al.*, avaliaram os genes envolvidos na mineralização durante a diferenciação de PDLSCs. Estes autores, concluíram que as PDLSCs, perante um meio apropriado, diferenciam-se em osteoblastos ou cementoblastos e, os genes relacionados com a ligação ao cálcio - *PDE1A*, *PCDH9*, são fortemente expressos na fase da maturação da matriz, podendo estar associadas com a diferenciação das PDLSCs em osteoblastos ou cementoblastos.

6.4 - Células Estaminais da Papila Apical

As SCAPs, tal como o nome indica, são isoladas a partir da papila dentária. É um tecido embrionário que origina-se durante a formação da coroa e está localizado no ápice da raiz do dente em crescimento. O tecido da papila apical só está presente durante o desenvolvimento da raiz do dente, antes de romper na cavidade oral (Volponi, Pang e Sharpe, 2010; Demarco *et al.* 2011; Estrela *et al.* 2011).

As SCAPs formam odontoblastos e osteoblastos, expressam marcadores neurogénicos e miogénicos e regeneram dentina, nomeadamente a nível apical, promovendo a apicogénese em dentes permanentes imaturos infetados por periodontite apical ou abscesso. Este tecido pode ser beneficiado pela sua circulação colateral, o que lhe permite sobreviver durante o processo de necrose pulpar. Após a desinfeção canal por

meios endodônticos, estas células dão origem a odontoblastos primários que têm a capacidade de completar a formação de raiz (Demarco *et al.* 2011; Estrela *et al.* 2011).

Em 2011, Abe *et al.*, publicaram um artigo em que caracterizaram as propriedades radiológicas das SCAPs. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que as SCAPs, perante a radiação, exibem uma redução significativa da capacidade de formação de tecido duro, *in vivo*. Segundo os autores, esta redução significativa pode ser devido à irradiação alterar a diferenciação e a mineralização, promovendo a inibição da diferenciação das CE e/ou a irradiação induzir a morte celular das SCAPs, resultando numa redução da função das células diferenciadas sem afetar o processo de diferenciação.

Para manter e regular as CE o microambiente desempenha um papel fundamental *in vivo*, no entanto, o nicho das SCAPs ainda não está bem caracterizado e as interações não são conhecidas (Abe *et al.* 2011).

DPSCs versus SCAP

A distinção entre polpa dentária e papila apical é que papila apical é o tecido precursor da polpa radicular. Desta perspetiva, pode-se especular que as SCAPs são semelhantes às CE que residem na papila dentária que dá origem aos odontoblastos produtores de dentina coronária. Uma vez que a papila apical se transforma em polpa, é pouco claro se as SCAPs convertem-se em DPSCs ou as DPSCs são derivadas de um grupo diferente de CE. No entanto, os estudos de Huang, Gronthos e Shi (2009) demonstraram que quando as SCAPs e as DPSCs são comparados *in vitro* exibem algumas diferenças. Em geral, as SCAPs são derivados a partir de um tecido em desenvolvimento, que pode representar uma população das primeiras CE que podem ser uma fonte de células superior para a regeneração do tecido. Além disso, estas células também realçam que o desenvolvimento tecidual pode conter CE dos tecidos maduros.

6.5 - Células Estaminais do Folículo Dentário

O folículo dentário é composto por células ectomesenquimais com disposição laxa que circunda o dente em desenvolvimento. Tem sido considerado um tecido multipotente, devido à capacidade de formar cimento, osso e ligamento periodontal. O folículo dentário tem CE que podem ser isoladas e cultivadas de forma a ser utilizadas em regeneração periodontal e regeneração óssea (Volponi, Pang e Sharpe, 2010; Demarco *et al.* 2011; Estrela *et al.* 2011).

As DFPCs são isoladas a partir de terceiros molares e são caracterizados pela sua rápida fixação em cultura, expressão de marcadores como Nestina e *Notch-1*, e capacidade para formar nódulos de calcificação *in vitro* (Volponi, Pang e Sharpe, 2010).

7 - Aplicação de Células Estaminais em Medicina Dentária

O dente é um órgão complexo, composto por estruturas altamente organizadas. O esmalte dentário é incapaz de autorreparação enquanto que a dentina e o cimento têm capacidade regenerativa (Telles *et al.* 2011). Embora a mucosa oral seja fortemente protegida por um mecanismo de defesa imunitário, o dente é vulnerável à invasão microbiana. Quando esta invasão se manifesta como cárie dentária, a cárie torna-se numa porta de entrada para os tecidos internos através da desmineralização promovida pelos dos microrganismos. Assim o esmalte e a dentina estão comumente sob o ataque ácido, permitindo, assim, o acesso à polpa. Quando a cárie é extensa provoca dor e infeção dos canais radiculares e, muitas vezes, esta infeção propaga-se para o osso alveolar. Devido à anatomia dos canais radiculares, quando estes são infetados, o sistema imunitário não tem capacidade, por si só, de erradicar a infeção (Huang, 2012).

Recentes avanços na engenharia tecidual têm atraído cientistas para testar a possibilidade de regeneração de um dente todo ou parte da estrutura do dente (Watt e Hogan, 2000; Daltoé, Miguita e Mantesso, 2010; Huang *et al.* 2010; Choi *et al.*, 2011; Huang, 2012).

Quando o dente é danificado, mas ainda reversível, a regeneração de partes da estrutura do dente pode prevenir ou retardar a perda desse mesmo dente. A eliminação parcial da polpa infetada - pulpotomia, nem sempre tem os melhores resultados, uma vez que todo o tecido infetado nem sempre é removido, assim, esta abordagem não tem sido uma prática popular clínica (Huang, 2012).

Quando a polpa é diagnosticada com pulpite irreversível, todo o tecido pulpar é removido - pulpectomia. Este protocolo de tratamento, comumente conhecido como tratamento endodôntico, tem sido uma prática clínica comum (Huang, 2012).

A regeneração da dentina depende da vitalidade da polpa, no entanto, a regeneração do tecido pulpar tem sido difícil, uma vez que há pouca irrigação sanguínea. A regeneração de tecido pulpar tem sido uma longa jornada de vários cientistas.

A evidência das CE serem capazes de gerar dentina foi demonstrada por Gronthos *et al.* (2000). Esta descoberta tem impulsionado vários investigadores a estudarem todo o processo de regeneração dentária para que seja possível haver uma terceira dentição natural.

7.1 - Regeneração Dentária

Perder os dentes leva a múltiplas consequências e embora não seja uma ameaça para a vida, a perda de dentes leva a uma má qualidade de vida. A Medicina Dentária contemporânea restaura os dentes perdidos com implantes dentários, tornando-os na reabilitação dentária ideal e preferencial, uma vez, que preserva o osso. Segundo Mitsiadis e Papagerakis (2011), nenhum implante dentário apresenta a solução ideal, uma vez que apresentam várias limitações na funcionalidade e longevidade e não são capazes de mimetizar nem a fisiologia nem a plasticidade dos dentes naturais. Como esta modalidade de tratamento não é aplicável a todos os pacientes podendo falhar, é imprescindível recorrer a outra técnica. A alternativa é a regeneração dentária recorrendo a CE (Kim *et al.* 2010).

