

Ana Mafalda Costa Gonçalves

“Aplicação de Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2016



Ana Mafalda Costa Gonçalves

“Aplicação de Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária”

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2016

III

Ana Mafalda Costa Gonçalves

“Aplicação de Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária”

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Medicina Dentária.

---

## RESUMO

A temática relativa às células estaminais inicia-se na década de 60 com a descoberta da primeira fonte viável destas células: a medula óssea. Diversos estudos permitiram definir a sua função de renovação tecidual e regeneração pós-dano, assim como a sua caracterização num grupo heterogéneo de células indiferenciadas, clonogénicas, definidas pela capacidade de auto-renovação e diferenciação em células maduras. Nos últimos anos, estas células ganharam popularidade face à alternativa terapêutica que representam para muitas doenças, tais como: diabetes, anomalias congénitas, danos do tecido nervoso, Parkinson, Alzheimer e outras alterações degenerativas, exposições pulpares, defeitos periodontais e perda do órgão dentário. Apesar do seu potencial terapêutico, apresentam vários efeitos adversos, especialmente em relação ao seu envolvimento direto (via transformação maligna das MSCs) e indireto (via efeito modulatório das MSCs) no desenvolvimento do cancro.

Preconiza-se o seu uso no âmbito da Engenharia Tecidual, introduzindo o processo de regeneração tecidual através da utilização combinada de biomateriais e mediadores biológicos, a fim de proporcionar novas ferramentas para a medicina regenerativa.

Mais tarde, tornou-se possível identificar cinco populações de células estaminais de origem dentária (DPSCs, SHEDs, DFPCs, SCAPs e PDLCs) que, para além da sua multipotência e capacidade de diferenciação, constituem fontes acessíveis para recolha. O isolamento destas células constitui ainda uma prática relativamente recente, na qual se torna preponderante isolar células com fenótipo pré-determinado e cultivá-las em meios de cultura adequados. Estudos comprovam que o método de isolamento e as condições de cultura utilizados podem dar origem a diferentes linhas celulares. A conservação é uma prática baseada na convicção de que a medicina regenerativa é o caminho mais promissor para o desenvolvimento da medicina personalizada.

Informação adicional relativa à terapia com células estaminais é ainda necessária. Esta utiliza princípios de biomimética altamente desejáveis, pelo que os resultados obtidos têm vindo a despoletar grandes expectativas e a sua implementação na Engenharia Tecidual apresenta-se promissora.

## **ABSTRACT**

Investigation into stem cells started in the 1960s with the discovery of the first viable source of these cells: the bone marrow. Several studies detailed its role in tissue renewal and regeneration after damage, as well as its characterization, namely, as a heterogeneous group of undifferentiated cells called 'clonogenic' defined by their self-renewal capacity and differentiation into mature cells. Nowadays, these cells have gained popularity as a therapeutic alternative for many diseases such as diabetes, congenital abnormalities, nervous tissue injuries, Parkinson's, pulpal exposure, periodontal defects, loss of teeth, Alzheimer's and other degenerative disorders. However, despite their therapeutic potential, there have been several adverse effects, particularly in relation to their direct (via malignant transformation of the MSCs) and indirect involvement (via modulatory effect of the MSCs) in cancer development.

Studies have also helped to identify five populations of stem cells of dental origin (DPSCs, SHEDs, DFPCs, SCAPs and PDLCS). These stem cells offer the additional benefit of multipotency, differentiation capacity and ease of collection. However, isolation of these cells is still a relatively new practice, requiring the identification of pre-determined phenotypes and the growth these cells in a suitable culture media. The isolation method used and the culture conditions provided can give rise to different cell lines.

Additional information and research into stem cell therapy is still required, however, the use of these cells in the field of tissue engineering is considered obligatory as it has the potential to provide new tools for regenerative medicine via the combined use of biomaterials and biological agents. It offers highly desirable biomimetic principles and, as stated by 'conservation practitioners', "regenerative medicine is the most promising way for the development of personalized medicine.

For these reasons the observed results from stem cell research has triggered much debate and high expectations in the field of tissue engineering.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha orientadora, Professora Doutora Inês Lopes Cardoso, por todo o apoio na elaboração desta monografia, pelos anos de ensinamento, pela metodologia de trabalho e pela exigência profissional que sempre me transmitiu.

À Professora Doutora Cláudia Barbosa, pelo auxílio prestado sempre que necessário e pelo exemplo de profissionalismo e dedicação que se tornou ao longo destes cinco anos.

Aos meus pais, por serem o melhor exemplo de vida. Por todo o investimento na minha formação como pessoa e como profissional, pelo empenho na concretização dos meus sonhos, pela dedicação constante e acima de tudo por todo o amor.

À minha irmã, que me “enche o ego” por fazer de mim o ídolo que não sou e por me permitir ter uma parte decisiva no seu futuro.

Às minhas colegas futuras dentistas por todos os momentos dos últimos cinco anos. À Ana Luísa, por ser incansavelmente as minhas mãos, os meus ouvidos e os meus olhos. À Ângela Rodrigues, pelo exemplo de organização e determinação. À Flávia Silva, pelo exemplo de dedicação e trabalho.

Aos meus amigos de sempre, que são parte determinante na construção da minha personalidade. À Inês Andias, à Catarina Pericão e à Marta Canha, pelo exemplo de trabalho, esforço e arte. Ao André Matias e à Sofia Falcão, pela inspiração de serem as melhores pessoas que conheço. À Carminho e à Sofia Pedrosa, por mostrarem que ainda existem pessoas únicas. À Ana Pedro Lebre, ao Gonçalo Pacheco, à Júnia Costa e à Maria Tarrinha, por serem pessoas que marcam a minha vida. Ao Gonçalo Miranda, à Inês Sousa, ao João Bernardo, à Mariana Martins e ao Rodrigo Cunha, que nunca me deixam esquecer a importância da amizade.

A toda a minha família, amigos e companheiros de curso que todos os dias me lembram que “a felicidade só é verdadeira quando partilhada”.

## ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO .....	1
II. DESENVOLVIMENTO .....	3
i. Materiais e Métodos.....	3
ii. Revisão Bibliográfica .....	4
1. CÉLULAS ESTAMINAIS – FONTE DE VIDA? .....	4
1.1. Critérios de Inclusão .....	6
1.2. Benefícios das Células Estaminais.....	7
1.3. Efeitos Adversos das Células Estaminais .....	9
1.3.1. Efeito Modulatório das MSCs (Figura 2).....	9
1.3.2. Transformação maligna das MSCs .....	10
1.4. Implicações Clínicas e Diretrizes Futuras.....	11
2. ENGENHARIA TECIDULAR .....	12
2.1. Células.....	13
2.2. Matriz.....	13
2.3. Sinalização Celular .....	14
2.4. Aplicações Futuras da Engenharia Tecidual em Medicina Dentária.....	15
3. TECIDO DENTÁRIO – UMA NOVA FONTE DE CÉLULAS TOTIPOTENTES .	17
3.1. Células Estaminais da Polpa Dentária (DPSCs) .....	18
3.2. Células Estaminais de Dentes Decíduos (SHEDs) .....	21
3.3. Células Estaminais do Ligamento Periodontal (PDLSCs).....	22
3.4. Células Estaminais da Papila Apical (SCAPs) .....	23
3.5. Células Estaminais do Folículo Dentário Progenitor (DFPCs).....	24
4. CAPACIDADE ODONTOGÊNICA COMPARATIVA ENTRE AS CÉLULAS ESTAMINAIS DA MEDULA ÓSSEA E DA POLPA DENTÁRIA. ....	26
4.1. Comparação do Imunofenótipo relativo às DPSCs e BMMSCs .....	28
4.2. Diferenciação Odontogénica Comparativa das DPSCs e BMMSCs .....	29
5. COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO ENTRE CÉLULAS ESTAMINAIS PROVENIENTES DE DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES....	30
6. ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DENTÁRIAS .....	33
6.1. Isolamento das Células Estaminais Dentárias.....	33
6.1.1. Métodos de Isolamento: Método do Desdobramento e Método da Digestão Enzimática.....	34
6.1.2. Escolha da Matriz Ideal.....	36

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

6.1.3. Comportamento Biológico após Cultura.....	37
6.1.4. Isolamento das SHEDs.....	37
6.2. Conservação de Células Estaminais Dentárias .....	39
6.2.1. Vantagens na Conservação de SHEDs.....	40
6.3. Protocolo de Recolha, Isolamento e Conservação de SHEDs .....	40
6.3.1. Passo 1: Recolha dentária.....	41
6.3.2. Passo 2: Isolamento das células estaminais.....	41
6.3.3. Passo 3: Armazenamento das Células Estaminais .....	42
6.3.4. Aspectos Comerciais dos “Bancos de Dentes” .....	43
7. APLICAÇÕES DENTÁRIAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS.....	44
7.1. Regeneração Periodontal .....	44
7.2. Regeneração Pulpar .....	45
7.3. Apicogênese e Apicificação.....	46
7.4. Regeneração do Elemento Dentário.....	47
8. APLICAÇÕES MÉDICAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS .....	49
8.1. Patologias hematológicas.....	49
8.2. Doenças Cardiovasculares .....	49
8.3. Doenças Vasculares .....	50
8.4. Osteogénese Imperfeita.....	50
8.5. Recuperação após Dano da Medula Espinal.....	51
8.6. Doenças Neurológicas .....	51
8.6.1. Esclerose Lateral Amiotrófica.....	52
8.6.2. Síndrome de Hurler e Leucodistrofia Metacromática .....	52
8.7. Efeito Neuroprotetor nas Doenças de Alzheimer e Parkinson.....	52
8.8. Recuperação pós-quimioterapia.....	53
III. CONCLUSÃO.....	54
BIBLIOGRAFIA .....	56

## ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Diagrama representativo da hierarquia das células estaminais. ....	7
<b>Figura 2:</b> Quadro-resumo relativo ao efeito modulatório das MSCs. ....	9
<b>Figura 3:</b> Quadro-resumo relativo à transformação maligna das MSCs. ....	10
<b>Figura 4:</b> Interligação dos componentes necessários na engenharia tecidual. ....	12
<b>Figura 5:</b> Esquema representativo da organização relativa à sinalização celular.....	15
<b>Figura 6:</b> Esquema representativo da regeneração do elemento dentário. ....	48

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Tabela-Resumo dos Marcadores Celulares das Células Estaminais Dentárias.....	25
<b>Tabela 2:</b> Tabela- Resumo do Potencial de Diferenciação das Células Estaminais Dentárias. ..	26
<b>Tabela 3:</b> Tabela-Resumo do Imunofenótipo das DPSCs e BMSSCs. ....	28
<b>Tabela 4:</b> Tabela-Resumo do Fenótipo, Capacidade Formadora de Colónias, Conteúdo de DNA e Potencial de Diferenciação entre as SHEDs e as DPSCs. ....	33

## SIGLAS E ABREVIATURAS

ABC: transportador molecular.

ALP: marcador de osteoblastos.

AS cells: células estaminais pós-natais ou adultas.

ASDCs: células estaminais com origem no tecido adiposo.

bFGF: marcador de fibroblastos.

BMMSCs/BM-MSCs: células estaminais com origem na medula óssea.

BMP: proteína morfogenética do osso.

BMP-2: proteína morfogenética do osso 2.

BSP: sialoproteína, marcador de osteoblastos.

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio

CAF: fibroblastos associados ao cancro.

CD11b: integrina  $\alpha$ M.

CD3: aglomerado humano de diferenciação 3.

CD4: aglomerado humano de diferenciação 4.

CD8: aglomerado humano de diferenciação 8.

CD10: neprilisina.

CD13: aminopeptidase N.

CD14: aglomerado humano de diferenciação 14.

CD18: beta-2 integrina.

CD19: antígeno de linfócito B.

CD20: antígeno de linfócito B.

CD24: transdutor de sinal.

CD29: integrina beta-1.

CD34: aglomerado humano de diferenciação 34.

CD40: aglomerado humano de diferenciação 40.

CD44: “Indian Blood Group”.

CD45: antígeno comum de linfócitos.

CD53: antígeno de superfície de leucócitos.

CD59: protectina.

CD68: aglomerado humano de diferenciação 68.

CD71: recetor da transferrina.

CD73: ecto-5'-nucleotidase.

CD79: recetor de antígeno de célula B associado à proteína de cadeia alfa.

CD80: aglomerado humano de diferenciação 80.

CD86: aglomerado humano de diferenciação 86.

CD90: aglomerado humano de diferenciação 90.

CD105: endoglina.

CD106: molécula de adesão celular vascular-1.

CD146: molécula de adesão de células de melanoma.

CD150: molécula de ativação e sinalização linfocítica 1.

CD166: aglomerado humano de diferenciação 166.

Células NK: células natural killer.

CFU: colónias formadas por unidade.

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

CK: marcador de células epiteliais.

CNPase: anticorpo monoclonal.

Col I: marcador de osteoblastos.

Col II: marcador de condrócitos.

Col III: marcador de fibroblastos.

CSF1: Fator estimulante de colónias 1.

DFPCs: células estaminais originárias do folículo dentário.

DMP-1: marcador de odontoblastos.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

DPSCs: células estaminais originárias da polpa dentária.

DSPP: marcador de odontoblastos.

EMA: marcador de células epiteliais.

ES cells: células estaminais embrionárias.

Fator VIII: marcador de células endoteliais.

GFAP: proteína ácida fibrilar glial.

HLA-A/B/C: antígenos leucocitários humanos A/B/C.

HLA-DR: antígeno de leucócitos humanos.

HNK-1: antígeno humano natural killer.

LIN28: proteína codificadora de gene.

MAPC: células progenitoras adultas multi-potentes.

MDSCs: células estaminais com origem no tecido muscular.

Mg<sup>2+</sup>: íon magnésio.

MHC I/II: complexo principal de histocompatibilidade I/II.

MIAMI: células estaminais isoladas da medula óssea.

MSCs: células estaminais.

NANOG: proteína codificadora de gene.

Notch-1: drosófila.

OC: osteocalcina, marcador de osteoblastos.

Oct14: octamero de ligação ao fator de transcrição 14.

OPN: osteopontina, marcador de osteoblastos.

PBSA: solução salina tampão fosfato de Dulbecco.

PDLSCs: células estaminais originárias do ligamento periodontal.

pH: potencial de hidrogénio.

POU5F1: octamero de ligação ao factor de transcrição 4.

P73: recetor do neurónio responsável pelo fator de crescimento.

RANKL: Ativador do Recetor do Fator Nuclear  $\kappa$  B.

RNA: ácido ribonucleico.

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensageiro.

Runx-2: fator de transcrição relacionados com o Runt 2.

SCAPs: células estaminais originárias da papila apical.

SHEDs: células estaminais originárias dos dentes decíduos esfoliados.

SOX2: região determinante do sexo Y.

Stro-1: antígeno endotelial.

S-100: proteína de baixo peso molecular.

TAF: fibroblastos associados a tumores. medula óssea adulta.

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

TGF-B2: Fator transformador de crescimento beta-2.

TGF-B3: Fator transformador de crescimento beta-3.

TGFp-1: fator de crescimento transformante 1.

$\alpha$ -SMA: actina de músculo liso  $\alpha$ , marcador do músculo liso.

## I. INTRODUÇÃO

A presente Tese de Mestrado foi desenvolvida no âmbito da unidade curricular de Projeto de Pós-Graduação/Dissertação, prevista no quinto ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, e aborda a temática “Aplicação de Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária”.

A pesquisa relativa às células estaminais iniciou-se há cinquenta anos atrás. Nos anos sessenta, investigadores descobriram que a medula óssea constituía uma fonte viável destas células. Atualmente, e na sequência dos estudos efetuados, os resultados obtidos têm vindo a despoletar grandes expectativas e a sua implementação na Engenharia Tecidual apresenta-se promissora (Telles et al., 2011).

A Engenharia Tecidual é um campo interdisciplinar que combina princípios de engenharia, materiais e ciências biológicas em direção ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas que restaurem, mantenham, substituam ou melhorem as funções biológicas. A promoção destes conhecimentos potencia o desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento, na maioria das áreas biomédicas, incluindo na Medicina Dentária (Rosa et al., 2011).

Desde a descoberta e caracterização das células estaminais mesenquimais multipotentes da medula óssea, populações semelhantes foram já identificadas e caracterizadas a partir de uma variedade de tecidos (Blau et al., 2001; Bluteau et al., 2008; Fuchs et al., 2000; Mitsiadis, 2007). A presença destas células no organismo permite a natural regeneração de tecidos devido à sua capacidade de auto-regeneração e diferenciação (Rodriguez-Lozano et al., 2011).

As células estaminais apresentam a capacidade de se dividir, gerando uma célula idêntica a si e capaz de gerar diferentes tipos de tecidos (Giordano et al., 2011). A natureza pluripotente destas células é o conceito base das terapias regenerativas, uma vez que se podem diferenciar em células constituintes de todos os tipos de tecidos do corpo (Zandstra e Nagy, 2001). A grande esperança é que as células estaminais produzidas em grandes quantidades e, posteriormente aplicadas, produzam células novas para substituir tecidos perdidos ou danificados. Esta capacidade de regeneração tecidual é o foco do campo emergente da medicina personalizada.

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

As principais desvantagens desta utilização incluem dilemas éticos (dependendo da fonte originária das células), o potencial cancerígeno e o risco de rejeição imunológica (Wobus e Boheler, 2005).