A regeneração do dente como um órgão inteiro é certamente muito mais exigente do que a de outros tecidos, tais como o nervo, músculo e osso. Por um lado, a morfogênese do dente é caracterizada por interações sequenciais e recíprocas entre o epitélio dental e o mesênquima - para que haja regeneração dentária todas as fases da formação dentária devem ser mimetizadas e produzidas pelas CE. Por outro lado, a complexidade do dente em termos da sua estrutura e localização anatômica torna difícil a sua regeneração (Harada e Ohshima, 2004).

O dente é uma estrutura contínua do osso alveolar durante e após a sua formação. Esta continuidade é possível através da polpa e do ligamento periodontal. Extrair o dente faz com que esta continuidade seja rompida e que haja danos permanentes. O suprimento sanguíneo e nervoso da polpa está completamente cortado após a extração. A cura do ligamento periodontal só é possível com reimplantação do dente no alvéolo. Se a reimplantação for imediatamente após a sua extração, o ligamento periodontal tenta recuperar. Contudo, se o dente é maduro e tem um pequeno forâmen, o reimplante não é permite restaurar a vascularização ou inervação da polpa, conseqüentemente, a polpa irá necrosar. Se o dente é imaturo, com um ápice amplo tem várias extensões de revascularização e reinervação. No entanto, a recuperação a longo prazo do tecido pulpar é geralmente pobre, levando a calcificação. Devido a estas razões, o autotransplante de um dente (de um alvéolo para outro alvéolo) tem uma viabilidade desfavorável. Estas características indicam a relação inseparável entre os dentes e os seus tecidos de suporte (Huang, 2012).

Portanto, para regenerar um dente completamente funcional, com relação anatômica com o osso alveolar, é necessário que a regeneração acompanhe todas as fases de desenvolvimento dentário.

7.1.1 - Regeneração Óssea

Atualmente, para a reparação de defeitos ósseos periodontais, trauma pós-cirúrgico ou em cirurgia maxilo-facial, utilizam-se enxertos de osso autógeno, xenoenxerto desproteinizado ou substitutos ósseos aloplásticos (Sreenivas *et al.* 2011). Contudo, nenhum material cumpre todas as características ideais para que haja regeneração óssea,

assim, as CE tornam-se atrativas para serem usadas nesta área. Sendo a melhor alternativa através de CE dentária autólogas formar um dente completo ou promover a formação de tecidos periodontais no implante de titânio (Lin *et al.* 2011).

A produção, *in vitro*, de tecido ósseo a partir de CE pode representar um avanço no tratamento de patologias congénitas ou adquiridas e traumas que levam a um defeito ósseo. Além disso as CE dentárias também podem ser usadas para otimizar a osteo-integração e eficiência do próprio implante.

Em 2010, Weir e Xu, publicaram um artigo em que encapsularam CE mesenquimais da medula óssea em pérolas de hidrogel de alginato e incorporaram em cimento de fosfato de cálcio para que pudesse haver regeneração óssea. Estes autores concluíram que este tipo de *scaffold* produz propriedades bastante resistentes, sendo uma ótima opção em aplicações ortopédicas e craniofaciais ou em cirurgias minimamente invasivas que tenham o objetivo melhorar a regeneração óssea. Nesse mesmo ano, Xu, Zhao e Weir, usaram o cimento fosfato de cálcio como *scaffold*, de modo a conseguirem regeneração óssea. Este estudo demonstrou pela primeira vez que as CE do cordão umbilical encapsuladas num *scaffold* são mais potentes e sintetizam mais osso que as CE padrão.

Em 2010, Kim *et al.*, apresentaram, pela primeira vez, a regeneração, *in vivo*, de estruturas semelhantes a um dente através de CE, sem limitações. Segundo os autores, a regeneração de um dente é biologicamente possível devido às raízes, nomeadamente o osso alveolar e o ligamento periodontal, uma vez que, posteriormente, a estas raízes pode-se fixar uma coroa protética. As CE ganham, assim, uma maior importância na regeneração dentária.

Feitosa *et al.* (2010), pela primeira vez verificaram os efeitos das CE mesenquimais da medula óssea de ovinos e da polpa dentária imatura humana em ovinos com osteonecrose induzida da cabeça do fêmur. O estudo demonstrou que as CE mesenquimais injetadas na cabeça do fêmur encontravam-se viáveis após o transplante no novo sítio e proliferaram em pouco tempo. Os dados histológicos sugerem que a regeneração óssea nos animais transplantados com polpa dentária imatura humana foi mais rápida do que nos animais submetidos somente a descompressão central. Assim,

pode-se concluir que o transplante de CE mesenquimais na osteonecrose da cabeça do fêmur induzida através da técnica de descompressão central é um procedimento seguro e aparentemente favorece a regeneração óssea de tecidos lesados. Estes autores concluíram que estas CE dentárias foram capazes de promover a regeneração óssea, demonstrando que as DPSCs são úteis no tratamento de osteonecrose.

As DPSCs tornam-se úteis na regeneração óssea, porque, além de serem de fácil obtenção e não apresentam custos adicionais para o paciente, uma vez que estas células obtêm-se de dentes extraídos por cárie ou devido a tratamentos ortodônticos. Estas células têm a capacidade de proliferarem rapidamente e é possível obter-se uma grande quantidade, de modo a satisfazer as exigências da prática. Portanto, usar DPSCs marcam um novo caminho na regeneração óssea (Li *et al.* 2011).

7.1.2 - Regeneração Periodontal

O periodonto é um conjunto de tecidos especializados que rodeiam e suportam os dentes nos maxilares (Volponi, Pang e Sharpe, 2010). A doença periodontal pode ser definida como uma condição inflamatória dos tecidos de suporte do dente, em resposta a um acúmulo e mineralização do biofilme bacteriano (Joseph *et al.* 2010; Reis; Borges; Carlo, 2011). Os microrganismos iniciam a dissolução dos componentes de proteína em fragmentos, esta proteólise de macromoléculas da matriz gera fragmentos bioativos, como fibronectina, que acentuam a doença periodontal (Joseph *et al.* 2010). Manifesta-se clinicamente com perda dos tecidos periodontais, nomeadamente o ligamento periodontal, cimento e o osso alveolar (Mudda e Bajaj, 2011). Estas lesões progredem para periodontite, levando ao colapso das estruturas de suporte do dente e, consequentemente, mobilidade dentária e perda desse mesmo dente (Struillou *et al.* 2011). Estas patologias, muitas vezes, estão associada com doenças sistémicas, tais como diabetes e doenças cardiovasculares (Ding *et al.* 2010).

O objetivo do tratamento periodontal deve ser a regeneração do tecido periodontal. A regeneração periodontal pode ser definida como a restauração completa destes tecidos. Como os meios convencionais de regeneração periodontal, tais como, regeneração tecidual guiada, têm indicações limitadas e as quantidades de tecido regenerado é

imprevisível, através das CE pode-se contornar esta barreira. As CE são úteis em abordagens de regeneração periodontal e em terapia reconstrutiva (Mudda e Bajaj, 2011).