Estudos recentes revelam a presença de células estaminais em tecidos dentários, com um potencial de diferenciação expansivo em relação a linhagens mesodérmicas e ectodérmicas (Gronthos et al., 2000; Miura et al., 2003; Seo et al., 2004). Estas células podem ser recolhidas da polpa dentária, do ligamento periodontal, da papila apical e das células precursoras do folículo dentário (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2009a; Karaoz et al., 2010; Miura et al., 2003; Morsczeck et al., 2005; Seo et al., 2004; Sonoyama et al., 2006).

Os dados existentes apresentam ainda a possibilidade de estas células serem crioconservadas e armazenadas, mantendo assim o seu potencial de utilização por longos períodos de tempo.

Todas estas emocionantes descobertas colocam a nossa profissão na vanguarda de uma potencial revolução nas opções terapêuticas. O médico dentista desempenha um papel importante tanto na recuperação e utilização das células estaminais (obtidas a partir de dentes decíduos e dentes permanentes) como na execução de terapias médicas regenerativas dentárias. Para beneficiar da prática de terapias capazes de salvar vidas através de células estaminais, torna-se essencial conhecer todas as suas envolvências, benefícios e limitações. É com base nos presentes objetivos que pretendo introduzir os capítulos que seguem.

## II. DESENVOLVIMENTO

### i. Materiais e Métodos

Na realização deste trabalho efetuou-se uma revisão bibliográfica relacionada com o tema “Aplicação de Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária”. A pesquisa bibliográfica foi realizada durante o período de Outubro de 2014 a Fevereiro de 2015. Na seleção dos artigos, foram considerados alguns sub-temas relativos às células estaminais, tais como: caracterização e classificação das células estaminais em geral e das células estaminais dentárias em particular; conceitos de Engenharia Tecidual; técnicas de recolha, isolamento e conservação; aplicações médicas e dentárias.

Ao efetuar a pesquisa bibliográfica utilizaram-se as seguintes palavras-chave: “*Stem Cells*”, “*Dental AND Stem Cells*”, “*Tissue Engineering*”, “*Stem Cells AND Tissue Engineering*” e “*Stem Cells AND Isolation*”. O critério de inclusão escolhido resume-se a: artigos posteriores a 2000. Em relação aos motores de busca, os selecionados para a pesquisa apresentam diferentes tipos de organização. A pesquisa iniciou-se pelos motores de busca mais abrangentes (sistemas), nomeadamente pelo SUMsearch e pelo Trip Database. Posteriormente pesquisou-se em motores de busca definidos como sumários, como é o caso do B-on e do Up To Date. De seguida, recorreu-se às sinopses com a utilização do Scielo e do Pubmed. Nas revisões utilizou-se o Evidence Based Dentistry. Para finalizar, foram utilizados motores de busca mais restritos (artigos) como o F1000 e o Embase.

Tendo em conta a pertinência e a disponibilidade dos artigos a estudar, e após leitura do resumo/abstract dos mesmos, para a escolha efetiva apenas recorri aos selecionados no Trip Database, no Scielo e no Pubmed. Dos setenta artigos selecionados: vinte surgem do descritivo “*Stem Cells*”, trinta e três de “*Dental AND Stem Cells*”, oito de “*Tissue Engineering*”, três de “*Stem Cells AND Tissue Engineering*” e seis de “*Stem Cells AND Isolation*”. Dos mesmos e analisando o critério de inclusão: um artigo é de 2000, um de 2002, dois de 2003, quatro de 2004; três de 2005, cinco de 2006, cinco de 2007, onze de 2008, quinze de 2009, sete de 2010, treze de 2011 e três de 2012.

## **ii. Revisão Bibliográfica**

### **1. CÉLULAS ESTAMINAIS – FONTE DE VIDA?**

As células estaminais (MSCs) caracterizam-se como sendo um grupo heterogéneo de células indiferenciadas, clonogénicas, definidas pela capacidade de auto-renovação e diferenciação em células maduras. Apresentam origem mesodérmica primordial e podem originar células do sangue, do tecido músculo-esquelético, do tecido conjuntivo e dos sistemas vascular e urogenital. Podem ser isoladas a partir de muitos tecidos do corpo humano, tais como: medula óssea, sangue periférico, espinal medula, vasos sanguíneos, tecido músculo-esquelético, córnea, retina, fígado, pâncreas, células do epitélio da pele, sistema digestivo e até células de origem dentária (Blau et al., 2001; Bluteau et al., 2008; Fuchs et al., 2000; Mitsiadis, 2007).

A descoberta destas células credita-se maioritariamente ao trabalho desenvolvido por A.J. Friedenstein durante a década de 1960, no qual concluiu que a medula óssea é a fonte de células estaminais de onde se originam os tecidos mesenquimais da vida pós-natal (Afanasyev, Elstner e Zander, 2009). Posteriormente, vários cientistas contribuíram para a atual compreensão das células estaminais. Alexander A. Maximow introduziu o conceito de diferenciação no contexto da hematopoiese (Friedenstein, Piatetzky-Shapiro e Petrakova, 1966; Friedenstein et al., 1974). Ernest R. McCulloch e James E. demonstraram a natureza clonal de células da medula óssea (Becker, McCulloch e Till, 1963; Siminovitch, McCulloch e Till, 1963). Apesar de todos estes precoces desenvolvimentos teóricos, somente em 1998, a equipa do biólogo James Thomson conseguiu isolar células estaminais embrionárias humanas, publicando ainda durante esse ano o primeiro relato sobre a plasticidade das células embrionárias pós-natais/adultas (Thomson et al., 1998).

As células estaminais são responsáveis pela renovação do tecido normal, bem como pela cura e regeneração após lesões (Weiss, 2000). Nos últimos anos, estas células ganharam popularidade devido à sua capacidade de auto-renovação e diferenciação em variados tipos de células, em particular nas de origem mesodérmica (como osteoblastos, condrócitos e adipócitos), ectodérmica e endodermal.

As células estaminais podem ser classificadas usando vários critérios. Analisando a sua origem, surgem dois grupos (McKay, 2000; Leeb et al., 2010):

- *Embrionárias (ES cells)*: derivadas da massa celular principal pré-implantada no embrião (blastocisto). Apresentam elevado potencial neoplástico, no entanto o seu uso é controverso e está envolvido em questões éticas e legais.
- *Pós-Natais ou Adultas (AS cells)*: migram para uma área danificada e diferenciam-se em tipos celulares específicos para facilitar a reparação de tecidos danificados. São apelativas devido ao seu potencial clínico. Podem ser isoladas de muitos tecidos e órgãos, incluindo medula óssea, pele, fígado, intestino, pâncreas, espermatogónias, sistema nervoso central, músculo esquelético cardíaco, células mesenquimais e dentárias (polpa dentária, dentes decíduos exfoliados, ligamento periodontal, folículo dentário progenitor e papila apical).

Outra classificação frequentemente adotada baseia-se no seu potencial de desenvolvimento. Esta só foi possível devido à análise da morfologia, proliferação, diferenciação, estados genómicos e epigenómicos destas células (Amabile e Meissener, 2009). Quatro divisões essenciais foram então estabelecidas (McKay, 2000; Wagers, 2004; Leeb et al., 2010):

- *Células Estaminais Totipotentes*: de origem embrionária (**Figura 1**) com a capacidade de promover o desenvolvimento de um organismo inteiro.
- *Células Estaminais Pluripotentes*: de origem embrionária (**Figura 1**) que quando cultivadas *in vivo* e expostas a determinadas condições, são capazes de se diferenciarem em todos os tipos de tecidos, exceto os extra-embrionários (como a placenta). Não conseguem originar um organismo inteiro.
- *Células Estaminais Multipotentes*: de origem pós-natal com capacidade de diferenciação em linhagens celulares específicas.
- *Células Unipotentes*: de origem pós-natal que formam somente um tipo celular maduro.

Os inúmeros benefícios das MSCs desencadeiam um potencial terapêutico que tem sido aplicado e estudado recentemente em algumas patologias. Apesar dos resultados nos diversos estudos se apresentarem animadores, têm sido relatados alguns efeitos adversos.

### **1.1. Critérios de Inclusão**

As células estaminais são identificadas através da conjugação de propriedades físicas, fenotípicas e funcionais. Relativamente à morfologia as células estaminais apresentam grande heterogeneidade. Vários termos têm sido utilizados para descrever a sua aparência: “fibroblastoid cells”, “giant fat cells and blanket cells”, “spindle shaped, flattened cells” e “very small round cells”. A morfologia varia determinantemente com as condições envolventes, sendo que a relação entre esta e as suas funções permanece ainda obscura (Zipori et al., 2011). As MSCs expressam um determinado número de marcadores fenotípicos, no entanto, nenhum deles é específico (Wong, 2011).

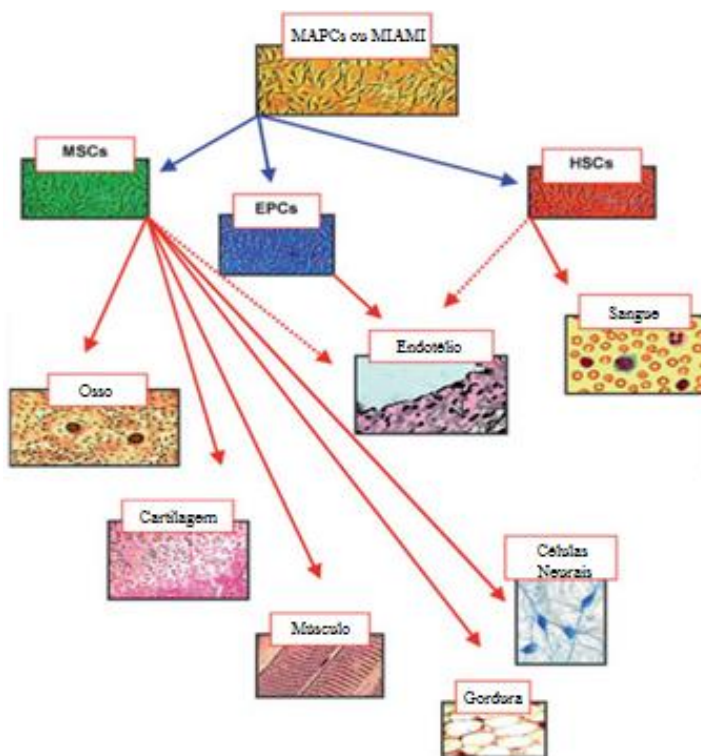
Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, existem quatro critérios necessários para classificar uma célula como sendo célula estaminal (Dominici et al., 2006):

- Ser aderente a plástico;
- Expressar os marcadores C105, CD73, CD90 e CD45;
- Não expressar os marcadores CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 ou HLA-DR;
- Diferenciar-se em osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

A confluência destes critérios não é obrigatória, sendo que a expressão de marcadores de superfície celular pode ser influenciada por fatores extrínsecos. Outros marcadores que são geralmente aceites incluem CD44, CD71, Stro-1 e moléculas de adesão tais como CD106, CD166 e CD29 (Chamberlain, 2007).

O ensaio clínico utilizado para identificar as MSCs é a determinação de colónias formadas por unidade (CFU). Este teste identifica células fusiformes aderentes que proliferam para formar colónias e podem ser induzidas a diferenciarem-se em adipócitos, osteócitos e condrócitos (Wong R., 2011).

É atualmente possível definir as relações existentes entre as MSCs e outras populações de células estaminais semelhantes a estas, mas que tenham sido definidas com uma nomenclatura diferente (**Figura 1**). Algumas destas são: as células estaminais estromais da medula óssea, as células precursoras do estroma, as células estaminais de reciclagem, as células estaminais isoladas da medula óssea adulta (MIAMI) e as células progenitoras adultas multi-potentes (MAPC). As MIAMI e as MAPC apresentam um grau de proliferação e diferenciação superior comparativamente ao das MSCs, o que sugere que representem um subconjunto de células estaminais precursoras das MSCs (*Wong R., 2011*).



**Figura 1: Diagrama representativo da hierarquia das células estaminais [Adaptado de Giordano, Galderisi e Marino, 2007].**

## 1.2. Benefícios das Células Estaminais

O principal benefício da utilização de células estaminais consiste no seu potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, previamente determinadas. A utilização de células estaminais pode representar uma alternativa terapêutica para muitas doenças, como diabetes, anomalias congénitas, injúrias do tecido nervoso, Parkinson, Alzheimer e outras alterações degenerativas, exposições pulpares, defeitos periodontais e perda do órgão dentário (*Miura et al., 2003; Bishop, 2003*).

As MSCs são células privilegiadas que podem escapar à vigilância imunitária por um longo período de tempo (*O'Donoghue, 2004*). O seu fenótipo imunitário é descrito como histocompatibilidade MHC I positiva e MHC II negativa e não possuem as moléculas co-

estimuladoras CD40, CD80, e CD86. Isto significa que, embora expressem baixos níveis antigénios de MHC I (o que permite a ativação de células T), a ausência de moléculas co-estimulatórias impede o desenvolvimento de sinais secundários, deixando assim as células T anérgicas (Javazon E.H., 2004). De referir também que, a expressão de baixos níveis de MHC I é importante na sua auto-defesa uma vez que inativa as células NK.

As MSCs são relativamente fáceis de isolar e armazenar relativamente a outros tipos de células humanas. Podem ser recolhidas em diversos locais do corpo humano, tais como: tecido adiposo, fígado, tendões, membrana sinovial, fluído amniótico, placenta, cordão umbilical e dentes. Tem sido demonstrado que são extensivamente expandidas *in vitro*, até 15 duplicações da população. Isto significa que uma única recolha oriunda da medula óssea pode originar até 50 duplicações populacionais num período de 10 semanas (Prockop, 1997; Bianco e Robey, 2000; Nardi e Meirelles, 2006; Sethe et al., 2006).

As MSCs apresentam efeitos tróficos através da produção de vários fatores de crescimento e citocinas. Por este motivo têm sido usadas em substituição de células, reparação, regeneração e imunomodulação em inúmeras patologias. Muitas investigações sobre a viabilidade do uso clínico de MSCs cresceram rapidamente a partir da década de 1990 (Caplan e Dennis, 2006).

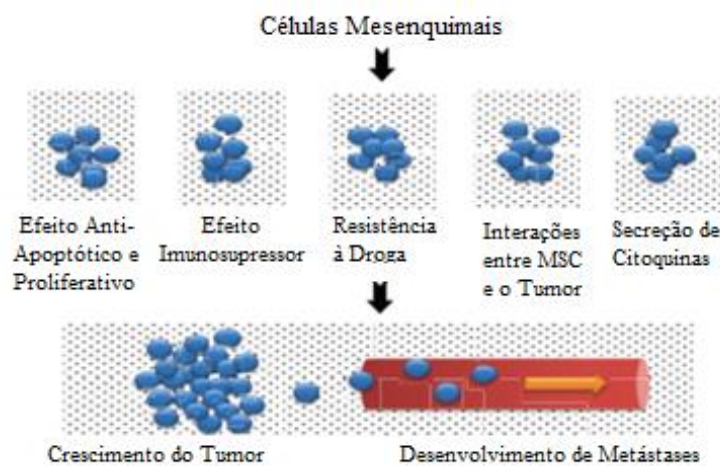
As células estaminais com origem no tecido muscular (MDSCs) receberam muita atenção recentemente. Apesar das MSCs poderem ser recolhidas através da medula óssea, o processo de biópsia é mais doloroso e invasivo em comparação com a biópsia do músculo-esquelético (que pode ser realizado usando uma agulha de pequeno calibre sob anestesia local). Assim sendo, as MDSCs têm preferência sobre BM-MSCs em determinadas aplicações clínicas, tais como a utilização em doenças musculares esqueléticas e incontinência urinária. A mesma popularidade surge com as células estaminais com origem no tecido adiposo (ASDCs). Tal como as MSCs de outras origens, foi demonstrado que as ASDCs se podem diferenciar em vários tipos de células (adipogénicas, condrogénicas, osteogénicas, miogénicas e células que adotem um fenótipo pancreático) (Hass, Kasper e Jacobs, 2011; Timper et al., 2006). A lista de potenciais aplicações clínicas que utilizem ADSCs é exaustiva e inclui a reparação de

patologias relacionadas com o disco intervertebral, lesão da medula espinal, acidente vascular cerebral, diabetes mellitus e artrite (Zuk, 2010).

### 1.3. Efeitos Adversos das Células Estaminais

Apesar do potencial terapêutico das MSCs, estas células apresentam vários efeitos adversos, especialmente em relação ao seu envolvimento direto (via transformação maligna das MSCs) e indireto (via efeito modulatório das MSCs) no desenvolvimento do cancro.

#### 1.3.1. Efeito Modulatório das MSCs (Figura 2)



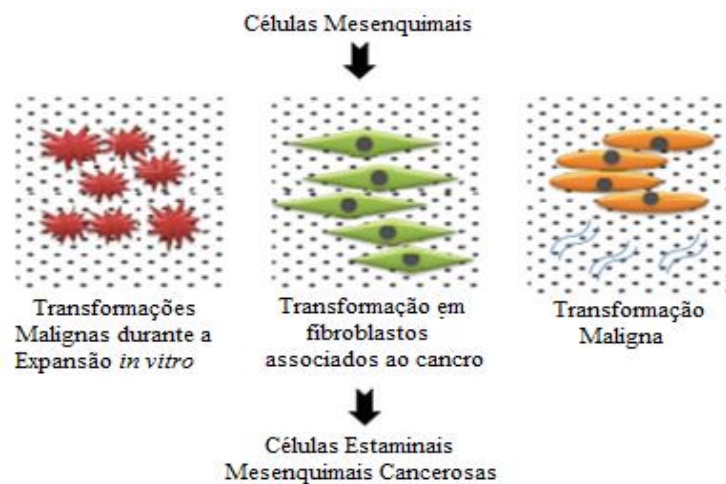
**Figura 2: Quadro-resumo relativo ao efeito modulatório das MSCs [Adaptado de Wong, 2008].**

Apesar de alguns estudos efetuados apoiarem a teoria de que as MSCs podem suprimir o crescimento do tumor, devido ao seu efeito anti-proliferativo (Tian et al., 2010), outros demonstram que as MSCs podem contribuir para a proteção tumoral – devido à inibição da apoptose e fármaco-resistência das células cancerígenas que leva consequentemente à progressão do tumor e ocorrência de metástases (Vianello, 2010). Ao longo do tempo, os estudos têm cada vez mais suportado a ideia de contribuição para a proteção tumoral (Wong, 2011).

Para além de prevenir a apoptose e consequentemente aumentar o crescimento tumoral, as MSCs também estão relacionadas com a promoção de metástases. Evidências recentes sugerem que as MSCs tendem a migrar para tumores primários e metastáticos locais segregando quimiocinas que promovem o aparecimento de metástases (Lazennec, 2008).

Às características previamente descritas, é de acrescentar ainda a resistência farmacológica que as MSCs promovem junto das células cancerígenas e a sua capacidade de suprimir o sistema imunitário (Shinagawa, 2010). Apesar das propriedades imunossupressoras das MSCs serem vantajosas para pacientes com doenças imunológicas, em pacientes com o sistema imunitário suprimido, o crescimento do tumor é incentivado.

### 1.3.2. Transformação maligna das MSCs (Figura 3)



**Figura 3: Quadro-resumo relativo à transformação maligna das MSCs [Adaptado de Wong, 2011].**

Para além da contribuição indireta previamente descrita, as MSCs também contribuem para uma transformação maligna de forma direta. Este papel pode ocorrer sob três condições: durante a expansão *in vitro* das MSCs, durante a transformação maligna como resultado da interação das MSCs com o estroma tumoral e durante a manipulação genética das MSCs, transformando-as em células cancerígenas (Wong, 2008). A fim de produzir MSCs suficientes para uso clínico, a maciça expansão *in vitro* é muitas vezes necessária, o que torna estas células suscetíveis a transformação maligna.

O efeito “homing” promove a migração das MSCs em direção às células tumorais. Esta migração não só permite que as MSCs interajam com o estroma tumoral e promovam o crescimento tumoral (previamente mencionado), como também leva à transformação maligna de MSCs no local do tumor (Shinagawa, 2010). A exposição de MSCs ao estroma tumoral pode levar à diferenciação destas células em fibroblastos associados ao cancro (CAF) ou fibroblastos associados a tumores (TAF) (Michra, 2008). Esta

transformação de MSCs em CAF ou TAF contribui para a expansão da rede fibrovascular e progressão do tumor (Spaeth, 2009).

Relativamente à manipulação genética, estudos indicam que uma única mutação seria suficiente para provocar a transformação das MSCs (Rodriguez, 2009) e que este tipo de manipulações aumenta o potencial oncogénico destas células e promove a instabilidade cromossómica a longo prazo (Liu, 2006).

#### **1.4. Implicações Clínicas e Diretrizes Futuras.**

Analisando o vasto número de ensaios clínicos, a literatura relativa às características das MSCs permite concluir que a sua utilização no tratamento das patologias referidas é viável e vantajosa comparativamente com as alternativas tradicionais em muitos dos casos. No entanto, acompanhamentos regulares devem ser assegurados de forma a prevenir a incidência de cancro nos pacientes em que foram instituídos tratamentos com recurso as MSCs (Wong, 2011).

No caso de pacientes com cancro, uma melhor análise da situação deve ser efetuada, sendo que o tratamento com recurso a MSCs só deve ser realizado quando for determinado que o benefício na realização do mesmo supera o risco. Se o paciente em questão estiver sob tratamento com quimioterapia, as interações medicamentosas devem ser avaliadas (Wong, 2011).

Relativamente à possibilidade de utilização de células estaminais adultas com finalidade terapêutica, esta é preferível à utilização de células embrionárias na medida em que: evita problemas éticos (frequentes aquando o uso de células embrionárias), evita problemas de rejeição imunológica (pois são isoladas do próprio paciente) e reduz o risco de formação de tumor (Hau, 2006).

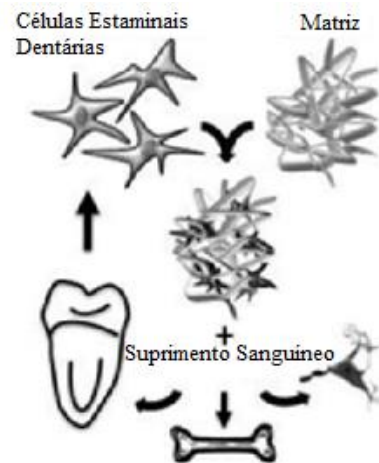
Relativamente a estudos futuros, deve-se salientar a necessidade de:

- Esclarecimento sobre as vias de sinalização ou proteínas reguladoras envolvidas na modulação das MSCs durante o desenvolvimento tumoral.
- Desenvolvimento de rigorosas medidas de controlo e segurança a aplicar em terapias que recorram à utilização de MSCs (de forma a prevenir a malignização das mesmas).

## 2. ENGENHARIA TECIDULAR

O termo Engenharia Tecidualar foi proposto pela primeira vez em 1993 nos Estados Unidos por Langer e Vacanti visando combater a escassez de doadores de órgãos para transplante. Descreveram o conceito como sendo o processo pelo qual os tecidos e órgãos são regenerados por transplante de células (Langer e Vacanti, 1993). Esta área não se desenvolveu tanto quanto esperado e, quase 20 anos depois, o conceito de Engenharia Tecidualar mantém-se bastante semelhante ao de 1993 (Masaki et al., 2010). Atualmente é descrito como um campo multidisciplinar focado no desenvolvimento de materiais e estratégias com vista à substituição de tecidos danificados. Esta substituição é realizada, preferencialmente, através de materiais biológicos com recurso à utilização de princípios, métodos e conhecimentos de química, física, engenharia e biologia (Vinicius, 2012).

É, então, possível afirmar que o objetivo da Engenharia Tecidualar é a regeneração de tecidos através da utilização combinada de biomateriais e mediadores biológicos, a fim de proporcionar novas ferramentas para medicina regenerativa (Aquino, 2009). A obtenção de resultados positivos e a melhoria do prognóstico a longo prazo está altamente dependente da combinação de células, matrizes e sinalização celular (**Figura 4**).



**Figura 4: Interligação dos componentes necessários na engenharia tecidual [Adaptado de Vinicius et al., 2012].**

Na Medicina Dentária, o interesse dos investigadores e institutos por esta área aumentou rapidamente (Shayesteh et al., 2008; Yamamiya et al., 2008). Ainda assim, em termos de prática clínica, a maioria dos procedimentos estão limitados à substituição de tecidos danificados por materiais sintéticos biocompatíveis que podem não apresentar semelhanças nas características químicas, biológicas e comportamentais relativamente aos tecidos do hospedeiro (Nör, 2006).

## **2.1. Células**

As células utilizadas na Engenharia Tecidual determinam o sucesso desta tecnologia na medida em que condicionam o grau de amplificação celular. Se a amplificação não for suficiente, não vamos obter o número de células necessário para implantação, pondo assim em risco a segurança do enxerto (Machado, Fernandes e Gomes, 2011).

A maioria das estratégias para a realização de Engenharia Tecidual baseiam-se na utilização de células cuja origem é distinta do local de aplicação. Podemos considerar que a disponibilidade de células estaminais impulsionou desenvolvimentos nesta área, devido às suas características de auto-regeneração e plasticidade - que as torna particularmente adequadas para aplicações regenerativas (Bianco e Robey, 2001; Fodor, 2003). Para além disso, a redução do tempo de internamento hospitalar, a baixa morbidade e incidência de reações imunológicas são ainda características vantajosas a referir (Yamada et al., 2011).

Existe atualmente um grande número de relatórios experimentais e investigações clínicas preliminares que fundamentam o uso potencial das células estaminais (Daley e Scadden, 2008). A prova mais convincente é o processo fisiológico natural de regeneração autóloga após lesão tecidual. Este processo tem sido estudado e sustenta a base da investigação que guia o desenvolvimento de novas abordagens regenerativas biomiméticas (Daley e Scadden, 2008; Muschler, Nakamoto e Griffith, 2004). A integração completa das células na matriz, o fornecimento de nutrientes e o contacto direto com o sangue e oxigénio são pontos críticos para o sucesso da terapia celular (Ferrari et al., 2007).

## **2.2. Matriz**

A matriz é uma estrutura temporária utilizada na Engenharia Tecidual com o objetivo de proporcionar um microambiente tridimensional onde as células possam proliferar, diferenciar-se e gerar o tecido desejado (Xu, Weir e Simon, 2008). A escolha da matriz ideal para a formação do tecido pretendido é uma tarefa difícil. Esta deve permitir a ligação e a migração celular, a libertação localizada e sustentada de fatores de crescimento e o fluxo de oxigénio para manter as elevadas exigências metabólicas das células envolvidas na regeneração do tecido.

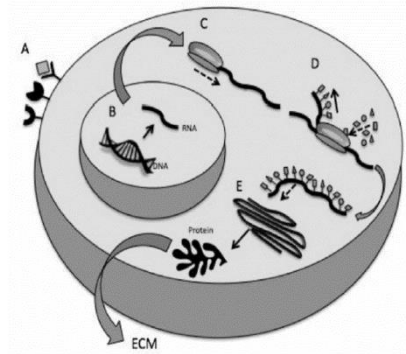
A matriz pode ser feita de cerâmica (Leong, Jiang e Lu, 2006), polímeros naturais ou sintéticos (Duailibi et al., 2004) e/ou compósitos (Saito et al., 2010). A escolha do material depende das características físicas, tais como: comportamento reológico, propriedades mecânicas, rugosidade da superfície e porosidade; e características químicas, tais como: velocidade e produtos de degradação originados. As propriedades físicas da matriz devem atender às necessidades do ambiente de destino: apresentar resistência mecânica adequada para suportar as tensões *in vivo* e ser mecanicamente compatíveis com os tecidos envolventes (Xu, Weir e Simon, 2008; Miranda et al., 2008; Russias, 2007; Wiesmann, 2009). As propriedades mecânicas apresentam impacto direto na diferenciação, afetando o fenótipo celular devido à ocorrência de transdução mecânica (Xu, Weir e Simon, 2008). Os suportes elásticos lineares são os preferidos quando se pretende gerar osso e os modelos elásticos não lineares ou viscoelásticos são mais adequados para os tecidos moles (Russias et al., 2007; Xu et al., 2001). A porosidade é fundamental na medida em que a quantidade e a extensão dos poros interferem com inúmeras propriedades mecânicas (nomeadamente com a permeabilidade) apresentando impacto na dispersão celular, na difusão de nutrientes e no crescimento do tecido (Miranda et al., 2008; Weismann, 2009; Salerno, 2008). Estudos indicam que um maior número e extensão dos poros potenciam maior dispersão celular mas reduzem a resistência da matriz (Ripamonti e Reddi, 1992; Boby, 1980). Tem sido proposto que a interconexão dos poros é mais importante para sustentar o crescimento do osso do que propriamente o tamanho do poro (Freed, 1994).

A reabsorção da matriz a longo prazo é fundamental para alcançar o sucesso (Wiesmann, 2009) e esta deve ocorrer a uma velocidade compatível com a formação do novo tecido (Sung, 2004). Os produtos de degradação não podem ser tóxicos e devem ser de fácil limpeza ou reabsorvidos para minimizar o risco de resposta inflamatória (Xu, 2001; Gonçalves, 2007). Durante a degradação da matriz, o pH local não deve ser significativamente menor do que o pH fisiológico, caso contrário, a morte celular e a degradação da proteína podem ocorrer (Xu, 2001).

### **2.3. Sinalização Celular**

A sinalização celular é parte constituinte de um complexo sistema de comunicação que coordena as atividades celulares e organiza as suas interações.

Inicia-se com a ligação do recetor de membrana que ativa a expressão do gene (A), segue-se a síntese de RNA a partir da transcrição da cadeia original de DNA (B), a montagem do codão de iniciação da molécula de RNAm (C), a formação da cadeia de polipeptídeo (D) e completando-se assim a síntese proteica (E) (**Figura 5**).



**Figura 5: Esquema representativo da organização relativa à sinalização celular [Adaptado de Vinicius et al., 2012].**

Muitas moléculas da matriz extracelular têm sido descritas na literatura como participantes na sinalização intercelular. Está provado que a diferenciação das células é mais significativa pela ação conjunta de algumas destas moléculas do que pela ação de apenas uma. Entre estas moléculas de sinalização, o TGFp-1 (fator de crescimento transformante 1) e a BMP (proteína morfogenética do osso), parecem ser as que têm um papel mais relevante na diferenciação odontoblástica (Magloire, 2001). Há ainda evidências que o TGF-p-1 é libertado a partir da dentina após ocorrência de lesão (Iohara, 2004) e que as BMPs (mais especificamente a BMP-2) têm a capacidade de indução da dentina (Yang, 2009). No entanto, é importante lembrar que as proteínas referidas induzem a progressão cancerígena pré-estabelecida (Reya e Clevers, 2005).

A compreensão detalhada dos eventos intracelulares que são induzidos pelas proteínas da matriz extracelular é determinante para a Engenharia Tecidualar.

#### **2.4. Aplicações Futuras da Engenharia Tecidualar em Medicina Dentária**

Recentes avanços na área da Engenharia Tecidualar sugerem a tendência para mudanças significativas na “tradicional” prática clínica (Vinicius et al., 2012). Tendo por base todos os progressos nesta área, a Engenharia Tecidualar deixou de ser apenas uma ciência biomaterial para ser uma área multidisciplinar que integra conceitos de biologia, medicina e várias áreas da engenharia (Aquino et al., 2009). Desenvolvimentos futuros dependem de uma melhor compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na regeneração dos tecidos periodontais, do potencial de diferenciação das células e da interação entre as células estaminais, a matriz e os tecidos do hospedeiro (Vinicius, 2012).

Reconstruções ósseas pós-trauma, cancro ou regeneração óssea para colocação de implantes dentários são apenas algumas das indicações da Engenharia Tecidual para aplicações craniofaciais (Leong, Jiang e Lu, 2006). É possível então concluir que a Engenharia Tecidual constitui uma abordagem inovadora para a reconstrução óssea de uma forma mais eficaz e menos traumática. Técnicas recentes, tais como a micro-encapsulação - baseada em membranas finas sintéticas que impedem a entrada de anticorpos ou em biorreatores de fibra oca para perfusão extracorporal de sangue - precisam de ser aprofundadas, melhoradas e aplicadas clinicamente (Ferrari et al., 2007).

As mais recentes soluções originárias da Engenharia Tecidual têm por base novos biomateriais que integram células estaminais. Estas células podem ser obtidas de vários locais (tal como foi referido no capítulo 1), entre os quais origem dentária. Por exemplo, as células da polpa dentária podem ser diferenciadas *in vitro* e em seguida transplantadas para o hospedeiro com recurso a matrizes especializadas, não desencadeando rejeição imunológica (d'Aquino et al., 2007; Graziano et al., 2008). A área da Dentística procura, presentemente, técnicas e materiais que permitam a regeneração biomimética do complexo dentina-polpa. Uma possível resposta a esta procura poderá surgir da Engenharia Tecidual. Estudos indicam que as DPSCs e as SHEDs podem ser induzidas à diferenciação em odontoblastos (Sakai et al., 2010; Casagrande, 2010). Para além disso, tem sido demonstrado que as células podem diferenciar-se numa vertente de odontoblastos que gerem dentina tubular *in vivo* (Sakai et al., 2010; Huang et al., 2009). Concomitantemente, concluiu-se que as DPSCs são capazes de produzir tecidos de celulose/dentina semelhantes aos de um canal radicular humano esvaziado em que se verifica a deposição de uma camada de tecido mineralizado nas paredes do canal (Huang et al., 2009). Estes resultados suportam o conceito de que a regeneração do complexo dentina-polpa com células estaminais é clinicamente viável. No entanto, esta encontra-se dificultada em casos de pequenas câmaras pulpares e canais radiculares com ápice fechado (Vinicius et al., 2012).

O futuro da Engenharia Tecidual em Medicina Dentária é emocionante. A curto prazo, os conhecimentos teóricos relativos aos materiais, genética, biologia celular e molecular, novas alternativas de regeneração de osso e tecidos moles, gestão da doença periodontal e procedimentos restauradores para regenerar esmalte, dentina e polpa serão aplicados

cl clinicamente (Nor, 2006; Sakai et al., 2010). De salientar que procedimentos futuros passam pelo uso crescente de transplantes autólogos, em que o material a transplantar é obtido a partir do mesmo indivíduo a quem irá ser reimplantado (Aquino, 2009).