O interesse por novas terapias de modo a restaurar a integridade estrutural do periodonto, tem ganho novas perspectivas com os avanços da bioengenharia tecidual, nomeadamente com a utilização de CE (Costa, Miguel e Rosa, 2005; Alves, Lins e Barboza, 2010).

O grande desafio desta área é formar um novo ligamento periodontal e osso, assegurando que o ligamento tem a capacidade de exercer a sua função, mantendo o dente no alvéolo, mantendo a integridade e a função da mastigação, durante um longo período de tempo (Volponi, Pang e Sharpe, 2010).

Em 2010, San Miguel *et al.*, caracterizaram uma população de células presentes no periodonto que expressam α SMA-GFP (modelo transgénico de músculo liso α -actina promotor com expressão da proteína verde fluorescente) e têm a capacidade de gerar osteoblastos maduros. Concluindo que em combinação com marcadores de células periodontais maduras, através de procedimentos em expansão, isolamento e transplante é possível regenerar tecidos periodontais.

Em 2010, Joseph *et al.*, publicaram um estudo em que tinha o objetivo determinar os efeitos diretos da fibronectina 120 induzida pela metaloproteinases da matriz na regulação do fenótipo osteoblástico das células do ligamento periodontal. Concluindo que a fibronectina contribuem para a perda óssea e inibição da regeneração óssea em doenças periodontais. Estes autores sugerem que existem fatores que regulam o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

Em 2010, Feng *et al.*, analisaram a viabilidade e a segurança da reconstrução dos defeitos periodontais infra-ósseos com um implante autólogo de PDLSCs. Neste estudo, os autores, demonstraram de as PDLSCs são a nova aposta no tratamento de doenças periodontais.

Em 2010, Dangaria *et al.*, com o objetivo de explorarem novas técnicas de regeneração periodontal, testaram o efeito dos sinais periodontais da matriz extracelular, do fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), fator de crescimento do tecido conectivo (CTGF) e a adesão celular do péptido Arg-Gli-Asp (RGD) na diferenciação de dois tipos de células progenitoras: PDLSCs e DFSCs. Estes autores concluíram que a expressão morfológica dos genes e os dados imunohistoquímicos revelam que os fatores de crescimento da matriz extracelular, tais como FGF2 e CTGF induzem as PDLSCs a se diferenciarem, quando estão perante um microambiente adequado, num novo ligamento.

Lin *et al.*, em 2011, sugeriram que o ligamento periodontal derivado de DPSCs pode modificar geneticamente os tecidos que envolvem o implante de titânio, promovendo a formação de um novo ligamento periodontal. Estes autores mostraram que com utilização de Matrigel, matriz usada para estudar a diferenciação celular (Lin *et al.* 2011 citando Kleinman e Martin, 2005) é possível regenerar o ligamento periodontal de ratos, na interface de um implante-alvéolo-osso. Neste mesmo ano, Zhao *et al.*, mostraram que a proteína LMP1 num estágio inicial é capaz de regular a diferenciação do ligamento periodontal na osteogénese, induzindo a formação óssea. Estes autores concluíram que para haver proliferação celular e diferenciação do ligamento periodontal é necessário a presença da proteína LMP1.

De acordo com a literatura consultada, o ligamento periodontal torna-se numa fonte autógena, fácil e eficiente de CE mesenquimais, com capacidade de expansão e diferenciação em cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos.

Espera-se que, num futuro próximo, a regeneração periodontal seja possível, havendo soluções fiáveis para o tratamento de sequelas de doenças periodontais e que, com a ajuda da bioengenharia tecidual, seja possível usar CE que promovam uma completa regeneração do periodonto.

7.1.3 - Endodontia Regenerativa - Regeneração do Complexo Dentino-Pulpar

A vitalidade pulpar é extremamente importante para tornar um dente viável, uma vez que fornece a nutrição e tem a capacidade de responder a estímulos nocivos. Devido à

posição anatômica e à organização pulpar, as infecções tornam-se irreversíveis, sendo necessário fazer um tratamento endodôntico. O tratamento endodôntico baseia-se na remoção da polpa, de modo a remover-se todas as bactérias, e, posteriormente, preencher os canais com uma material inorgânico, como os cimentos, conferindo resistência ao dente (Zhang e Yelick, 2010; Volponi, Pang e Sharpe, 2010; Demarco *et al.* 2011; Neha *et al.* 2011)).

Atualmente, o protocolo clínico do tratamento endodôntico sacrifica os tecidos, de modo a que o canal fique desinfetado. Este tratamento impossibilita qualquer processo regenerativo, uma vez que o canal é preenchido por materiais artificiais, fazendo com que a viabilidade do dente esteja comprometido a longo prazo. A possível regeneração do complexo dentino-pulpar torna-se numa técnica eletiva para que o dente aumente a sua longevidade. Assim, a manutenção e a regeneração da vitalidade pulpar é fundamental para viabilizar o dente a longo prazo.

Atualmente, as CE fornecem a solução mais promissora, nesta área, sendo o ideal, usar DPSCs autólogas, contudo nem sempre estão disponíveis. Deste modo, as iPS podem ser uma fonte de células alternativa usadas na regeneração endodôntica (Huang, 2009).

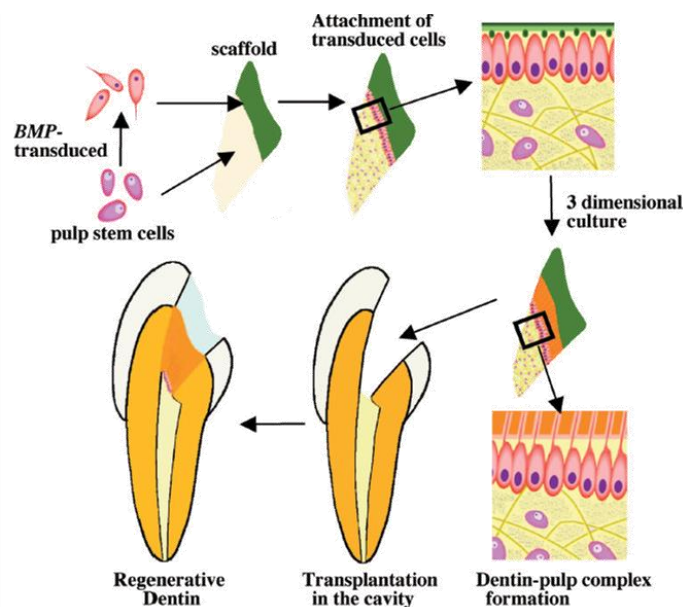


Figura 13 - Regeneração do complexo dentino-pulpar através de células estaminais da polpa dentária (fonte: Nakashima e Akamine, 2005).