### **3. TECIDO DENTÁRIO – UMA NOVA FONTE DE CÉLULAS TOTIPOTENTES**

As células estaminais pós-natais podem apresentar diversas origens, inclusive dentária (Gronthos et al., 2002). A primeira célula estaminal dentária descrita na literatura foi isolada da polpa dentária e designou-se de célula estaminal da polpa dentária (DPSC) (Gronthos et al., 2000). Posteriormente, mais três grupos de populações estaminais dentárias foram isolados e caracterizados: as células estaminais de dentes decíduos (SHEDs) (Miura et al., 2003), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs) (Seo et al., 2004) e células estaminais da papila apical (SCAPs) (Sonoyama et al., 2006; Sonoyama et al., 2008). Mais recentemente, identificou-se um quinto grupo populacional, as células do folículo dentário precursor (DFPCs) (Morsczeck et al., 2005).

Estudos publicados revelam que as DPSCs, SHEDs, DFPCs e PDLSCs cumprem todos os requisitos para ser consideradas células estaminais: aderem a plástico; expressam os marcadores celulares CD73, CD90 e CD105; e têm a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* e *in vivo*. No caso das SCAPs, embora tenham presentes os marcadores mesenquimais, a diferenciação condrogénica ainda não foi demonstrada (Huang et al., 2009). As células estaminais de origem dentária são multipotentes, constituem fontes acessíveis para recolha e têm a capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens celulares (Yen e Sharpe, 2008; Rodríguez-Lozano et al., 2011). As células estaminais dentárias podem ser enquadradas em dois grupos diferentes no que diz respeito ao seu potencial de diferenciação. O primeiro grupo está associado com a polpa dentária e é constituído pelas DPSCs, SHEDs e SCAPs. O segundo grupo está associado ao periodonto e é constituído pelas PDLSCs (Morsczeck, Reichert e Galler, 2008). É difícil agrupar estas células através dos seus marcadores de proteína de superfície pois estes variam consoante o grupo celular. No entanto, algumas proteínas de superfície, como Stro-1 e CD73, são expressas por todas as células. O conhecimento mais profundo dos marcadores dos diferentes grupos celulares é determinante para o estudo da sua diferenciação celular e plasticidade (Morsczeck, Reichert e Galler, 2008).

Atualmente, a utilização de células estaminais dentárias na prática clínica é ainda problemática. Um dos motivos é que, contrariamente às células da medula óssea que estão disponíveis para recolha a qualquer momento, a disponibilidade destas células é restrita a períodos temporais específicos (Morsczeck, Reichert e Galler, 2008). As DFPCs e as SCAPs encontram-se disponíveis a partir da erupção do dente do siso (geralmente entre os 15 e os 28 anos de idade). Infelizmente, durante a adolescência, a necessidade de tratamentos sofisticados que envolvam a utilização de células estaminais dentárias é um evento bastante raro. Instalações de armazenamento especiais para as células estaminais podem constituir uma solução para este problema, tornando estas células disponíveis sempre que necessário. As DPSCs e as PDLCs apresentam menor condicionamento temporal na recolha uma vez que podem ser recolhidas através de dentes decíduos esfoliados, de dentes do siso e de dentes extraídos durante o tratamento ortodôntico. No entanto, a qualidade destas células no que refere à taxa de proliferação e potencial de diferenciação é menor comparativamente com as DFPCs e as SCAPs (Sonoyama et al., 2006; Morsczeck, Reichert e Galler, 2008).

Esta nova fonte de células estaminais pode ser benéfica para a terapia celular, para o eventual desenvolvimento de técnicas regenerativas e cura para doenças degenerativas (Rodríguez-Lozano et al., 2011).

### **3.1. Células Estaminais da Polpa Dentária (DPSCs)**

A presença de células estaminais na polpa dentária foi proposta pela primeira vez em 1990 por Fitzgerald et al. Esta equipa observou que após a ocorrência de lesão/trauma em que se verifique a morte de odontoblastos maduros, surgem células semelhantes a fibroblastos capazes de se diferenciar em odontoblastos (Fitzgerald et al., 1990). Apesar destes desenvolvimentos precoces, apenas em 2000 foi possível identificar e isolar DPSCs oriundas da polpa dentária de um indivíduo adulto (Gronthos et al., 2000).

As DPSCs são células de origem mesenquimal e caracterizam-se como sendo clonogénicas, multipotentes, com elevada capacidade proliferativa (até 25 passagens), representam menos de 1% da população total de células presentes na polpa dentária e prevê-se que residam nas diferentes regiões da mesma (Sloan e Waddington, 2009).

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

No tecido dentário adulto, as células estaminais encontram-se geralmente inativas e apenas se tornam ativas após lesão (Waddington et al., 2009). A sinalização celular é determinante na ativação, diferenciação e proliferação das DPSCs (He et al, 2009; Zhang et al, 2008). A proliferação e diferenciação das DPSCs ocorre normalmente após a infecção da polpa dentária. Estudos demonstraram que a inflamação da polpa dentária local, interferiu com a diferenciação de odontoblastos e com a reparação de dentina. Estes resultados sugerem que as DPSCs têm um papel significativo na inibição da inflamação oral e dentária (Chang et al., 2005).

Tentativas para isolar e caracterizar as linhas celulares da polpa dentária relataram a presença de células STRO-1-positivo, com elevada eficiência de formação de colônias. Recentemente foi possível isolar um conjunto de células estaminais a partir de polpa dentária com a capacidade de diferenciação para linhagens estromais, especialmente osteoblastos (Laino et al., 2006; Laino et al., 2005). Estudos baseados no potencial odontogênico e proliferativo das DPSCs relataram resultados diferentes após a implantação de colônias de uma única célula de DPSC isolada a partir da polpa dentária de um indivíduo adulto, o que sugere que haja mais do que uma população de células estaminais na polpa dentária (Gronthos et al., 2002; Téclès et al., 2005). Até agora, foram identificadas pelo menos duas populações de células estaminais diferentes, uma originária da crista neural (o derivado de ectomesênquima) e outra de origem mesenquimal (Waddington, Youde e Sloan, 2009). Estas células expressam marcadores tais como CD13, CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD146 e STRO -1, mas não expressam CD14, CD24, CD34, CD45, CD19 e HLA-DR (Lindroos et al., 2008; Huang et al., 2009; Karaoz et al., 2010).

A plasticidade das DPSCs foi verificada *in vitro* e *in vivo*. Têm a capacidade de se diferenciar em odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, células neurais, cardiomiócitos, miócitos e condrócitos. Podem formar nódulos mineralizados com estrutura semelhante a dentina *in vitro* e são osteoindutores de dentina reparadora sobre a superfície de dentina humana *in vivo*. São ainda capazes de produzir células semelhantes às da dentina rodeadas por tecido intersticial semelhante ao da polpa *in vivo* (Gronthos et al., 2000; Stevens et al., 2008; Ye et al., 2005; About et al., 2000; Nosrat et al., 2001). Um estudo clínico desenvolvido por d'Aquino et al. deu evidência clínica e radiográfica de regeneração

óssea após transplante de DPSCs numa zona onde ocorreu a exodontia prévia de terceiros molares inferiores (d'Aquino et al., 2009).

O protocolo de isolamento e caracterização das DPSCs é semelhante ao utilizado para as BM-MSCs e ocorre por digestão enzimática do tecido pulpar depois de se separar a coroa das raízes (Gronthos et al., 2000). DPSCs isoladas após digestão enzimática do tecido pulpar organizam-se segundo unidades formadoras de colónias humanas (CFUs) que apresentam diferentes densidades, tamanhos e morfologia. Isto sugere que cada célula pode ter um potencial de proliferação/diferenciação distinto, o que também é relatado para as BMMSCs (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2006). Além disso, não se verifica uniformidade na presença de marcadores celulares no mesmo grupo celular, o que comprova que esta população é heterogénea (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2006). O isolamento de diferentes populações de células estaminais na polpa dentária apresenta-se ainda nos estágios iniciais. A dificuldade reside na falta de marcadores específicos da superfície celular (Petrovic e Stefanovic, 2009). Estudos concluíram que as DPSCs podem ser criopreservadas, conservando a sua capacidade de diferenciação multipotencial (Pappacio et al., 2006).

As DPSCs apresentam maior capacidade de produção de CFUs do que as BMMSCs e demonstram maior capacidade de sobrevivência durante um período de tempo mais longo, sendo replicadas com uma elevada taxa de proliferação sem sinais de senescência (Gronthos et al., 2000). O seu potencial de diferenciação parece ser diferente do apresentado pelas BMMSCs, dada a sua maior tendência para se diferenciarem em linhagens odontogénicas/osteogénicas (Huang, Gronthos e Shi, 2009). As DPSCs, quando expostas às condições ideais, apresentam melhor capacidade imunorreguladora (por inibição das células T) que as BMMSCs. No entanto, as DPSCs podem não provocar respostas imunitárias humorais, sendo assim imunoprivilegiadas (Caplan e Bruder, 2001; Pierdomenico et al., 2005).

Futuras investigações relativas às DPSCs devem ser focadas na procura dos biomateriais que maximizem a migração dessas células para o local da lesão (Rodríguez- Lozano et al., 2001).

### **3.2. Células Estaminais de Dentes Decíduos (SHEDs)**

As SHEDs são células estaminais isoladas a partir da polpa dentária de dentes decíduos e encontram-se nos restos de celulose destes dentes (Mira et al., 2003). Miura et al. em 2003 relataram pela primeira vez o potencial de obtenção de células estaminais a partir de dentes decíduos humanos (Miura et al., 2003). O local da sua recolha apresenta uma grande vantagem, uma vez que são dos poucos tecidos humanos pós-natais descartáveis. Como os dentes primários são uma fonte viável de células estaminais pós-natal, o interesse para a diferenciação destas células aumentou (Sakai et al., 2010; Sakai et al., 2009; Casagrande et al., 2010).

Tal como as DPSCs, as SHEDs são uma população heterogénea de células multipotentes e têm propriedades imunossupressoras (Miura et al., 2003). A sua morfologia é semelhante à das DPSCs, SCAPs e DPSCs e, também expressam as moléculas da superfície celular STRO-1 e CD146. A presença destas moléculas junto aos vasos sanguíneos da polpa significa que são provavelmente originárias de um microambiente perivascular. Para além dos anteriores, expressam ainda Oct14, CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146 e CD166, mas não expressam CD14, CD34, ou CD45 (Vinicius et al., 2012). Estas células SHED têm a capacidade de se diferenciar em odontoblastos, células neuronais (como as células gliais), adipócitos, condrócitos, miócitos e são capazes de induzir a diferenciação em células formadoras de osso (Seo et al., 2004; Koyama et al., 2009).

As SHEDs representam uma população de células estaminais multipotentes mais imaturas do que as DPSCs e a sua capacidade para ultrapassar as fronteiras entre diferentes linhagens celulares expande o potencial uso para terapias que envolvam um grande número de tecidos (Sakai et al., 2010; Sakai et al., 2009; Casagrande et al., 2010). Embora tanto as DPSCs como as SHEDs tenham origem na polpa dentária, apresentam diferenças relativamente à diferenciação odontogénica e indução osteogénica. Por exemplo, os níveis de atividade de fosfatase alcalina e de osteocalcina durante a diferenciação osteogénica são mais elevados nas SHEDs do que nas DPSCs (Koyama et al., 2009), o que significa que as SHEDs apresentam uma capacidade osteoindutora que não se observa nas DPSCs (Miura et al., 2003). Quanto à capacidade de regenerar um complexo dentina-polpa, esta é semelhante nos dois tipos celulares (Gronthos et al., 2000; Miura et al.,

2003). Para além disso, as SHEDs apresentam maior taxa de proliferação e duplicação populacional celular comparativamente com as DPSCs e com as BM-MSCs (Seo et al., 2004).

### **3.3. Células Estaminais do Ligamento Periodontal (PDLSCs)**

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo especializado, derivado do folículo dentário e originado a partir de células da crista neural. Este componente liga o cemento ao osso alveolar e tem a função de envolver o dente no alvéolo (Coura et al., 2008; Mao et al., 2006). Um estudo de 2002 identificou a presença de células estaminais no ligamento periodontal humano (Gronthos et al., 2002) e, em 2004, Seo e colaboradores sugeriram que estas células estaminais são multipotentes pós-natais e que podem ser isoladas utilizando culturas de explantes ou digestão enzimática, e expandidas *in vitro* (Seo et al., 2004). Estas células estão presentes tanto em dentes saudáveis como em dentes com periodontite (Chen et al., 2006).

As PDLSCs apresentam capacidade de diferenciação em adipócitos, odontoblastos, condrócitos, osteoblastos, cementoblastos, miotúbulos, células neuronais NFM-positivos, astrócitos GFAP-positivos e oligodendrócitos CNPase-positivos (Seo et al., 2004; Shi et al., 2002; Techawattanawisal et al., 2007). Além disso, também formam fibras de colagénio semelhantes às fibras de Sharpey (Seo et al., 2004; Huang et al., 2008). As PDLSCs desempenham ainda um papel na reparação do tecido periodontal (Rodríguez-Lozano et al., 2011) e na regeneração óssea (Seo et al., 2004).

As PDLSCs apresentam características semelhantes às DPSCs e às BMMSCs. Todas estas células são positivas para os marcadores CD44, CD90, CD105 e CD166; mas negativas para CD40, CD80, e CD86 (Wada et al., 2009). As PDLSCs e as DPSCs expressam HLA-ABC (antigénio do MHC de classe I) semelhante às BMDSCs, enquanto a HLA-DR (antigénio de MHC de classe II) não foi detetada nestas populações de células (Wada et al., 2009). Tanto as PDLSCs como as DPSCs possuem propriedades imunossupressoras. As PDLSCs apresentam altos níveis de telomerase, uma molécula-chave na mediação da proliferação de células, o que promove um maior ritmo de proliferação celular comparativamente com as BMMSCs (Shi et al., 2002; Gay, Chen e MacDougall, 2007).

A possibilidade de obtenção e criopreservação destas células demonstra que a criação de bancos de tecidos para aplicações futuras é uma alternativa viável e a considerar (Seo, Miura e Sonoyama, 2005).

### **3.4. Células Estaminais da Papila Apical (SCAPs)**

As SCAPs apresentam-se como uma categoria de células estaminais derivadas das DPSCs e encontram-se na papila apical de dentes permanentes humanos imaturos (Sonoyama et al., 2006; Sonoyama et al., 2008). A distinção entre a polpa dentária e a papila apical é que a papila apical representa um precursor para o tecido pulpar (Rodríguez-Lozano et al., 2011). A papila dentária é um tecido embrionário que se mantém após o nascimento para auxiliar a maturação e formação da coroa dentária, daí que as SCAPs apenas possam ser isoladas durante um período de tempo restrito (Morsczeck, Reichert e Gallet, 2008).

Nos dentes em desenvolvimento, a formação de raízes começa com a proliferação apical de células epiteliais que influenciam a diferenciação de odontoblastos (a partir de mesênquima indiferenciado) e cementoblastos (a partir do folículo mesenquimal). Sabe-se que a papila dentária, para além de contribuir para a formação do dente, se converte eventualmente em tecido pulpar (D'Souza, 2002; Linde e Goldberg, 1993; Ruch, Lesot e Begue-Kirn, 1995). À medida que a raiz se continua a desenvolver após a fase de sino, a papila dentária tende a localizar-se apicalmente ao tecido pulpar. A descoberta das SCAPs explica a apexogenesis, que ocorre em dentes permanentes imaturos infetados com periodontite perirradicular ou abscesso (Chueh e Huang, 2006). Isto ocorre pois, após a realização de tratamento endodôntico, as células estaminais residentes na papila apical que sobreviveram à infeção dão origem a odontoblastos primários para completar a formação de raízes (Sonoyama et al., 2008; Huang et al., 2008).

As SCAPs apresentam maior taxa de proliferação que as DPSCs, apresentam níveis de osteo/dentinogénese semelhantes aos das DPSCs e realizam adipogénese (Sonoyama et al., 2008). Exibem heterogeneidade quanto aos seus marcadores celulares, apresentando co-expressão de STRO-1 com uma variedade de marcadores osteo/dentinogénicos. Além disso, manifestam vários marcadores neurais, o que leva a crer que são derivadas de células da crista neural, ou, pelo menos, associadas com as células da crista neural (Sonoyama et al., 2008; Huang et al., 2008). As SCAPs apresentam maior capacidade de

regeneração da dentina do que as DPSCs. Pensa-se que as SCAPs possam ser responsáveis pela formação da dentina da raiz, enquanto as DPSCs são a fonte de odontoblastos de substituição (responsáveis pela produção de dentina reparadora) (Huang, Grothos e Shi, 2009; Huang et al., 2008).

Estas células expressam marcadores mesenquimais como o CD13, CD24, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106 e CD146 e não expressam CD18, CD34, CD45 ou CD150. Apresentam capacidade de diferenciação em células osteogénicas, odontogénicas, adipogénicas e neurogénicas (Sonoyama et al., 2008; Abe, Yamaguchi e Amagasa, 2007; Kikuchi et al., 2004). Quanto ao potencial de diferenciação miogénica e condrogénica, este não foi determinado. Estudos relatam a capacidade de diferenciação das SCAPs num complexo dentino-pulpar desde que se verifique um substrato de suporte adequado (Sonoyama et al., 2008; Huang et al., 2008).

### **3.5. Células Estaminais do Folículo Dentário Progenitor (DFPCs)**

As DFPCs localizam-se ao nível do folículo dentário, um tecido mesenquimal que envolve o germe do dente em desenvolvimento (Morszeck et al., 2005; Morszeck et al., 2009). O folículo dentário desempenha um papel crucial no desenvolvimento dos dentes e contém precursores do periodonto. As DFPCs encontram-se separadas da dentina em desenvolvimento pelas camadas de células epiteliais (Bainha de Hertwig) durante a primeira fase do desenvolvimento periodontal (McNeil e Thomas, 1993; Spouge, 1980). Estas células têm sido isoladas a partir dos folículos dentários humanos de terceiros molares retidos, utilizando culturas de explantes ou digestão enzimática (Morszeck et al., 2009).

Semelhantes a outras células estaminais dentárias, estas formam pequenas quantidades de colónias clonogénicas aderentes quando originárias da digestão enzimática e podem ser mantidas em cultura durante pelo menos 15 passagens (Morszeck et al., 2005). As DFPCs expressam os marcadores das células estaminais, incluindo o STRO-1, nestina, Notch-1, colagénio tipo I, Runx-2 e osteocalcina (Moszeck et al., 2005; Moszeck et al., 2006; Moszeck et al., 2005). Apresentam ainda outros marcadores como o CD10, CD13, CD29, CD44, CD53, CD59, CD73, CD90 e CD105, e não expressam CD34, CD45 ou HLA-DR (Lindroos et al., 2008; Huang et al., 2009; Yagyuu et al., 2010). As DFPCs

humanas têm a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, fibroblastos, condrócitos, cementoblastos, adipócitos, e células neuronais (Morszeck et al., 2005; Morszeck et al., 2009; Morszeck et al., 2008; Yao et al., 2008). Estudos verificaram uma elevada heterogeneidade na diferenciação populacional, o que pode refletir as diversas vias de desenvolvimento individuais na formação do tegumento dentário (Luan et al., 2006).

Resultados de estudos *in vitro* sugerem que DPSC têm potencial de formação de tecido duro maior do que DFPCs. Isto pode ser explicado pela fase de desenvolvimento dos germes dentários a partir dos quais estas células são derivadas. Na fase de formação de coroa, a mineralização (dentinogênese) pode ser detetada em certas zonas da papila dentária, mas não no folículo dental (cementogênese) (Yagyuu et al., 2010). Estas células são capazes de recriar um novo ligamento periodontal após o implante *in vivo* (Yokoi et al., 2007).

**Tabela 1: Tabela-Resumo dos Marcadores Celulares das células estaminais dentárias [Adaptado de Rodríguez-Lozano et al., 2011].**

	<b>BMMSCs</b>	<b>DPSCs</b>	<b>SHEDs</b>	<b>SCAPs</b>	<b>DFPCs</b>	<b>PLSCs</b>
<b>Marcadores Presentes</b>	CD13  CD44  CD73 CD90 CD105 CD106  HLA-A HLA-B HLA-C	CD13  CD29 CD44  CD59 CD73 CD90 CD105  CD146  CD166	CD13  CD29 CD44  CD73 CD90 CD105  CD146 CD166	CD13 CD24 CD29 CD44  CD73 CD90 CD105 CD106 CD146	CD10 CD13  CD29 CD44 CD53 CD59 CD73 CD90 CD105	CD10 CD13  CD29 CD44  CD59 CD73 CD90 CD105
<b>Marcadores Ausentes</b>	CD14  CD34 CD45  HLA-DR	CD14  CD19 CD24 CD34 CD45  HLA-DR	CD14  CD34 CD45	CD18  CD34 CD45 CD150	CD34 CD45  HLA-DR	CD14  CD34 CD45  HLA-DR

**Tabela 2: Tabela-Resumo do Potencial de Diferenciação das Células Estaminais Dentárias [Adaptado de Mohamed et al., 2011].**

	DPSCs	SHEDs	PDLSCs	DFPCs	SCAPs
<b>Adipogénica</b>	+	+	+	+	+
<b>Condrogénica</b>	+	+	+	+	Não Determinado
<b>Miógénica</b>	+	+	Não Determinado	+	Não Determinado
<b>Neurogénica</b>	+	+	+	+	+
<b>Odontogénica</b>	+	+	+	+	+
<b>Osteogénica</b>	+	+	+	+	+

#### **4. CAPACIDADE ODONTOGÉNICA COMPARATIVA ENTRE AS CÉLULAS ESTAMINAIS DA MEDULA ÓSSEA E DA POLPA DENTÁRIA.**

Desde a altura em que foram descobertas, as células estaminais sempre despoletaram interesse para a realização de terapias celulares. Promovidos estudos neste sentido, surgiu o conhecimento de uma variedade significativa destas células, encontrando-se as células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea nos primórdios destas descobertas (Morsczeck et al., 2008).

As BMMSCs encontram-se em estreita vizinhança com as células estaminais hematopoiéticas e foram inicialmente designadas "células estromais da medula óssea" (Friedenstein e Kuralesova, 1971). A sua capacidade para formar colónias clonogénicas é semelhante à das células estaminais hematopoiéticas, e define a sua capacidade para sofrer auto-renovação. No entanto, as BMMSCs estão limitadas a um potencial de crescimento de aproximadamente 30 a 50 duplicações da população (Bruder et al., 1997; Bianco et al., 2001). Podem ser isoladas a partir de suspensões originadas da aspiração da medula óssea (Pittenger et al., 1999) e apresentam capacidade de migração (Huttmann, Li e Duhrsen, 2003; Mezey et al., 2003). Morfológicamente são uma população que apresenta uma heterogeneidade considerável em termos de tamanho, morfologia, histoquímica, proliferação, maturidade celular e potencial de desenvolvimento (Friedenstein et al., 1987; Kuznetsov et al., 1997; Owen e Friedenstein, 1988; Gronthos et al., 1999; Stewart et al., 1999). São capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos ou células da retina, o que significa que apresentam uma capacidade de

diferenciação em células de pelo menos duas camadas germinativas diferentes (Mezey et al., 2000; Pittenger et al., 1999; Tomita et al., 2006; Woodburry et al., 2000). Alguns estudos têm relatado a possibilidade de diferenciação miogénica (Ferrari et al., 1998; Orlic et al., 2001; Barbash et al., 2003; Gojo et al., 2003).

Devido a certas lacunas na obtenção das BMMSCs (incluindo dor, morbidade e baixo número de células em cada colheita), fontes alternativas de células estaminais têm sido procuradas (Huang, Gronthos e Shi, 2009). Nos últimos tempos, terapias com células dentárias têm sido discutidas através da combinação de células estaminais mesenquimais não-dentárias e células estaminais dentárias (Maria et al., 2007; Murra, Garcia-Godoy e Hargreaves, 2007; Ohazama et al., 2004; Sloan e Smith, 2007). No seguimento da realização de inúmeros estudos neste âmbito, concluiu-se que as BMMSCs podem ser reprogramadas de modo a constituírem uma possibilidade válida para o desenvolvimento de engenharia tecidual dentária (Hu et al., 2006). Estes dados são promissores, mas a utilização de células estaminais dentárias - como as DPSCs - parece mais viável uma vez que estas células se encontram intimamente relacionadas com os tecidos dentários maduros (Morszeck et al., 2008).

As DPSCs e BMMSCs, devido à sua capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares mesenquimais, são ótimas candidatas para realização de engenharia tecidual com o objetivo de reconstrução de todo o elemento dentário e de tecido ósseo respetivamente (Gronthos et al., 2000, 2002, 2006; Bianco et al., 2001; Batouli et al., 2003; Yeon Lim et al., 2006). Estudos previamente realizados demonstraram que a dentinogénese e a osteogénese mediada pelas DPSCs e BMMSCs ocorrem através de mecanismos distintos, promovendo a organização diferenciada dos diferentes elementos dentários e osso (Batouli et al., 2003). Estudos parecem demonstrar que tanto as DPSCs como as BMMSCs podem ser utilizadas para gerar estruturas dentárias sob condições adequadas (Gronthos et al., 2000, 2002; Batouli et al., 2003; Iohara et al., 2004; Ohazama et al., 2004; Hu et al., 2006; Yu et al., 2006). O conhecimento é limitado na medida em que pouco se sabe sobre as diferenças existentes na odontogénese quando mediadas pelos diferentes grupos celulares, ainda que as DPSCs pareçam ser mais competentes que as BMMSCs nesta função (Yu et al., 2007).

#### 4.1. Comparação do Imunofenótipo relativo às DPSCs e BMMSCs

Para identificar possíveis diferenças entre as DPSCs e as BMMSCs, os seus fenótipos celulares foram determinados com recurso a técnicas de imunocitoquímica.

**Tabela 3: Tabela-Resumo do Imunofenótipo das DPSCs e BMSSCs [Adaptado de Yu et al., 2007].**

Anticorpo	DPSCs	BMMSCs
ALP	+	+
bFGF	+	+
Col III	+	+
Fator VIII	+	+
STRO-1	+	+
Vimentina	+	+
CD-14	-	-
CD-45	-	-
CK	-	-
Col II	-	-
DMP-1	-	-
DSPP	-	-
EMA	-	-
GFAP	+	-
HNK-1	+	-
P75	+	-
S-100	+	-
Nestina	+	-
BSP	-	+
Col 1	-	+
OC	-	+
OPN	-	+
$\alpha$ -SMA	-	+

Ambas as populações apresentam as proteínas ALP (marcador de osteoblastos), bFGF (marcador de fibroblastos), Col III (marcador de fibroblastos), fator VIII (marcador de células endoteliais), STRO-1 (marcador das células mesenquimais), vimentina (marcador de células mesenquimais), CD-14 (marcador de macrófagos/monócitos), CD-45 (marcador de leucócitos), CK (marcador celular epitelial), Col II (marcador de condrócitos), DMP-1 (marcador de odontoblastos), DSPP (marcador de odontoblastos) e EMA (marcador de células epiteliais) (Yu, et al., 2007).

A expressão proteica foi positiva para as DPSCs e negativa para as BMMSCs no que diz respeito aos marcadores de células estaminais derivadas da crista neural tais como GFAP (proteína glial), HNK-1 (antígeno humano “natural killer”), baixa afinidade com o recetor do neurónio responsável pelo fator de crescimento (P75), S-100 e nestina. Contrariamente, a expressão foi positiva para as BMMSCs e negativa para as DPSCs nas: BSP (sialoproteína óssea, marcador de osteoblastos), Col I (marcador de osteoblastos), OC (osteocalcina, marcador de osteoblastos), OPN (osteopontina, marcador de osteoblastos) e  $\alpha$ -SMA (actina de músculo liso- $\alpha$ , marcador celular do músculo liso) (Yu, et al., 2007).

Podemos concluir que, face às características anteriormente apresentadas, as DPSCs e BMMSCs constituem dois tipos de células de diferentes origens embora ambas as populações expressem alguns marcadores semelhantes aos do mesênquima (Yu, et al., 2007).

#### **4.2. Diferenciação Odontogénica Comparativa das DPSCs e BMMSCs**

Embora que fisiologicamente semelhantes, as DPSCs e as BMMSCs são originárias de duas populações de células estaminais mesenquimais diferentes, o que faz com que apresentem variações quanto à sua diferenciação odontogénica (Gronthos et al., 2000; Shi et al., 2001).

A avaliação da atividade de proliferação comparativa das DPSCs e BMMSCs é feita através da análise da razão de células em fase S+G2M do ciclo celular. Esta análise demonstrou que a atividade proliferativa é significativamente diferente entre as duas populações celulares. Estudos demonstram que, quando transplantadas, a velocidade de mineralização das DPSCs excede a das BMMSCs (Krebsbach e Robey, 2002).

Ao combinar DPSCs com ABC verifica-se a indução da amelogenese e dentinogenese típicas, o que sugere que as DPSCs preservam a sua informação morfogenética ao longo do tempo (herdada a partir de células da papila dentária). Contrariamente, ao combinar BMMSCs com ABC verifica-se que este conjunto não é capaz de realizar amelogenese, ainda que realize uma dentinogenese atípica (Yu et al., 2007).

O potencial condrogénico e adipogénico das DPSCs parece frágil comparativamente com o das BMMSCs (Zhang et al., 2006; Sonoyama et al., 2008). Por outro lado, o potencial neurogénico é mais potente nas DPSCs do que nas BMMSCs, o que pode ser justificado pela origem das DPSCs na crista neural (Huang, Gronthos e Shi, 2009).

Estes dados permitem concluir que as DPSCs apresentam maior competência odontogénica, sendo desta forma, o substituto ideal na realização de engenharia tecidual dentária. Para que esta morfogénese dentária seja a mais adequada possível deve ser mediada com recurso à combinação com ABC (Yu et al., 2007).

## **5. COMPARAÇÃO DA VIABILIDADE DE UTILIZAÇÃO ENTRE CÉLULAS ESTAMINAIS PROVENIENTES DE DENTES DECÍDUOS E PERMANENTES**

As pesquisas sobre a possibilidade de utilização de células estaminais com finalidade terapêutica têm-se mostrado promissoras, porém encontram-se limitadas por barreiras legais e éticas, uma vez que pressupõem a utilização de embriões humanos. Dessa forma, alternativas que utilizem células-tronco de tecidos adultos têm sido procuradas (Hau et al., 2006). Entre estas alternativas destacam-se as células estaminais provenientes de tecidos dentários, sendo os principais alvos de recolha os dentes decíduos, os dentes permanentes (nomeadamente o terceiro molar) e os dentes supranumerários (Karaoz et al., 2009).

A aplicação clínica das células estaminais dentárias surge do conhecimento de que o tecido da polpa dentária é derivado de células da crista neural que migram durante o desenvolvimento embrionário (Chai et al., 2000) e da existência de várias populações de células estaminais ou progenitoras multipotentes constituintes – DPSCs, SHEDs, PDLSCs, DFPCs e SCAPs (Miura et al., 2003; Nosrat et al., 2001; Gronthos et al., 2002). O mesmo não acontece com as BMMSCs cuja origem remete para a mesoderme, ainda que sejam frequentemente utilizadas no tratamento de doenças neurodegenerativas (Wang et al., 2009).

Diferentes fontes de recolha de células estaminais produzem diferentes citocinas e fatores de crescimento, pelo que podem ser mais adequados para aplicações clínicas

específicas. Da mesma forma, a hipótese de que a expressão genética varia entre os diversos grupos celulares, determina o potencial de desenvolvimento e diferenciação destas células (Govindasamy et al., 2010).

O primeiro relato relativo à recolha de células estaminais dentárias surge com o estudo de células isoladas a partir da polpa dentária de terceiros molares, no qual se concluiu que estas apresentam a capacidade de formar estruturas semelhantes às dentino-pulparens *in vivo* e *in vitro* (Gronthos et al., 2000). Posteriormente, determinou-se a possibilidade de originar células ectomesenquimais a partir de células estaminais recolhidas de dentes decíduos exfoliados (Miura et al., 2003). Atualmente, sabemos que independentemente das células estaminais serem recolhidas de dentes decíduos ou permanentes, estas apresentam capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares, nomeadamente odontoblastos, osteoblastos, adipócitos, células nervosas, células do músculo esquelético e/ou liso, células endoteliais e células cartilagueas (Arthur et al., 2008; d'Aquino et al., 2007; Gandia et al., 2008; Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2008; Iohara et al., 2004; Jo et al., 2007; Kerkis et al., 2006; Laino et al., 2005; Miura et al., 2003; Nosrat et al., 2001; Otaki et al., 2007; Papaccio et al., 2006; Yu et al., 2007; Zhang et al., 2006). Estudos indicam que, no que diz respeito à diferenciação osteogénica, adipogénica e neuronal, as SHEDs apresentam melhor capacidade de diferenciação do que DPSCs (Wang et al., 2009; Chai et al., 2000). Por outro lado, as DPSCs foram consideradas mais apropriadas para a regeneração do tecido odontológico e doenças neurodegenerativas (Batouli et al., 2003; Sasaki et al., 2008). De salientar ainda que, enquanto as SHEDs mantêm a sua plasticidade durante o processo de diferenciação celular, o mesmo não se verifica nas DPSCs (Govindasamy et al., 2010).

Como referido em capítulos anteriores, a polpa dos dentes decíduos e permanentes contém uma população de células estaminais pluripotentes. Ainda assim, as SHEDs apresentam uma quantidade muito superior de marcadores pluripotentes em comparação com as DPSCs (Nekanti et al., 2010; Govindasami et al., 2010). Podemos então assumir que as SHEDs são semelhantes em muitos aspetos às células do cordão umbilical, representando uma população mais primitiva de células estaminais (Hau et al., 2006). A sobre-expressão de fatores de transcrição como POU5F1 (também conhecidos como OCT3/4), SOX2, NANOG e LIN28 - responsáveis pela manutenção da pluri-potência em

embriões precoces e células estaminais embrionárias – vem corroborar o facto previamente apresentado (Niwa, 2007; Pesce, Anastassiadis e Scholer, 1999).

Com base na literatura corrente, pode-se concluir que as células estaminais de origem dentária constituem uma alternativa viável para a regeneração tecidual (Hau et al., 2006). Tanto as DPSCs como as SHEDs são vantajosas comparativamente às BMMSCs no que refere à facilidade de isolamento, recolha não invasiva e questões éticas limitadas (Nakamura et al., 2009). Pela facilidade de obtenção, as SHEDs destacam-se ainda mais (uma vez que são oriundas de dentes decíduos rotineiramente extraídos na infância e geralmente descartados como lixo hospitalar), constituindo uma fonte ideal para reparar estruturas dentárias comprometidas, induzir regeneração óssea e possivelmente, tratar danos no tecido nervoso ou doenças degenerativas (Hau et al., 2006).