Embora a polpa seja muito pequena, é altamente organizada e complexa, e para ser possível a sua regeneração deve ser: vascularizada e inervada, conter densidade e arquitetura semelhante à polpa natural, sendo capaz de originar novos odontoblastos, produzindo nova dentina. Assim, quanto maior for a abertura do ápice do dente mais provável e favorável é a ocorrência de angiogénese. Portanto, os dentes imaturos com ápices abertos são os melhores candidatos para a regeneração do tecido pulpar. A utilização de fatores indutores angiogénicos tais como VEGF e/ou derivado de PDGF melhoram e aceleram a angiogénese (Zhang e Yelick, 2010).

Em 2009, Huang, publicou que as DPSCs, as SHEDs e as SCAPs são capazes de regenerar tecido pulpar e as DPSC e as SCAP são capazes de regenerar tecido dentinário.

Em 2010, Huang *et al.*, testaram a possibilidade de regenerar tecido vascularizado da polpa dentária através de CE. Estes autores isolaram SCAPs e num *scaffold* sintético de PGLA, demonstraram pela primeira vez que as SCAPs são capazes de regenerar tecido pulpar, promovendo a produção de dentina nas paredes do canal. Neste mesmo ano, Miura *et al.*, avaliaram o efeito citotóxico de materiais endodônticos como Hidróxido de Cálcio, Paramonoclorofenol Canforado, Otosporin e Formocresol nas DPSCs. Estes investigadores concluíram que todos os materiais endodônticos avaliados são citotóxicos para as DPSCs, o Hidróxido de Cálcio é o que apresenta menor toxicidade.

Em 2011, Yamagishi *et al.*, investigaram o efeito da *Porphyromonas Gingivalis* sobre a expressão da sialoproteína e osteocalcina através da estimulação das DPSC. Este estudo concluiu que, para que haja regeneração, é necessário tratar da infeção canalar, caso contrário não é possível haver regeneração.

Mais pesquisas são necessárias para que haja regeneração do complexo dentino-pulpar, de modo a que a endodontia regenerativa seja possível e concretizável.

7.1.4 - Regeneração do Esmalte

O maior desafio da regeneração dentária foca-se na regeneração do esmalte. Uma vez que o esmalte é produzido por ameloblastos e estes morrem antes da erupção dentária, não há possibilidade de produção de esmalte secundário, de modo a recuperar de forma fisiológica o tecido perdido. Tal como acontece com outras estruturas dentárias, zonas com o esmalte desgastado sofrem remineralização espontânea através da incorporação de iões de cálcio e de fosfato, quando presentes na cavidade oral. Este processo ocorre a uma taxa muito lenta, eficaz em fases precoces de desmineralização, no entanto não é suficiente para compensar as perdas significativas de esmalte, devido à constante atividade bacteriana e ação dos ácidos. Os fluoretos aumentam a remineralização do esmalte "natural", uma vez que reduzem a dissolução ácida, tornando o esmalte mais resistente ao ataque ácido, contudo, não promovem a regeneração deste tecido (Koussoulakou, Margaritis e Koussoulakos, 2009).

Deste modo, para que haja regeneração do esmalte, as CE devem: reproduzir as fases de formação de esmalte, transição, secreção e maturação; promover o movimento celular durante a aposição de esmalte; vascularização e transporte de iões e produção e secreção adequada de proteínas (Mitsiadis e Papageraskis, 2011).

8 - Regeneração Neuronal com Células Estaminais Dentárias

Arthur *et al.*, em 2009, publicaram a primeira evidência direta que as CE dentárias têm neuroplasticidade. Estas células são capazes de se diferenciarem em neurónios funcionalmente ativos, quando implementados em ambientes adequados.

Em 2010, Yamaza *et al.*, pesquisaram sobre as propriedades imunomoduladoras das SHEDs. Concluindo que estas CE são capazes de se diferenciarem em células odontogénicas e adipogénicas, uma vez que, expressam marcadores específicos das células mesenquimais. Neste estudo, também pesquisou-se o efeitos das SHEDs em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistémico e concluiu-se as SHEDs são uma fonte viável e de fácil acesso no tratamento de doenças imunológicas.

Wang J. *et al.* (2010) estudaram a capacidade das SHEDs se diferenciarem em células neuronais do tipo dopaminérgico, de modo a ser possível atenuar os sintomas da doença de Parkinson. Neste estudo, sugeriram que estas CE são capazes de se diferenciarem em neurónios, oferecendo uma fonte promissora no tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como, doença de Parkinson.

Segundo Souza *et al.* (2003) a possibilidade de restaurar a função das células e dos tecidos, sem utilizar drogas imunossupressoras e sem o risco de haver rejeição, torna as CE uma fonte promissora no tratamento de doenças degenerativas, tais como Parkinson e Esclerose Múltipla.

Em 2010, Galan *et al.*, concluíram que as CE através da capacidade de recuperação de neurónios afetados, poderá ser uma terapêutica para a doença neurodegenerativa Esclerose Lateral Amiotrófica. As vantagens da utilização destas células são porque as CE libertam fatores neurotróficos, são capazes de modular a inflamação e impedem a degeneração dos neurónios motores, melhorando a função motora muscular e levando à neuroprotecção. Contudo são necessários mais estudos para que se possa usar com fiabilidade as CE como terapia desta doença.

Li, Ping e Liao (2010), concluíram que as PDLSCs têm capacidade de se diferenciarem em células neurais, *in vitro*. Estes resultados demonstraram que a diferenciação destas células pode ser usada em terapias regenerativas do tecido nervoso ao redor do implante melhorando a os sinais de percepção sensitiva.

Em 2011, Nourbakhsh *et al.*, demonstraram que as SHEDs são capazes de produzir tecido neuronal, perante um ambiente apropriado. Deste modo, as SHEDs úteis no tratamento de doenças neurodegenerativas. Neste mesmo ano, Snyder *et al.* concluíram que, mesmo em desordens genéticas, tal como na doença de Huntington, as CE dentárias mantêm as suas características de CE e podem ser usadas com fim terapêutico.

Em 2012, Sakai *et al.* publicaram um estudo que avalia a atividade neuro-regenerativa das DPSCs e das SHEDs, após uma lesão a nível da medula espinal. Neste estudo as CE dentárias exibiram três principais atividades neuro-regenerativas: inibição da apoptose

induzida pela lesão dos neurónios, astrócitos e oligodendrócito, melhorando e preservando os filamentos neuronais e as bainhas de mielina; promoveram a regeneração dos axônios seccionados e substituíram as células perdidas. Estes dados demonstram que as CE dentárias podem proporcionar benefícios terapêuticos para o tratamento de lesões da medula espinal.