A taxa de proliferação de células provenientes de dentes decíduos ou permanentes é variável. O estudo de Gronthos et al. sugere uma hierarquia de células progenitoras na polpa dentária adulta, que inclui uma população menor de células estaminais auto-renovadoras (altamente proliferativas e multi-potentes) dentro de um compartimento maior de células progenitoras mais comprometidas (Gronthos et al., 2002). O conceito de uma hierarquia na diferenciação celular foi previamente descrito para outras populações de células estaminais, como as da medula óssea (Kusnetsov, 1997). Miura et al., em 2003, vieram comprovar que células isoladas de um remanescente pulpar de dentes decíduos esfoliados apresentam maior número de divisões celulares, formação de colónias, capacidade de osteoindução *in vivo* e não formação de tecido semelhante ao complexo dentina-polpa. Face a estes resultados, os autores sugerem que as células-tronco de dentes decíduos representam uma população de células multipotentes que seriam mais imaturas do que as populações de células estaminais mesenquimais pós-natais previamente examinadas (Miura et al., 2003). As SHEDs apresentam maior taxa de proliferação que as DPSCs e BMMSCs (Miura et al., 2003). Tal facto pode ser comprovado pela elevada expressão de TGF-B2 e TGF-B3 nas SHEDs, sendo que o conjunto das TGF-Bs apresenta um papel crucial na regulação da proliferação, formação da matriz extracelular, diferenciação, migração e apoptose celular (Lee et al., 2006; Chan et al., 2005).

Podemos então concluir que as células estaminais de dentes decíduos representam uma população de células estaminais pós-natais capazes de proliferação extensiva e diferenciação multipotencial. Portanto, os autores sugerem que os dentes decíduos esfoliados, pela facilidade de obtenção, podem ser uma fonte ideal de células-tronco para reparar estruturas dentárias comprometidas, induzir regeneração óssea e possivelmente, tratar alterações do tecido nervoso ou doenças neurodegenerativas (Miura et al., 2003).

**Tabela 4: Tabela-Resumo do Fenótipo, Capacidade Formadora de Colônias, Conteúdo de DNA e Potencial de Diferenciação entre as SHEDs e as DPSCs [Adaptado de Govindasamy et al., 2010].**

<b>Parâmetros</b>	<b>SHEDs</b>	<b>DPSCs</b>
<u>CD34</u>	0	0
<u>CD44</u>	94.21 ± 2.9	95.83 ± 1.8
<u>CD45</u>	0	0
<u>CD73</u>	99.88 ± 3.1	99.45 ± 4.1
<u>CD90</u>	93.71 ± 0.9	99.49 ± 0.8
<u>CD166</u>	98.11 ± 0.8	79.85 ± 6.8
<u>HLA-DR</u>	0	0
<u>Colônias Formadas</u>	151.67 ± 10.5	133 ± 17.62
<u>% Células na fase G1/G0</u>	87.6 ± 1.48	89.6 ± 1.18
<u>% Células na fase S/G2</u>	12.4 ± 1.48	10.4 ± 1.18
<u>Diferenciação Adipogénica</u>	58 ± 8	45 ± 6
<u>Diferenciação Osteogénica</u>	59 ± 5	64 ± 8

## **6. ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DENTÁRIAS**

A regeneração de tecido dentário, apesar de bastante promissora, é ainda origem de inúmeras dúvidas e incertezas. Estudos ao nível da engenharia tecidual *in vitro* e *in vivo* têm surgido com o objetivo de criar um protocolo que promova a correta regeneração de tecido dentário a ser usado com objetivos terapêuticos clínicos (Bohl et al., 1998; Mooney et al., 1996).

### **6.1. Isolamento das Células Estaminais Dentárias**

O isolamento de células estaminais dentárias constitui uma prática relativamente recente. Os primeiros relatos neste âmbito surgem no ano 2000 com Gronthos et al. ao isolar células estaminais da polpa dentária humana de terceiros molares (Gronthos et al., 2000).

Posteriormente, no ano de 2003, Miura et al. isolaram células estaminais originárias de dentes decíduos humanos (Miura et al., 2003).

Para manipular tecidos, torna-se preponderante isolar células com fenótipo pré-determinado e cultivá-las em meios de cultura adequados. Antes de estabelecer um protocolo para engenharia de tecidos de células estaminais de origem dentária, é crucial investigar o comportamento das células em várias condições ambientais. Estudos demonstram que o método de isolamento e as condições de cultura utilizados podem dar origem a diferentes linhas celulares (Huang et al., 2006).

### 6.1.1. Métodos de Isolamento: Método do Desdobramento e Método da Digestão Enzimática

Existem dois métodos fundamentais para o isolamento das células: o método de desdobramento (No et al., 2000; Couble et al., 2000; Nakao et al., 2004; Saito et al., 2004; Tsukamoto et al., 1992) e o método da digestão enzimática (Gronthos et al., 2000; Nakashima, 1991; Onishi et al., 1999). Diferentes métodos de isolamento e diferentes meios de cultura originam populações com diferentes características morfológicas, imunofenotípicas e de diferenciação (Bakopoulou et al., 2010).

Para a recolha das células, é possível utilizar diversos instrumentos como a Pinça de Luer, Agulha de Estirpação e Amolador de Diamante. Entre estes, o amolador de diamante apresenta-se como sendo a pior alternativa, uma vez que promove o aumento de temperatura e conseqüente stress mecânico, levando ao insucesso do isolamento (Suchánek et al., 2007).

#### *6.1.1.1. Método do Desdobramento*

Entre os dois métodos, o do desdobramento tem sido o mais estudado ao longo do tempo para avaliar vários aspetos da fisiologia e diferenciação das células dentárias (Chenetal, 2005; Hosoya et al., 1996; Nakao et al., 2004; Patel et al., 2003; Couble et al., 2000; Saito et al., 2004; Tsukamoto et al., 1992). Estes estudos demonstraram que as culturas de células estaminais dentárias isoladas pelo método do desdobramento, podem ser induzidas a se diferenciarem *in vitro* em odontoblastos, caracterizados como sendo células polarizadas com acumulação de nódulos mineralizados (Tsukamoto et al., 1992;

Couple et al., 2000). Este método permite uma migração mais uniforme das células (frequentemente fibroblastos), enquanto as restantes células se desintegram dentro dos explantes de tecido (Huang et al., 2006). Portanto, é altamente provável que as culturas sujeitas a este método de isolamento, estejam unicamente representadas por um tipo celular (Bakopoulou et al., 2010). Quando as culturas são expostas a este processo, a migração celular ocorre principalmente da periferia para o centro da placa de cultura, levando à manutenção de uma estrutura alongada e tridimensional (Bakopoulou et al., 2010). Segundo este método, a taxa de mineralização é inferior (50% a 60% em 3 semanas) comparativamente com o método da digestão enzimática (100% em 3 semanas). Isto pode ser explicado pela quantidade de células estaminais libertadas e pela menor concentração de FBS (10% no método do desdobramento e 15% no método da digestão enzimática) – que desempenha um papel essencial na proliferação e diferenciação (García-Pacheco et al., 2001; Brink, Satlling e Nicoll, 2005).

A vantagem de isolar células da polpa através do método do desdobramento é a sua conveniência, embora seja um processo mais demorado (cerca de 2 semanas) (Gronthos et al., 2002).

#### 6.1.1.2. Método da Digestão Enzimática

Apesar dos estudos relativos à digestão enzimática terem sido desenvolvidos por um grupo mais restrito de investigadores, atualmente este é o método de eleição para o isolamento de células estaminais dentárias (Gronthos et al., 2000; Batouli et al., 2003; Miura et al., 2003; Seo et al., 2004; Sonoyama et al., 2006). Este método promove a diferenciação *in vitro* em células de linhagens osteoblástica e odontoblástica e a produção de complexos dentino-pulpaes *in vivo* (Gronthos et al., 2000).

Do ponto de vista morfológico, as culturas expostas a este método exibem uma significativa heterogeneidade quanto ao tamanho e morfologia celular. Este facto pode ser explicado pela libertação de diferentes tipos de células durante a dissociação de tecidos (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002). Assim sendo, fibroblastos, células estaminais imaturas, células endoteliais e pericitos (libertados a partir do nicho perivascular) fixam-se no disco de cultura; enquanto as células sanguíneas e os detritos são descartados (Ellerstrom, Hyllner e Strehl, 2010).

A existência de diferentes populações de células constitui uma possível explicação para as evidências imunofenotípicas. Quando as culturas se encontram expostas a um método de digestão enzimática, apresentam maior expressão de STRO-1 e CD34 em comparação com as culturas expostas ao método do desdobramento, o que reflete as diferentes quantidades de células estaminais libertadas por cada um dos métodos (Bakopoulou et al., 2010). Num estudo realizado por Miura et al., cerca de 9% da população total de células presentes em cultura exposta ao método da digestão enzimática foi positiva para STRO-1 (Miura et al., 2003). A diversidade encontrada na expressão de recetores de superfície pode ser atribuída a vários fatores: número de duplicações populacionais, estado de confluência, procedimentos experimentais utilizados, variações entre doadores, características dos dentes utilizados e composição dos meios de comunicação e ambientes de incubação (Karp e Leng, 2009; Javazon, Begs e Flake, 2004). Em termos de organização celular, as culturas expostas a esta metodologia apresentam-se dispostas de uma forma mais aleatória em estruturas tridimensionais arredondadas.

Concluindo, o método da digestão enzimática, apesar de parecer dar origem a populações celulares com maior potencial de proliferação, é tecnicamente mais difícil e causa inevitáveis danos celulares (Gronthos et al., 2002).

### 6.1.2. Escolha da Matriz Ideal

Normalmente, as células estaminais dentárias previamente isoladas são cultivadas sobre uma matriz bidimensional antes de serem transferidas para uma matriz tridimensional (Lee e Mooney, 2001; Vacanti et al., 1991; Vacanti, 2003). Matrizes fabricadas a partir de materiais de origem natural (por exemplo, colagénio) ou sintéticas (por exemplo, ácido poliglicólico) são frequentemente utilizadas como um veículo de entrega que orienta o processo de formação de tecido (Alsberg et al., 2001; Drury e Mooney, 2003; Lee e Mooney, 2001).

Embora o colagénio seja uma matriz tridimensional frequentemente utilizada, vários tipos de células (principalmente fibroblastos) são conhecidos por causar a contração do colagénio (Carlson e Longaker 2004; Grinnell, 2000; Vernon e Sage, 1996). Torna-se importante revelar se a contração causada é considerável o suficiente para afetar o resultado da regeneração tecidular. Presentemente existem estudos que descrevem o papel

das células dentárias na contração do colagénio, com uma redução de até 30% (Chan et al., 2005). Dependendo da densidade da matriz, o gel de colagénio pode ser reduzido para metade do seu tamanho original num intervalo de tempo de 3 a 15 dias (George et al., 2005). Podemos então assumir que, uma matriz que contenha apenas colagénio não é a mais adequada para ser aplicada em engenharia tecidual devido à contração que lhe é inerente, sendo por isso preferível uma matriz de composição mista (George et al., 2005).

Quanto ao estado físico da matriz, embora as células estaminais dentárias proliferem mais lentamente em geles do que em placas de cultura, nos geles estas aumentam a sua proliferação ao longo do tempo, causando uma contração progressiva do gel (George et al., 2005).

### 6.1.3. Comportamento Biológico após Cultura

Após a introdução do material num meio de cultura apropriado, estudos indicam que o cariótipo mantém a sua estabilidade genética mesmo após atingir o limite de Hayflick (50 duplicações celulares), mantendo-se portanto a indiferenciação e a viabilidade celular. Quanto ao tempo de duplicação celular, este foi de 12 a 50 horas para as primeiras 40 duplicações e depois de atingir as 50 duplicações, o tempo de duplicação aumentou para 60 a 90 horas. A análise da regressão de duplicações da população provou a dependência entre o número de duplicações e a diminuição do potencial de proliferação e explicou este facto tendo por base o conhecimento de que as DPSCs se localizam preferencialmente em redor dos vasos sanguíneos (Suchánek et al., 2007).

### 6.1.4. Isolamento das SHEDs

Nos primeiros estudos relativos ao isolamento das SHEDs não foram encontrados dados na literatura para definir o grau de reabsorção dos dentes a partir do qual as células foram extraídas (Bernardi et al., 2011). Na maioria dos casos, os investigadores relatam a idade dos indivíduos cujos dentes foram recolhidos e esfoliados, verificando-se pouca informação sobre os vários graus de reabsorção dentária (Miura et al., 2003; Kerkis et al., 2006; Harumi et al., 2010). No entanto, sabe-se atualmente que o estado do tecido pulpar está altamente dependente da fase de reabsorção do dente em questão (Bernardi et al., 2011). O fenómeno da reabsorção dentária, geneticamente programado, começa a partir de um ambiente que conduz os cementoblastos à apoptose e, em sequência, promove a

osteoclastogénese (Lourenço, 1999). O curso do processo altera as características do tecido pulpar demonstrando alterações vasculares e celulares - tais como a ausência de odontoblastos e o aumento das células inflamatórias, clásticas e precursores mononucleares (Rolling, 1981; Sahara et al., 1992; Sahara et al., 1993; Sahara e Ozawa, 2004; Angelova et al., 2004; Eronat, Eronat e Aktug, 2002; Yildirim et al., 2008; Monteiro et al., 2009; Bonecker et al., 2009). A atividade metabólica no tecido pulpar aumenta com a ação de proteínas e citocinas, demonstrando um papel ativo da polpa no processo de reabsorção (Yildirim et al., 2008; Monteiro et al., 2009; Bonecker et al., 2009; Lourenço, 1999).

Como já foi referido em capítulos anteriores, as células estaminais obtidas de dentes decíduos apresentam maior proliferação do que as oriundas de dentes permanentes (Miura et al., 2003). Podemos agora acrescentar que as modificações peculiares que decorrem no tecido pulpar durante o processo de reabsorção explicam a baixa proliferação celular verificada em células isoladas de dentes sem reabsorção visível (Bernardi et al., 2011). Ou seja, quanto maior o grau de reabsorção dentária, maior a proliferação das células estaminais recolhidas (Bernardi et al., 2011).

As células estaminais encontram-se presentes na polpa dentária de dentes decíduos e mantêm-se quiescentes nos estágios iniciais de reabsorção fisiológica de raízes. Nas fases posteriores da reabsorção, células mononucleares migram para a polpa e sintetizam citocinas, levando a alterações na matriz extracelular (Bonecker et al., 2009). Até ao concluir da reabsorção dentária, verifica-se a presença de moléculas que atuam diretamente no processo de reabsorção - CSF1 e RANKL - e há um aumento significativo na presença de células inflamatórias - HLA-DR+, CD68+, CD3+, CD4+, CD8+, CD20+ (Yildirim et al., 2008). O aumento do influxo celular iria acelerar o fenómeno, causando a apoptose de células pulpares e, por outro lado, iria promover a libertação de citocinas que iriam atuar ao nível das células estaminais de ativação (Marastoni et al., 2008; Stupack e Cheresch, 2003). Estas últimas são as células responsáveis pela reabsorção de intermitência, pela diferenciação e produção de um tecido mineralizado semelhante ao cimento na raiz e dentina coronária (Rolling, 1989; Sahara e Osawa, 2004). Este tecido semelhante ao cimento é responsável pela fixação variável do dente durante a reabsorção fisiológica (Sahara et al., 1992). No final do processo, quando as raízes são

completamente reabsorvidas, o tecido que preenche o seio coronário é semelhante ao tecido de granulação, composto por células inflamatórias responsáveis pela síntese de mediadores químicos (Rolling et al., 1981; Sahara et al., 1992; Sahara et al., 1993; Sahara e Ozawa, 2004). Foi recentemente mostrado que, durante a produção do tecido de granulação (que inclui a coagulação, inflamação, angiogénese, proliferação de células do mesênquima, involução de vascularização e remodelação), as células da região perivascular, descritas como possíveis mantenedores de células estaminais da polpa, atuam como uma importante fonte de células estaminais (Díaz-Flores et al., 2009; Shi e Gronthos, 2003).

Podemos concluir a necessidade de considerar não apenas o isolamento das SHEDs, mas também investigar o nível de reabsorção dos dentes que se pretenda isolar (mesmo daqueles que não apresentam nenhuma reabsorção radicular visível) (Bernardi et al., 2011).

## **6.2. Conservação de Células Estaminais Dentárias**

A conservação de células estaminais é uma prática baseada na convicção de que a medicina personalizada é o caminho mais promissor para o tratamento de determinadas doenças, tais como: desordens degenerativas neuronais (Alzheimer, Parkinson e Esclerose Lateral Amiotrófica), doenças cardíacas crónicas (Insuficiência Cardíaca Congestiva e Doença Cardíaca Isquémica Crónica), paralisia por lesão da espinal medula e doença periodontal (Seo et al., 2008; Balwant, 2007; Irina et al., 2008; Gandia et al., 2007; Arthur et al., 2008; Jeremy e Mao, 2008; Jay, 2008). A terapia com células estaminais é relativamente recente mas a sua utilização espalhou-se rapidamente por todo o mundo e continuará a emergir nas décadas que se seguem (Arora, Arora e Munshi, 2009).

Até há pouco tempo, as células estaminais recolhidas do sangue do cordão umbilical constituíam a única opção de armazenamento de células estaminais. Infelizmente, o processo de colheita e armazenamento de células do cordão umbilical apresenta inúmeras limitações, encontrando-se por isso fora do alcance de grande parte da população. A descoberta das SHEDs constituiu um avanço nesta área, uma vez que estas constituem uma fonte disponível e acessível de células estaminais. Com base nestes factos, o conceito

de “banco de dentes” tornou-se popular e várias empresas começaram a explorar o potencial desta nova abordagem com a preservação de células estaminais de origem dentária (Arora, Arora e Munshi, 2009).

#### 6.2.1. Vantagens na Conservação de SHEDs

Entre todas as possíveis fontes de células estaminais dentárias, as SHEDs são as que apresentam mais vantagens não só no isolamento como na conservação. Algumas destas vantagens são:

- Representarem um dador garantidamente compatível, constituindo um transplante autólogo. Deste modo garantem inúmeras vantagens secundárias: ausência de reação auto-imune e rejeição tecidual, ausência da necessidade de terapia imunossupressora e redução significativa do risco de doenças transmissíveis (Mao, 2008; Reznick, 2008).
- Aproveitamento das células sem que ocorra degradação biológica (Arora, Arora e Munshi, 2009).
- Simples e indolor (Arora, Arora e Munshi, 2009).
- Custo de armazenamento inferior ao que ocorre com o armazenamento de sangue do cordão umbilical (menos de um terço) (Arora, Arora e Munshi, 2009).
- Ausência de preocupações éticas (Mao, 2008; Reznick, 2008).
- As SHEDs complementam as células do cordão umbilical em termos de diferenciação. Enquanto as células estaminais do cordão umbilical se apresentam valiosas na regeneração de células sanguíneas, as SHEDs são capazes de regenerar e reparar tipos de tecidos que as células do cordão umbilical não conseguem, como tecidos conjuntivos, dentários, neuronais e ósseos (Arthur et al., 2008; Shi et al., 2005; Cordeiro et al., 2008; Mao et al., 2006).
- Poderem ser úteis para parentes próximos do dador (Reznick, 2008).

#### **6.3. Protocolo de Recolha, Isolamento e Conservação de SHEDs**

O sucesso na recolha, isolamento e conservação das SHEDs é atingido quando a colheita é feita na etapa de desenvolvimento ideal e são armazenadas com segurança até que sejam necessárias. Escusado será dizer que isso significa muitas vezes armazenar as células durante décadas, o que aumenta significativamente o custo e a dificuldade da técnica (Arora, Arora e Munshi, 2009). Para tal, entre todas as fontes de células estaminais dentárias existentes, as SHEDs constituem a melhor alternativa. O protocolo de

isolamento e conservação destas células é apresentado a seguir (Arora, Arora e Munshi, 2009).

### 6.3.1. Passo 1: Recolha dentária

Uma vez que a melhor alternativa é a recolha de células estaminais de dentes decíduos e neste caso o dador ainda não apresenta poder de decisão, esta deve partir dos pais. Torna-se, portanto, essencial informá-los que devem armazenar os dentes numa solução salina estéril aquando da remoção da peça dentária e informar o “banco de dentes”. O dente deve apresentar polpa dentária avermelhada (o que demonstra que recebeu fluxo sanguíneo até ao momento da remoção), que é indicativa de viabilidade celular. Se a polpa estiver acinzentada, é provável que o fluxo sanguíneo para a polpa tenha sido comprometido e, por conseguinte, as células estaminais estejam em necrose e, portanto, já não sejam viáveis. Dentes que apresentem mobilidade classe III ou IV, frequentemente apresentam diminuição do suprimento sanguíneo, não sendo candidatos para a recolha de células estaminais. Por estes motivos, é preferível a extração dos dentes decíduos do que esperar que estes caiam naturalmente. Mais ainda, as células estaminais não devem ser recolhidas a partir de dentes com abscessos apicais, tumores ou quistos. Posteriormente, a dentista inspeciona visualmente o dente recém-extraído para confirmar a presença de tecido pulpar saudável e transfere-o para um frasco com uma solução salina tamponada com fosfato hipotónico, que fornece nutrientes e ajuda a prevenir a desidratação do tecido durante o transporte (é possível transportar até quatro dentes por frasco).

A viabilidade das células estaminais encontra-se dependente do tempo e da temperatura de transporte. O tempo que decorre desde a recolha até à chegada à unidade de armazenamento e processamento não deve exceder as 40 horas. O dente deve ser colocado no frasco à temperatura ambiente, de modo a induzir hipotermia que é desejável para o transporte - este procedimento é descrito como sustentação.

### 6.3.2. Passo 2: Isolamento das células estaminais

Quando o banco de células estaminais recebe o frasco, inicia-se o seguinte protocolo:

- Limpeza da superfície do dente através da lavagem repetida (três vezes) com solução salina tampão fosfato de Dulbecco sem  $\text{Ca}^{2+}$  nem  $\text{Mg}^{2+}$  (PBSA).
- Desinfecção com Iodo Povidona e nova lavagem com PBSA.

## Aplicação das Células Estaminais Dentárias na Medicina e na Medicina Dentária

- Separação do tecido pulpar da câmara pulpar com recurso a pequenos fórceps ou escavadora dentária esterilizada.
- O tecido recolhido da polpa dentária é colocado numa placa de petri estéril, que foi lavada, pelo menos, três vezes com PBSA.
- O tecido é então digerido com colagenase tipo I e dispase durante 1 hora a 37°C. Também pode ser utilizada tripsina-EDTA.
- As células isoladas são passadas através de um filtro de 70µm para obter suspensões de células únicas.
- As células são cultivadas num meio de cultura adequado a células estaminais mesenquimais que consiste num meio com 2mM de glutamina, suplementado com 15% de soro fetal bovino (FBS), 0,1 mM de ácido fosfato L-ascórbico, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> gasoso. Normalmente, as colónias isoladas são visíveis após 24 horas.
- Diferentes linhas celulares, como odontogénica, adipogénica e neural, podem ser obtidas consoante as alterações realizadas ao meio de cultura.
- Após a verificação do sucesso do processo, confirma-se a viabilidade celular aos pais do dador.

### 6.3.3. Passo 3: Armazenamento das Células Estaminais

Qualquer um dos dois métodos seguintes pode ser utilizado no armazenamento de células estaminais: Criopreservação e Congelamento Magnético.

*6.3.3.1. Criopreservação:* Processo de preservar células ou tecidos completos através da diminuição da temperatura para valores inferiores a zero (Reznick, 2008). Quando expostas a estas temperaturas, a atividade biológica celular é comprometida e há a promoção da morte celular (Oh et al., 2005; Politis et al., 1995). As SHEDs podem ser armazenadas por criopreservação a longo prazo e permanecem viáveis (Suchánek et al., 2007; Zhang et al., 2006; Papaccio et al., 2006). A amostra é dividida em quatro criotubos e cada um é armazenado num local separado no sistema de criopreservação de modo a que, mesmo que ocorra um problema com uma das unidades de armazenamento, haverá outra amostra disponível para uso. As células são preservadas em azoto líquido a uma temperatura inferior a -150°C. Isso preserva as células, mantendo a sua potência e

latência. O ideal é verificar-se a presença de  $1-2 \times 10^6$  células em 1,5 mL de meio de congelação. Quando o número é superior ou inferior, a taxa de proliferação diminui.

*6.3.3.2. Congelamento Magnético:* Esta tecnologia recorre à utilização de um campo magnético fraco que reduz 6-7 °C o ponto de solidificação do corpo. O objetivo desta técnica é baixar a temperatura para promover a diminuição da atividade celular sem se verificar os danos habituais dos métodos de congelação: alteração da parede celular (causada pela expansão de gelo) e drenagem de nutrientes (devido à ação capilar). Logo que o objeto esteja uniformemente refrigerado, o campo magnético é desligado. A manutenção deste sistema é muito mais barata e confiável do que o sistema de criopreservação.

#### 6.3.4. Aspetos Comerciais dos “Bancos de Dentes”

Até à data, o conceito de “banco de dentes” não é muito popular, mas a tendência é de reverter este atraso (principalmente nos países desenvolvidos).

A empresa *BioEden*, originária dos EUA, conta com laboratórios internacionais no Reino Unido (que serve a Europa), na Tailândia (que serve o Sudeste Asiático) e apresenta planos de expansão para a Rússia, Austrália, Índia e Médio Oriente. Também as empresas *StemSave* e *Store-A-Tooth* constituem “bancos de dentes” originários dos EUA com o objetivo de expansão para outros países. No Japão, o primeiro “banco de dentes” foi criado em 2005 na Universidade de Hiroshima e a empresa foi intitulada *Three Brackets*. A Universidade de Medicina de Taipé juntou-se posteriormente à Universidade de Hiroshima com o objetivo de armazenar dentes para implantes naturais. Ainda no Japão, a Universidade de Nagoya também criou um “banco de dentes”. Um “banco de dentes” originário da Noruega está atualmente a recolher dentes decíduos de 100.000 crianças na Noruega. Este instituto é um sub-projeto do *Norwegian Mother and Child Cohort Study* desenvolvido pelo Instituto Norueguês de Saúde Pública em colaboração com a Universidade de Bergen (Tvinnereim e Tann, 2008).

## **7. APLICAÇÕES DENTÁRIAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS**

A perda dentária é uma doença comum que ocorre frequentemente nas populações envelhecidas, afetando negativamente a eficiência mastigatória, linguagem, estética e autoestima. Nos países desenvolvidos, estima-se que 7% das pessoas com 17 anos de idade perderam um ou mais dentes, sendo que aos 50 anos, uma média de 12 dentes foram perdidos (Sharpe e Young, 2005). Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde, a cárie dentária ainda é prevalente na maioria dos países em todo o mundo (apresentando 100% de incidência em algumas populações), as doenças periodontais graves afetam 5-20% das populações adultas e a incidência de edentulismo total tem sido estimada entre 7% e 69% internacionalmente (Peterson et al., 2005; Felton, 2009). As abordagens terapêuticas atuais centram-se principalmente nos materiais artificiais ou implantes não-biológicos que podem reduzir inevitavelmente a qualidade de vida, devido às suas funções fisiológicas limitadas e, por vezes, provocar uma rejeição imunológica (Yan et al., 2010). O desenvolvimento de uma técnica biomimética que permita a criação de dentes de substituição, constitui uma terapia altamente desejável para substituir permanentemente dentes *in situ* (Modino e Sharpe, 2005).

Para proceder ao desenvolvimento de terapias celulares baseadas na medicina regenerativa, torna-se essencial compreender: os mecanismos de auto-renovação permitem regular o crescimento de células estaminais adultas *in vitro*, gerando assim o número suficiente de células para diferentes aplicações (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007; Nakagawa et al., 2008); a regulação das células estaminais durante a diferenciação e produção de tecido específico (Kolf et al., 2007); as interações entre células estaminais e sistema imunológico (Poncelet et al., 2007); como realizar a monitorização das células estaminais transformadas e expandidas (Rubio et al., 2005).

### **7.1. Regeneração Periodontal**

O periodonto é um conjunto de tecidos especializados que rodeiam e suportam os dentes de forma a mantê-los na mandíbula. A periodontite é uma doença inflamatória que afeta o periodonto e resulta na perda irreversível da inserção de tecido conjuntivo e do osso alveolar de suporte. O uso de enxertos ósseos alogênicos acelulares na reparação de defeitos periodontais tem sido uma prática clínica comum.

O desafio para a engenharia tecidual, neste caso em particular, consiste na utilização de diferentes populações de células estaminais dentárias de forma a replicar os eventos-chave no desenvolvimento periodontal e promover uma regeneração sequencial do periodonto (Lin et al, 2008).

Existem quatro fatores que devem ser respeitados para promover uma regeneração periodontal de sucesso. É essencial que se verifique um selamento epitelial de forma a evitar a migração de células epiteliais para os defeitos periodontais, novo cemento acelular deve ser regenerado na superfície da raiz, a altura do osso alveolar deve ser restabelecida e novas fibras de Sharpey devem ser inseridas no cimento recém-formado (Honda et al., 2010).

Apesar de a investigação nesta área abranger frequentemente a utilização de células estaminais não dentárias, atendendo ao seu potencial de diferenciação, as PDLSCs constituem o candidato ideal para a engenharia tecidual periodontal (Liu et al., 2008). Estudos indicam que estas células, quando expandidas *in vivo* e transplantadas em ratos (utilizando fosfato de hidroxiapatite e fosfato tricálcico) são capazes de regenerar fibras do ligamento periodontal e uma camada semelhante a cimento acelular (Seo et al., 2004, Hasegawa et al., 2005). A dúvida relacionada com esta técnica prende-se com a manutenção da integridade e função do periodonto regenerado (Valponi, Pang e Sharpe, 2010).

## **7.2. Regeneração Pulpar**

A regeneração da polpa dentária iria alterar a prática atual de substituir polpa infetada por materiais inorgânicos (desvitalização).

Face às características das diferentes fontes celulares previamente apresentadas, se o objetivo for regenerar a polpa dentária as melhores fontes celulares dentárias são as SHEDs e as DPSCs (Jamal et al., 2011). O protocolo apresentado por Huang et al. para este efeito consiste em isolar DPSCs e SCAPs a partir de terceiros molares humanos, envolver estas células numa matriz de copolímero poli (D,L-lactídeo-co-glicolídeo) e inserir esta mistura no espaço canalar previamente esvaziado (Huang et al., 2010). Um estudo realizado em ratos para avaliar o presente protocolo permitiu pela análise

histológica constatar que, após 3-4 meses, o canal radicular tinha sido completamente preenchido por tecido pulpar de vascularização bem estabelecida e uma camada contínua de tecido semelhante a dentina mineralizada tinha-se depositado sobre as paredes dentinárias existentes no canal (Huang et al., 2010).

### **7.3. Apicogênese e Apicificação**

O encerramento do ápice radicular de um dente permanente ocorre até 3 anos após a erupção dentária. A presença de danos pulpares irreversíveis de um dente permanente imaturo representa um desafio clínico e é neste contexto que surgem os conceitos de Apicogênese e Apicificação (Friendlander, Cullinan e Love, 2009).

Apicogênese é uma terapia de complementação radicular realizada em dentes com vitalidade pulpar e consiste na remoção da polpa coronal infetada, manutenção da polpa radicular vital e proteção com material biocompatível. O hidróxido de cálcio e o MTA (agregado trióxido mineral) têm sido os materiais de escolha, mas nenhum material é ideal pois nenhum consegue estimular a regeneração do tecido pulpar (Shabahang e Torabinejad 2000; Witherspoon et al. 2008). A apicificação é uma terapia de indução do fechamento do forame apical indicada para dentes com necrose pulpar e consiste na deposição de uma barreira de tecido duro a nível apical. Esta segunda técnica apresenta-se mais desejável e recorre idealmente à utilização de células estaminais (Friendlander, Cullinan e Love, 2009).

Para a realização de apicificação com células estaminais, estas têm que ser cultivados e expandidas *in vitro* ou *in vivo* para serem aplicadas posteriormente. Se a expansão ocorrer *in vitro*, as células são implantadas e devem seguidamente aderir às paredes do canal radicular (previamente desinfetado). O tecido implantado carece de um suprimento vascular fundamental e estudos relatam que é tecnicamente difícil de replantar o tecido pulpar regenerado sem danificar as células. A alternativa *in vivo* supera alguns problemas associados com o reimplante e uma das possíveis técnicas consiste em semear SHEDs e células endoteliais em matrizes biodegradáveis e colocar o substrato em dentes humanos implantados em ratos imunocomprometidos (Cordeiro et al. 2008).

#### **7.4. Regeneração do Elemento Dentário**

No que refere à atual prática clínica, esta indica os implantes dentários como sendo a técnica para substituição dentária mais avançada. É conhecido que esta alternativa apresenta inúmeras desvantagens, como requerer uma quantidade mínima de osso existente e a ausência de ligamento periodontal que amortecia as forças mastigatórias. É neste contexto que surge o conceito de bio-dente. Consiste num dente biológico que pode ser reintegrado no maxilar e executar as funções normais de um dente natural (incluindo a capacidade regenerativa em caso de dano). Muitos estudos têm demonstrado que o bio-dente pode ser reconstruído por células dentárias envolvidas ou não por matrizes, por células dentárias pré/pós-natal e até mesmo por células de origem não dentária (Yan et al., 2010).

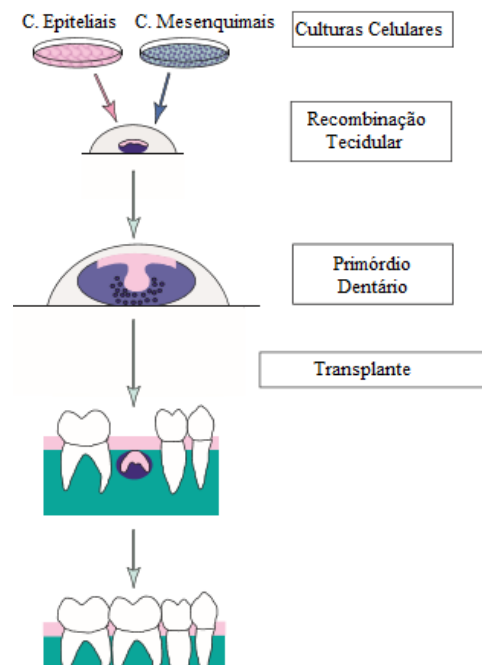
O requisito mínimo para uma adequada substituição biológica é a formação dos componentes mínimos necessários para constituição de um dente funcional (que inclui raízes, ligamento periodontal, suprimento nervoso e sanguíneo) (Volponi, Pang e Sharpe, 2010). Se o objetivo for regenerar raiz dentária é preferível usar as SCAPs e as PDLSCs combinadas (Sonoyama et al., 2006). A substituição coronal constitui a menor fonte de problemas pois, embora seja essencial, as coroas dentárias sintéticas apresentam-se esteticamente e funcionalmente compatíveis (Volponi, Pang e Sharpe, 2010).