Ano	Artigo	Tipo de estudo	Tipo de CE	Resultados
2000	Gronthos <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Isolaram pela 1ª vez DPSC de terceiros molares permanentes
2003	Miura <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHED	Isolaram pela 1ª vez SHED, sendo diferentes da DPSC
2009	Yu <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Pressão hidrostática influencia as DPSC na regeneração de tecido duro
2009	Woods <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Viáveis até 5 dias após extração dentaria
2009	Kadar <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC PDLSC	Reconstrução dentária óssea - tratamentos neurodegenerativos
2009	Koyama <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHED	Diferenciação: osteoblástica, condrogénica e adipogénica
2010	Balic e Mina	<i>In vitro</i>	DPSC	A polpa dentária dos incisivos inclusos têm propriedades de CE mesenquimais.
2010	Wang <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	DPSC	Presença de DPSC em dentes com pulpite irreversível
2010	Riccio <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Diferenciação: osteoblástica - úteis em defeitos ósseos
2010	Alge <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Diferenciação: osteogénica, condrogénica e adipogénica
2010	Yu <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Diferenciação: odontoblástica, osteoblástica e condrogénica
2010	Kenmotsu <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Diminuem com a idade e há uma aumento da senescência celular.
2010	Yuan <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	DPSC	Sialoproteína induz as DPSC promovendo a reparação de tecido dentário

2010	Paino <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Diferenciação: linhagem melanocítica
2010	Gomes <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	SHED	Reconstrução do epitélio da córnea
2010	Alipour <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHED	Comparação com tecido adiposo - ambos CE mesenquimais
2010	Eslaminejad <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	SHED	Menor capacidade de proliferação e expansão comparativamente com as DPSC
2010	Ding <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	PDLSC	Tratamentos de doenças periodontais - defeitos ósseos
2010	Okubo <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC	Fibroblastos do ligamento periodontal - regeneração tecido vascular e periodontal
2010	Kim <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC	Efeito imunomodulador
2010	Weir e Xu	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>		<i>Scaffold</i> de pedras de hidrogel de alginato com cimento fosfato de cálcio bom para regeneração óssea
2010	Kim <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>		1ª estudo com regeneração de dum dente com CE
2010	Feitosa <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>		CE dentárias - regeneração óssea em casos de osteonecrose
2010	Egusa <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	iPS	Gengiva - fonte promissora de iPS
2010	San Miguel <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC DFSC	Expressam α SMA-GTP - capacidade de gerar osteoblastos maduros
2010	Joseph <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	PDLSC	O equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção é regulada por fatores das CE.
2010	Feng <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	PDLSC	Tratamento de doenças periodontais
2010	Dangaria <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC	Fatores de crescimento (FGF2 e CTGF) induzem à diferenciação de um novo ligamento periodontal
2010	Huang <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	SCAP	Regeneração complexo dentino-pulpar
2010	Miura <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Materiais endodônticos têm efeitos citotóxicos nas DPSC

2010	Yamaza <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHED	Têm propriedades imunomoduladoras - benéficas no tratamento de doenças imunológicas. Diferenciação: odontogénica e adipogénica
2010	Wang <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SHED	Diferenciação: células neurais - tratamento de doenças neurodegenerativas
2010	Li, Ping e Liao	<i>In vitro</i>	PDLSC	Diferenciação: células neurais
2011	Zhao <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC	Proteína LMP1 regula a proliferação celular e a diferenciação do ligamento periodontal
2011	Kim <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC PDLSC	Têm características das CE mesenquimais
2011	Mangano <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	<i>Scaffold</i> Biocoral (Hidroxiapatite porosa natural) permite diferenciação e promovem mineralização dos osteoblastos
2011	Janebodin <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	DPSC	Têm propriedades da CE da crista neural
2011	Nourbakhsh <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	SHED	Produção de tecido neuronal - tratamento de doenças neurodegenerativas
2011	Choi <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	PDLSC	Diferenciação: osteoblástica e cementoblástica
2011	Abe <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	SCAP	Após radiação menor formação de tecido duro
2011	Li <i>et al.</i>	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	DPSC	Apresentam marcadores osteogénicos e diferenciação: osteoblástica
2011	Liu <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Eficaz <i>scaffold</i> com fluorapatite
2011	Lin <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	DPSC	Ligamento periodontal derivado das DPSC promovem a formação de um novo ligamento
2011	Yamagishi <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Para que haja regeneração tem-se que tratar da infeção do canal
2011	Snyder <i>et al.</i>	<i>In vivo</i>	DPSC	Em doenças de desordens genéticas as CE

				dentárias mantêm as suas características
2012	Miyagi <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Precusores de tumor odontogénico - mixoma
2012	Sakai <i>et al.</i>	<i>In vitro</i>	DPSC	Benéficas no tratamento de lesão na medula espinal.

Tabela 9 - Resumo de artigos experimentais (expostos cronologicamente)

9 - Perspetivas Futuras

Há vários problemas que devem ser ultrapassados antes de ser possível a formação de um dente, através da bioengenharia tecidual. A parte mais desafiadora da regeneração tecidual é a regeneração funcional.

Segundo Thesleff e Tummers (2009), em primeiro lugar, é necessário encontrar uma fonte adequada de CE dentárias. Em adultos, as restos de Malassez revestem as raízes e são as únicas células epiteliais remanescentes dentárias, mas a capacidade de auro-renovação ainda é desconhecida e são de difícil acesso. As CE mesenquimais estão presentes na polpa dentária e no folículo, sendo capazes de produzir tecidos duros dentários, mas não há nenhuma evidência de competência para dirigir a morfogénese dentária.

Huang (2009) e Suchánek *et al.* (2010) defendem que o estabelecimento de bancos de CE dentárias pode ser um passo necessário no avanço de iPS, para aplicação na regeneração dentária.

Atualmente, a utilização de CE dentárias ainda é limitada, uma vez que, exige a extração de um dente. Assim, torna-se útil a utilização de células reprogramadas, tais como as iPS. Deste modo, o desenvolvimento da tecnologia com a reprogramação de células adultas, abre possibilidades de usar as próprias células do paciente para fins de bioengenharia tecidual, tornando a reprogramação dentária uma possibilidade realista (Thesleff e Tummers, 2009).

10 - Aspetos Éticos

Com o desenvolvimento de todas as investigações de CE o governo português viu-se obrigado a formar leis que limitam e regulam todas estas pesquisas.

A Lei n.º 12/2009 de 26 de Março estabelece o regime jurídico da qualidade e segurança relativa à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento, distribuição e aplicação de tecidos e células de origem humana, nomeadamente as CE.

Esta lei tem como principais objetivos:

- Estimular a investigação científica e o conhecimento sobre CE e sobre as suas aplicações;
- Definir o regime de obtenção e utilização de CE embrionárias;
- Incrementar a atividade económica e empresarial relacionada com CE e terapias celulares.

(Diário da República, 1.ª série - N.º 60 - 26 de Março de 2009)

O Ministério da Saúde no despacho n.º 14879/2009 declara que "a existência de um banco público de células do cordão umbilical permite colocar à disposição de todos os cidadãos células progenitoras hematopoiéticas, necessárias para a terapêutica de transplantação em determinadas doenças hematológicas, imunológicas ou outras. O Banco Público aceitará apenas dádivas altruístas, que serão colocadas à disposição de todos os potenciais recetores, cumprindo, em matéria de princípios, de organização e de rigor técnico, todas as exigências da Lei n.º 12/2009, de 26 de Março" (Diário da República, 2.ª série - N.º 126 - 2 de Julho de 2009)

A Lei n.º 32/2006 de 26 de Julho regula a utilização de técnicas de procriação medicamente assistida. Estas técnicas devem respeitar a dignidade humana, sendo proibida a discriminação com base no património genético ou no fato de se ter nascido em resultado da utilização destas técnicas. No entanto, é permitida a investigação científica com o objetivo de prevenção, diagnóstico ou terapia, levando ao

aperfeiçoamento das técnicas de procriação medicamentosa assistida. Para efeitos de investigação científica podem ser utilizados:

- Embriões criopreservados, excedentários, em relação aos quais não exista nenhum projeto parental;
- Embriões cujo estado não permita a transferência ou a criopreservação com fins de procriação;
- Embriões que sejam portadores de anomalia genética grave, no quadro do diagnóstico genético pré-implantação;
- Embriões obtidos sem recurso à fecundação por espermatozoide.

(Diário da República, 1.a série - N.º 143 - 26 de Julho de 2006)

IV- Conclusão

Esta revisão bibliográfica demonstrou-se que a medicina regenerativa tem grande probabilidade de causar um impacto significativo na prática clínica da Medicina Dentária. No entanto, antes de usar qualquer terapia regenerativa é essencial focar-se na prevenção das patologias, uma vez que a vitalidade pulpar é fundamental para a vida funcional de um dente e é uma prioridade em qualquer tratamento dentário.

Os progressos feitos na investigação na área da bioengenharia, tornaram possível a criação *in vitro* de tecidos orais. Contudo, embora o processo de odontogénese seja conhecido e apesar dos avanços obtidos, existem obstáculos a superar para se conseguir substituir um dente perdido.

Atualmente, a literatura é dividida entre os clínicos que testam métodos para formar tecidos simples (osso, dentina, polpa, entre outros) e os bioquímicos que investigam mecanismos para levar à diferenciação celular. Futuramente espera-se conseguir a regeneração do órgão dentário completo para a utilização na reposição de dentes perdidos.

As possibilidades de uso e potencial regenerativo das CE são imensas, tornando-se numa área promissora tanto para a resolução de problemas dentários como outras patologias. Assim, é importante que os médicos dentistas atualizem os seus conhecimentos e acompanhem os avanços científicos, aplicações e limitações das CE. As CE utilizadas de maneira correta promovem esperança e qualidade de vida.

Ainda à poucos anos quem iria imaginar que era possível através de um pino metálico com coroas cerâmicas substituir um dente perdido? Quem iria imaginar que se consegue extrair CE de um dente? Tudo isto tem sido conseguido através de investigações e da vontade árdua de descoberta. Só assim, com estas perspetivas futuristas, têm-se feito descobertas e novos avanços científicos, porque "Deus quer, o homem sonha e a obra nasce" (Fernando Pessoa, 1934).

V - Referências Bibliográficas

Abe, S. *et al.* (2011). Characterization of the radioresponse of human apical papilla-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 2, p.2.

Alge, D.L. *et al.* (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.*, 4(1), pp.73-81.

Alipour, R. *et al.* (2010). Phenotypic Characterizations and Comparison of Adult Dental Stem Cells with Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Prev Med*, 1(3), pp.164-171.

Alves, L.B., Lins, R.D.A.U. e Barboza, C.A.G., (2010). Identificação de células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal e perspectivas na regeneração periodontal: Revisão de literatura. *Odontol. Clín.-Cient.*, Recife, 9 (1), pp.7-12.

Ariffin, S.H.Z *et al.* (2011). Cellular and Molecular Changes in Orthodontic Tooth Movement. *TheScientificWorldJOURNAL*, 11, pp.1788-1803.

Arthur, A. *et al.* (2009). Implanted Adult Human Dental Pulp Stem Cells Induce Endogenous Axon Guidance. *Stem Cells*, 27, pp.2229-2237.

Atlas Odontogênese. Unesp - Faculdade de Odontologia. [Em linha]. Disponível em <<http://www.foar.unesp.br/Atlas/Odontogenese.html>>. [Consultado em 07/06/2012].

Balic, A. e Mina, M. (2010). Characterization of Progenitor Cells in Pulps of Murine Incisors. *J Dent Res*, 89(11), pp.1287-1292.

Berkovitz, B. K. B., Holland, G. R. e Moxham, B. J. (2004). *Anatomia, Embriologia e Histologia Bucal*. 3ª Edição. Porto Alegre, Artmed, pp.1-33,290.

Bianco, P. (2011). Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood*, 117(20).

Bragança, J., Tavares, A. e Belo, J. A. (2010). Células estaminais e medicina regenerativa - Um admirável mundo novo. *canal BQ*, 7.

Células estaminais. [Em linha]. Disponível em <<http://celulasestaminaiseeq.blogspot.pt/2011/01/tipos-de-celulas-estaminais.html>>. [Consultado em 13/06/2012].

Choi, H. *et al.* (2011). Analysis of gene expression during mineralization of cultured human periodontal ligament cells. *J Periodontal Implant Sci*, 41, pp.30-4.

Correia, R. e Bragança, J. (2010). Células estaminais adultas em medicina. *canal BQ*, 7.

Costa, E. F., Fischer, R. G., Figueiredo, C. M. S. (2008). Aplicações de células-tronco na terapia periodontal. *Rev. bras. odontol.*, Rio de Janeiro, 65 (1), pp.126-130.

Costa, R.C.C., Miguel, F.B. e Rosa, F.P. (2005). Estratégias de bioengenharia tecidual na reconstrução óssea. *R. Ci. Méd. biol.*, Salvador, 4(1), pp.70-76.

Cox, J. L. e Rizzino, A. (2010). Induced Pluripotent Stem Cells: What Lies Beyond the Paradigm Shift. *Exp Biol Med (Maywood)*, 235(2), pp.148-158.

Daltoé, F. P., Miguita, L. E Mantesso, A. (2010). Terceira dentição: uma visão geral do seu desenvolvimento. *Rev Gaúcha Odontol.*, Porto Alegre, 58(3), pp.387-392.

Dangaria, J.S. *et al.* (2010). Extracellular Matrix-Mediated Differentiation of Periodontal Progenitor Cells. *Differentiation*, 78(2-3), pp.79-90.

Demarco, F. F. *et al.* (2011). Dental Pulp Tissue Engineering. *Braz Dent J*, 22(1), pp.3-1.

Diário da República. (2006). 1.^a série. n.º 143.

Diário da República. (2009). 1.^a série. n.º 60.

Ding, G. *et al.* (2010). Allogeneic Perodontal Ligament Stem Cell Therapy for Periodontitis. *Swine in Stem Cells*, 28, pp.1829-1838.

Djouad, P. *et al.* (2010). Activin A expression regulates multipotency of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(11).

Egusa, H. *et al.* (2010). Gingival Fibroblasts as a Promising Source of Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, 5 (9).

Eslaminejad, M.R.B. *et al.* (2010). In vitro Growth and Characterization of Stem Cells from Human Dental Pulp of Deciduous Versus Permanent Teeth. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences*, 7 (4).

Estrela, C., *et al.* (2011) Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*, 22(2), pp. 91-98.

Feitosa, M. L. T. *et al.* (2010). Successful transplant of mesenchymal stem cells in induced osteonecrosis of the ovine femoral head. Preliminary results. *Acta Cir Bra*, 25(5), pp.416-422.

Feng, F. *et al.* (2010). Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis*, 6(1), pp.20-28.

Feng, J. *et al.* (2011). Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *PNAS*, 108(16).

Galan, L. *et al.* (2010). Terapia celular en la esclerosis lateral amiotrófica ciencia y controversia. *Neurologia*, 25(8), pp.467-469.

García-Olmo, D. *et al* (2008). *Cell Therapy*. Madrid, McGraw-Hill, pp.16-26, 45-47, 435.

Giordano, G. *et al*. (2011) Stem cells from oral niches: a review. *Annali di Stomatologia*, II (1-2), pp. 3-8.

Gomes, J.A.P. *et al*. (2010). Corneal Reconstruction with Tissue-Engineered Cell Sheets Composed of Human Immature Dental Pulp Stem Cells. *IOVS*, 51(3).

Gomes, T.L. e Pranke, P. (2008). Comparison between preterm and full-term newborn umbilical cord blood stem cells: a review. *RBAC*, 40(1), pp.25-30.

Gronthos, S., *et al*. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 97 (25), pp.13625-13630.

Grottkau, B.E., Purudappa, P.P. e Lin, Y. (2010). Multilineage Differentiation of Dental Pulp Stem Cells from Green Fluorescent Protein Transgenic Mice. *Int J Oral Sci*, 2(1), pp.21-27.

Handrigan, G.R.; Leung, K.J. e Richman, J.M. (2010). Identification of putative dental epithelial stem cells in a lizard with life-long tooth replacement. *Development and Stem Cells*, 137, pp.3545-3549.

Harada, H. e Ohshima, H. (2004) New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histl Cytol*, 67(1), pp.1-11.

Hau, G.R., *et al* (2006). Preliminary survey on the possibilities of attainment of spare teeth through stem-cells. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*, 12(2), pp.29-38.

Honda *et al*. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *Journal of Oral Science*, 52(4), pp.541-552.

Huang, G.T.J. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med.*, 4(5), pp.697-707.

Huang, G.T.J. (2012). Dental Pulp and Dentin Tissue Engineering and Regeneration - Advancement and Challenge. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, pp.788-800.

Huang, G.T.J. *et al.* (2010). Stem/Progenitor Cell-Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an In Vivo Model. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 16(2).

Huang, G.T.J.; Gronthos, S. e Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role. *Regenerative Medicine. J Dent Res*, 88(9), pp.792-806.

Janebodin, K. *et al.* (2011). Isolation and Characterization of Neural Crest-Derived Stem Cells from Dental Pulp of Neonatal Mice. *PLoS ONE*, 6(11).

Jewett, A. e Tseng H.C. (2011). Tumor Induced Inactivation of Natural Killer Cell Cytotoxic Function; Im-plication in Growth, Expansion and Differentiation of Cancer Stem Cells. *Journal of Cancer*, 2, pp.443-457.

Jorgensen, C. (2010). Mesenchymal stem cells immunosuppressive properties: is it specific to bone marrow-derived cells?. *Stem Cell Res Ther*, 1(2), p.15.

Joseph, J. *et al.* (2010). Disease-Associated Extracellular Matrix Suppresses Osteoblastic Differentiation of Human Periodontal Ligament Cells via MMP-1. *Calcif Tissue Int.*, 86(2), pp.154-162.

Junqueira, L.C. e Carneiro, J. (2004). *Histologia Básica*. 10 Edição. Guanabara Koogan, pp.287-292.

Kadar, K. *et al.* (2009). Differentiation Potential of Stem Cells From Human Dental Origin - Promise For Tissue Engineering. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 60(7), pp. 167-175.

Kenmotsu, M. (2010). Analysis of side population cells derived from dental pulp tissue. *International Endodontic Journal*, 43, pp.1132-1142.

Kerkis, I. *et al.* (2006). Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. *Cells Tissues Organs*, 184, pp. 105-116.

Kim, H.S. *et al.* (2010). Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. *J Periodontal Implant Sc*, 40, pp.265-270.

Kim, J.B. *et al.* (2009). Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell*, 136, pp.411-419.

Kim, K. *et al.* (2010). Anatomically Shaped Tooth and Periodontal Regeneration by Cell Homing. *J Dent Res*, 89(8), pp.842-847.

Kim, S. *et al.* (2011). Gene expression profile in mesenchymal stem cells derived from dental tissue and bone marrow. *J Periodontal Implant Sci*, 41, pp.192-200.

Klein, A.M. e Simons, B.D. (2011). Universal patterns of stem cell fate in cycling adult tissue. *Development*, 138, pp.3103-3111.

Kolya, C.L. e Castanho, F.L. (2007). Células-tronco e a Odontologia. *ConScientiae Saúde*, 6(1).

Koussoulakou, D. S., Margaritis, L. H. e Koussoulakos, S. L., (2009). A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration. *Int. J. Biol. Sci.*, 5(3), pp.226-243.

Koyama, N. *et al.* (2009). Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 67, pp.501-506.

Li, J., *et al.* (2011) Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chin Med J*, 124(23), pp.4022-4028.

Li, X.; Ping, G. e Liao, D. (2010). In vitro neural/glial differentiation potencial of periodontal ligament stem cells, *Arch Med Sci*, 6(5) pp. 678-685.

Lin, Y. *et al.* (2011). Bioengineered Periodontal Tissue Formed on Titanium Dental Implants. *J Dent Res*, 90(2), pp.251-256.

Liu, J. *et al.* (2011). Adhesion and growth of dental pulp stem cells (DPSCs) on enamel-like fluorapatite (FA) surfaces. *J Biomed Mater Res A.*, 96(3), pp.528-534.

Malva, J.O. e Bernardino, L. (2010). Células estaminais neurais: a caminho da reparação cerebral. *canal BQ*, vol.7.

Mangano, C. *et al.* (2011). Human Dental Pulp Stem Cells Hook into Biocoral Scaffold Forming an Engineered Biocomplex. *PLoS ONE*, 6 (4).

Mitsiadis, T. A. e Papagerakis, P. (2011). Regenerated teeth: the future of tooth replacement?. *Regen. Med*, 6(2), pp.135-139.

Miura *et al.* (2010). Toxicity Evaluation of Endodontic Materials in Dental Pulp Stem Cells. *Rev Odontol Bras Central*, vol.19(50).

Miura, M. *et al.* (2003). *SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth.* *PNAS*, vol. 100(10), pp. 5807-5812.

Miyagi, S. P. H. *et al.* (2012). Dental pulp stem cells express proteins involved in the local invasiveness of odontogenic myxoma. *Braz Oral Res*, 26(2), pp.139-44.

Mohyeldin, A., Muvdi, T. G. e Hinojosa, A. Q. (2010). Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell*, 7(2), pp.150-161.

Mokry, J. *et al.* (2010). Telomere Attrition Occurs during Ex Vivo Expansion of Human Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.

Morrison, S. J. e Spradling, A. C. (2008). Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*, 132(4), pp.598-611.

Morsczeck, C. *et al.* (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest*, 12, pp.113-118.

Mudda, J.A. e Bajaj, M. (2011). Stem cell therapy: A challenge to periodontist. *Indian J Dent Res*, 22, pp.132-9.

Nakashima, M. e Akamine, A. (2005). The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics. *JOE*, 31(10), pp.711-718.

Neha, K. *et al.* (2011). Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: A recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16(7), pp.e997-1004.

Nourbakhsh, N. *et al.* (2011). Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. *Int. J. Biol.*, 5, pp.189-195.

Okubo, N. *et al.* (2010). Vascular Cell-Like Potential of Undifferentiated Ligament Fibroblasts to Construct Vascular Cell-Specific Marker-Positive Blood Vessel Structures in a PI3K Activation-Dependent Manner. *J Vasc Res*, 47, pp.369-383.

Paino, F. *et al.* (2010). Ecto-Mesenchymal Stem Cells From Dental Pulp Are Committed To Differentiate Into Active Melanocytes. *European Cells and Materials*, 20, pp.295-305.

Papapetrou *et al.* (2009). Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *PNAS Early Edition*, pp.1-6.

Pessoa, F. (1934). *Mensagem*. Edição Parceria António Maria Pereira, Lisboa.

Ravindran, S., Song, Y. e George, A. (2010). Development of Three-Dimensional Biomimetic Scaffold to Study Epithelial–Mesenchymal Interactions. *TISSUE ENGINEERING: Part A*, 16(1), pp.327-342.

Reis, E.C.C., Borges, A.P.B e Carlo, R.J. (2011). Regeneração periodontal em cães. *Ciência Rural*, vol.41(12), pp.2128-2136.

Riccio, M. *et al.* (2010). Human dental pulp stem cells produce mineralized matrix in 2D and 3D cultures. *European Journal of Histochemistry*, 54, p.46.

Ripamonti, U. e Reddi, A.H. (1997). Tissue Engineering, Morphogenesis, And Regeneration Of The Periodontal Tissues By Bone Morphogenetic Proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 8(2), pp.154-163.

Saber, S.E.M. (2009). Tissue engineering in endodontics. *Journal of Oral Science*, 51(4), pp.495-507.

Sakai, K. *et al.* (2012). Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(1).

San Miguel, S.M. *et al.* (2010). Defining a visual marker of osteoprogenitor cells within the periodontium. *J Periodontal Res*, 45(1), pp.60–70.

Snyder, B. R., *et al.* (2011). Characterization of dental pulp stem/stromal cells of Huntington monkey tooth germs. *BMC Cell Biology*, 12, p.39.

Soares, A.P. *et al.* (2007). Células-tronco em Odontologia. *R. Dental Press Ortodon. Ortop. Facial*, 12(1), pp.33-40.

Souza, V. F., *et al.* (2003). Células-tronco: uma breve revisão. *R. Ci. méd. biol.*, Salvador, 2 (2), pp.251-256.

Sreenivas, S. D., *et al.* (2011). Where will the stem cells lead us? Prospects for dentistry in the 21st century. *J Indian Soc Periodontol*, 15(3), pp.199-204.

Struillou, X. *et al.* (2010). Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *The Open Dentistry Journal*, 4, pp.37-47.

Suchánek, J. *et al.* (2010). Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth- Isolation, Long Term Cultivation and Phenotypical Analysis. *ACTA MEDICA (Hradec Králové)*, 53(2), pp.93-99.

Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, pp.663-76.

Telles *et al.* (2011). Pulp Tissue from Primary Teeth: New Source of Stem Cells. *J Appl Oral Sci*, 19(3), pp.189-194.

Thesleff, I. e Tummers, M. (2009). Tooth organogenesis and regeneration. *StemBook*, ed. The Stem Cell Research Community.

Vasconcelos *et al.* (2011). Importance of Dental and Periodontal Tissues as Sources of Stem Cells. *RBCS*, 15(2), pp.229-236.

Volponi, A. A., Pang, Y. e Sharpe, P. T. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Cell Biology*, 20(12).

Voog, J. e Jones, D. L. (2010). Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell*, 6(2), pp.103-115.

Wang, J. *et al.* (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth Can Differentiate into Dopaminergic Neuron-Like Cells. *Stem Cells And Development*, 19(9).

Wang, Z. *et al.* (2010). Putative Stem Cells in Human Dental Pulp with Irreversible Pulpitis-An Exploratory Study. *J Endod*, 36(5), pp.820-825.

Watt, F. M. e Hogan, B. L. M. (2000). Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. *Science*, 287.

Weir, M.D. e Xu, H.H.K. (2010). Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds for bone repair. *Acta Biomater*, 6(10), pp.4118-4126.

Woods, E. J. *et al.* (2009). Optimized Cryopreservation Method For Human Dental Pulp-Derived Stem Cells And Their Tissues Of Origin For Banking And Clinical Use. *Cryobiology*, 59(2), pp.150-157.

Xu, H.H.K., Zhao, L. e Weir, M.D. (2010). Stem Cell-Calcium Phosphate Constructs for Bone Engineering. *J Dent Res*, 89(12), pp.1482-1488.

Yamagishi, V.T.K. *et al.* (2011). Blockade Of TLR2 Innibits Porphyromonas Gingivales Suppression Of Mineralized Matrix Formation By Human Dental Pulp Stem Cells. *J Endod*, 37(6), pp.812-818.

Yamaza, T. *et al.* (2010). Immunodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Research & Therapy*, 1, p.5.

Yan, X. *et al.* (2010). IPS Cells Reprogrammed From Human. *Stem Cells Dev.*, 19(4), pp.469-480.

Yu, J. *et al.* (2010). Differentiation potential of STRO-1⁺ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biology*, 11(32).

Yu, V. *et al.* (2009). Dynamic Hydrostatic Pressure Promotes Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 386(4), pp.661-665.

Yuan, G. *et al.* (2010). Potential Role of Dentin Sialoprotein by Inducing Dental Pulp Mesenchymal Stem Cell Differentiation and Mineralization for Dental Tissue Repair. *Dent Hypotheses*, 1(2), pp.69–75.

Zhang, W. e Yelick, P.C. (2010). Vital Pulp Therapy - Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization. *International Journal of Dentistry*, p.9.

Zhao, L. *et al.* (2011). LMP1 Regulates Periodontal Ligament Progenitor Cell Proliferation and Differentiation. *Bone*, 47(1), pp.55-64.

Zhurova, M., Woods, E.J. e Acker, J.P. (2010). Intracellular ice formation in confluent monolayers of human dental stem cells and membrane damage. *Cryobiology*, 61(1), pp.133-141.

VI - Anexos

Legislação em Portugal

Resumo da Atividade Nacional de Tecidos e Células em 2010
(MINISTÉRIO DA SAÚDE -Autoridade para os Serviços de Sangue e da
Transplantação)