Os principais desafios consistem em: identificar fontes celulares não-embrionárias que apresentem as mesmas propriedades que as células germinativas dentárias e desenvolver sistemas de cultura que permitam a expansão e manutenção do potencial destas células. Tudo isto torna-se muito mais desafiador quando o desenvolvimento dentário requer dois tipos de células, as epiteliais e mesenquimais (Jernvall e Thesleff, 2000; Tucker e Sharpe, 2004; Zhang et al., 2005). Respeitando estes critérios torna-se possível obter uma estrutura tridimensional funcional e diferenciada, capaz de evitar a rejeição do transplante (Amanda, Yen e Sharpe, 2008).

Como os dentes são formados pela cooperação de dois tecidos diferentes, a reconstrução dentária requer logicamente a associação entre estes (Bluteau et al., 2008). O potencial odontogénico que reside no epitélio dentário, quando combinado com células mesenquimais é responsável pela morfogénese e citodiferenciação - induzindo a

formação do dente (Thesleff e Sharpe, 1997; Thesleff et al., 2001; Hu et al., 2005; Lesot e Brook, 2009). Isto só é possível devido à plasticidade caracteristicamente presente em alguns tecidos adultos. Os mecanismos moleculares subjacentes à interação entre epitélio e mesênquima envolvem proteínas difusíveis, tais como: proteínas morfogenéticas do osso, fatores de crescimento de fibroblastos, fator de necrose tumoral e Wnts (Amanda, Yen e Sharpe, 2008).

Após a indução epitelial do mesênquima, este torna-se um tecido indutivo e retribui a indução ao epitélio não indutivo. A regeneração dentária pode então ocorrer através da utilização de células epiteliais ou mesenquimais que induzam a formação dos dentes no outro tipo de células (Volponi, Pang e Sharpe, 2010). Essa interação celular leva à formação de um primórdio dentário que é cirurgicamente transplantado. O dente formado deve apresentar determinadas características: odontoblastos funcionais, ameloblastos, polpa, formação cuspídea e ainda raízes e ligamento periodontal (**Figura 6**) (Hu et al. 2006).



**Figura 6: Esquema representativo da regeneração do elemento dentário [Adaptado de Volponi, Pang e Sharpe, 2010].**

Embora métodos de culturas de células *in vitro* estejam a ser progressivamente desenvolvidos e melhorados, a tarefa de encontrar populações de células estaminais para substituir epitélio dentário embrionário e mesênquima dentário continua. DPSCs têm sido utilizados para regeneração de estruturas dentárias parciais, no entanto, devido à sua limitação de expansão *in vitro*, não foi ainda possível promover a regeneração de um dente morfológicamente e funcionalmente competente (Gronthos et al., 2000).

A regeneração completa do elemento dentário enfrenta ainda muitos obstáculos: estabelecimento anormal do tamanho do dente, falhas na formação radicular e ausência de oclusão funcional (Huang, Gronthos e Shi, 2009). Na tentativa de ultrapassar estas falhas, Sonoyama et al. demonstraram que o ideal seria formar uma bio-raiz e completar

o dente utilizando uma coroa dentária (Sonoyama et al., 2006). Ainda assim, a literatura relata que frequentemente há uma alteração na dentina da bio-raiz, o que leva a uma diminuição da resistência mecânica em aproximadamente dois terços (Huang, Gronthos e Shi, 2009).

## **8. APLICAÇÕES MÉDICAS DAS CÉLULAS ESTAMINAIS**

### **8.1. Patologias hematológicas**

O transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas constitui uma terapia eficaz para várias patologias hematológicas, no entanto encontra-se frequentemente associado a infeções, hemorragias, falência do enxerto e doença enxerto *versus* hospedeiro (Armitage, 1994; Tabbara et al., 2002). Torna-se essencial encontrar meios eficazes de eliminar ou pelo menos minimizar estes efeitos secundários graves decorrentes de transplante (Ferrara e Yanik, 2005; Ferrara e Reddy, 2006).

Devido às suas propriedades imunossupressoras (que atrasam a rejeição do enxerto) e à produção de citocinas (que apoiam a hematopoiese), vários autores apresentam as células estaminais mesenquimais como sendo úteis para o transplante de enxertos (Lazarus et al., 1995), principalmente se em co-infusão com células estaminais hematopoiéticas (Fouillard et al., 2003).

### **8.2. Doenças Cardiovasculares**

A perda de cardiomiócitos após o enfarte do miocárdio induz uma disfunção contrátil do coração. Estes são substituídos por fibroblastos para formar tecido cicatricial. Frequentemente a isquemia crónica instaura-se podendo causar insuficiência cardíaca e mesmo morte (Ambrose, 2006).

O transplante de cardiomiócitos fetais ou mioblastos esqueléticos foi proposto como alternativa terapêutica, no entanto a ideia permanece inviável devido à dificuldade na obtenção destas células e à falha na recuperação fisiológica (Giordano, Galderisi e Marino, 2006). Vários autores demonstraram que a injeção intracoronária de células estaminais pode representar uma abordagem simples e eficaz para o tratamento de doenças cardíacas devido às capacidades de miogénese e angiogénese destas células, que

promovem a regeneração do miocárdio após cardiomiopatia isquémica (Giordano, Galderisi e Marino, 2006). Estudos demonstram que as DPSCs induzem reparação cardíaca devido à secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas (tais como fator de crescimento endotelial vascular, fator de crescimento insulínico 1 e 2), que potenciam a angiogénese e a regeneração cardíaca na zona do enfarte (Gandia et al., 2008). O transplante de DPSCs não só previne a remodelação ventricular mas também promove a contratilidade regional. A melhoria da função cardíaca está relacionada com a redução do tamanho do enfarte, maior densidade capilar e aumento da espessura da parede do miocárdio (Gandia et al., 2007).

Estudos de diferenciação cardiomiogénica em casos de enfarte agudo do miocárdio, doença coronária grave e miocardiopatia isquémica crónica, apresentam resultados indicativos de eficácia moderada (Ferrari et al., 2007).

### **8.3. Doenças Vasculares**

A estenose arterial é um fenómeno fisiopatológico caracterizado por oclusão variável do lúmen arterial, que surge frequentemente após realização de angioplastia, arteriotomia ou *bypass*. Constitui uma lesão vascular em que se verifica a perda de células das túnica íntima e média, a fragmentação da lâmina elástica e danos na arquitetura tecidual, levando à reparação patológica excessiva e resultando em hiperplasia neointimal (Forte et al., 2001; Xu et al., 2004).

A solução terapêutica passa por um procedimento de revascularização, sendo que as células estaminais contribuem para a remodelação vascular após lesão (Tanaka et al., 2003). Surgiu então a hipótese de que o processo de estenose poderia ser evitado através da mediação de células estaminais na reparação precoce da lesão (Giordano, Galderisi e Marino, 2006).

### **8.4. Osteogénese Imperfeita**

A Osteogénese Imperfeita é uma doença genética caracterizada pela produção deficiente de colagénio tipo I (principal proteína presente no osso). Provoca fraturas dolorosas múltiplas, atraso no crescimento ósseo e deformação óssea progressiva.

A utilização de bifosfonatos apresenta-se parcialmente eficaz, não se considerando atualmente a existência de tratamento curativo. Uma abordagem diferente apoiada por inúmeros estudos é a realização de terapia celular com células estaminais (Giordano, Galderisi e Marino, 2006).

### **8.5. Recuperação após Dano da Medula Espinal**

Quando ocorre dano sobre a medula espinal verifica-se uma perturbação da homeostase tecidual levando à ocorrência de lesão secundária. Cascatas destrutivas causam a morte necrótica e apoptótica dos neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, levando a danos axonais e desmielinização (Schwab et al., 2006; Rowland et al., 2008). Posteriormente, os astrócitos e oligodendrócitos reativos que se localizam perto do local da lesão medular produzem proteoglicanos de sulfato de condroitina e mielina. Estes múltiplos sinais patogénicos aceleram a deterioração progressiva da medula espinal.

As estratégias terapêuticas envolvidas na recuperação funcional da medula espinal devem exercer efeitos reparadores multifacetados contra uma variedade de patogénese (Schwab et al., 2006). Estudos pré-clínicos propõem o transplante de células estaminais dentárias como terapia de neuro-regeneração, baseando-se na origem das mesmas na crista neural. A proposta é que estas inibem a apoptose de neurónios, astrócitos e oligodendrócitos, preservam as fibras neurais e bainhas de mielina, regeneram o axónio através da inibição das cadeias patogénicas e substituem os oligodendrócitos perdidos ou danificados maduros (Sharp e Keirstead, 2007).

### **8.6. Doenças Neurológicas**

As células que migram da crista neural participam na formação da papila dentária, polpa dentária, ligamento periodontal e outros tecidos dentários. Com base na sua morfologia celular e expressão de marcadores neuronais, estudos afirmam a possibilidade que estas células têm de se diferenciar em neurónios funcionais. Estas descobertas apresentam os tecidos dentários como uma alternativa promissora e menos invasiva para a terapia de regeneração neuronal (Arthur et al., 2008).

### 8.6.1. Esclerose Lateral Amiotrófica

A Esclerose Lateral Amiotrófica é uma patologia que provoca perda seletiva de neurónios motores, levando a um declínio progressivo e mau prognóstico da funcionalidade muscular.

As terapias atuais apenas aliviam os sintomas, não havendo cura para esta patologia (Mazzini et al., 2003). As células mesenquimais, devido à capacidade de diferenciação em neurónios e astrócitos, constituem uma possibilidade de opção terapêutica. Foram realizados estudos neste âmbito, embora não tenham permitido tirar qualquer conclusão sobre a eficácia desta opção terapêutica (Giordano, Galderisi e Marino, 2006).

### 8.6.2. Síndrome de Hurler e Leucodistrofia Metacromática

O Síndrome de Hurler constitui uma forma grave de mucopolissacaridose e é uma doença hereditária autossómica recessiva. Os sintomas podem levar à morte durante a infância e incluem hepatoesplenomegalia progressiva, insuficiência cardíaca, doenças musculares, hidrocefalia e atraso mental (Peters et al., 1998).

A Leucodistrofia Metacromática é uma doença autossómica recessiva. Verifica-se a deficiência de arilsulfatase A, que causa a desmielinização dos sistemas centrais e periféricos e conseqüentemente tetraplegia, espasticidade, atraso mental e ausência total ou parcial das atividades voluntárias (Koc et al., 2002; Gieselmann, 2003).

Os transplantes de células da medula óssea aparentam melhorar a qualidade de vida de pacientes com desordens lisossomais (Field et al., 1994; Krivit et al., 1999) devido à infiltração de macrófagos e transferência de enzimas por endocitose (Koc et al., 2002).

## **8.7. Efeito Neuroprotetor nas Doenças de Alzheimer e Parkinson**

Alzheimer e Parkinson são as duas doenças neurodegenerativas mais comuns e o seu tratamento atualmente é apenas sintomático.

As células estaminais dentárias partilham características neuronais, incluindo a produção de fatores neurotróficos como o fator de crescimento do nervo, fator neurotrófico derivado do cérebro e fator neurotrófico derivado das células gliais. Estes fatores

apresentam efeito neuroprotetor, pelo que a evidência atual sugere que as células estaminais dentárias possam apresentar implicações promissoras para o desenvolvimento de modelos de terapia à base de células em doenças neurodegenerativas.

#### **8.8. Recuperação pós-quimioterapia**

A quimioterapia é uma terapia mieloablativa, cuja eficácia de recuperação é positivamente influenciada pela aplicação de células mesenquimais, na medida em que a infusão destas células promove o aumento da concentração sanguínea de neutrófilos e plaquetas (Koc et al., 2000). No entanto, a baixa presença de células estaminais CD34+ no microambiente ósseo, aumenta o risco de fracasso na colocação do enxerto celular. Estudos propuseram que a infusão de células mesenquimais autólogas com células sanguíneas periféricas do progenitor poderia melhorar o microambiente da medula óssea e, conseqüentemente, a taxa e a qualidade de recuperação hematopoética após a terapia mieloablativa (Koc et al., 2000).

### III. CONCLUSÃO

Nos últimos anos temos assistido a um crescente entusiasmo por parte da comunidade biomédica no que diz respeito à terapia recorrente a células estaminais. Esta baseia-se na teoria de que, quando células estaminais saudáveis são injetadas em pacientes, estas dirigem-se automaticamente para os tecidos danificados, estimulando a regeneração dos mesmos (Giordano, Galderisi e Marino, 2007).

Com base no descrito nos capítulos anteriores, é possível concluir que as células estaminais de origem dentária constituem uma alternativa viável para a regeneração tecidual. Até à data, cinco populações de células estaminais dentárias foram isoladas e caracterizadas: as originárias da polpa dentária (DPSCs), da esfoliação de dentes decíduos (SHEDs), da papila apical (SCAPs), do ligamento periodontal (PDLSCs) e do folículo dentário (DFPCs). A Terapia Celular pode beneficiar com esta nova fonte de células, visto estas serem autorrenováveis, multipotentes, com obtenção relativamente simples e poderem originar diferentes linhagens celulares (Rodríguez-Lozano et al., 2011; Machado, Fernandes e Gomes, 2011).

É atualmente conclusivo que, entre os cinco tipos de células existentes, as SHEDs constituem a melhor fonte de colheita celular (Arora, Arora e Munshi, 2009). Estes dados são suportados pela evidência de que estas células são mais imaturas do que as restantes, o que lhes confere maior proliferação e diferenciação celulares. Para além disso, a obtenção de dentes decíduos esfoliados não envolve aspetos éticos e legais, o que faz com que estes sejam uma fonte celular ideal para aplicação da Engenharia Tecidual (Hau et al., 2006).

Avanços relativos à biologia de células estaminais adultas surgem como um impulso para traduzir esses achados em aplicações clínicas. Os avanços no isolamento e compreensão das células estaminais dentárias em estreita associação com os avanços da ciência dos biomateriais levaram a que estas fossem consideradas uma “ferramenta poderosa” que detém um potencial significativo no avanço da Medicina Dentária Regenerativa (capacidade das células dentárias em substituir outras células dentárias) e, posteriormente, da medicina em geral (capacidade das células dentárias se diferenciarem em células não-

dentárias). Em termos de aplicação em Medicina Dentária, é hoje perceptível a capacidade de diferenciação destas células nos diversos componentes dentários, o que permite a regeneração individual ou generalizada do elemento dentário. Relativamente à aplicação na medicina em geral, estas células tendem a ser aplicadas no tratamento de condições neurodegenerativas, o que se tem tornado essencial com o aumento da incidência destas doenças (que se deve em grande parte ao envelhecimento da população) (Reznick, 2008).

A intervenção mínima relativa necessária para obter as células, a ausência de rejeição autoimune e a eficiência da reparação (segundo uma análise custo-benefício), constituem as principais vantagens para apoiar tais terapias num futuro próximo (Jamal et al., 2011). Embora sejam inúmeras as vantagens, alguns aspetos negativos devem ser considerados. Deve ser avaliada a probabilidade de desenvolvimento de um processo cancerígeno. A indução da imunossupressão por inibição da proliferação de células T é só por si devastadora e pode conduzir ao crescimento de um possível tumor. A identificação de marcadores celulares precisa de ser desenvolvida para que possa ser feito um rastreio *in vivo* das células transplantadas. O custo associado à utilização terapêutica destas células é ainda bastante acentuado, no entanto a história tem mostrado que a maioria das tecnologias revolucionárias passaram a ser mais acessíveis à medida que se tornaram mais populares (Ferrari et al., 2007).

É difícil prever atualmente o impacto que a Engenharia Tecidual com recurso a células estaminais dentárias terá no futuro. No entanto, independentemente dessa dúvida, é possível concluir o grande potencial destas células e o desejo de o aproveitar da forma mais eficaz e mais abrangente possível.

Ensaio clínico previamente realizados sugerem que informação adicional sobre as células estaminais dentárias e a sua aplicação médica é essencial para compreender a real eficácia terapêutica, sobrevivência celular, integração, funcionalidade e segurança a longo prazo.

Os capítulos anteriores tiveram o objetivo de nos aproximar do sonho que ainda é a aplicação destas células valiosas, no entanto mantem-se a ânsia de responder com a realidade e a esperança de que estas sejam de fato a “fonte de vida” que tanto se procura.

## BIBLIOGRAFIA

Amanda, H., Yen, H., Sharpe, P. (2007). Stem Cells and Tooth Tissue Engineering. *Cell and Tissue Research*, volume 331, pp. 359-372.

Apel, C. *et alii.* (2009). The Neuroprotective Effect of Dental Pulp Cells in Models of Alzheimer's and Parkinson's Disease. *Journal of Neural Transmission*, volume 116, pp. 71-78.

Arora, V., Arora, P. e Munshi, A. (2009). Banking Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED): Saving for the Future. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, volume 33, Nº4, pp. 289-294.

Arthur, A. *et alii.* (2008). Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate Toward Functionally Active Neurons Under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells*, volume 26, pp. 1787-1795.

Bakopoulou, A. *et alii.* (2011). Assessment of the Impact of Two Different Isolation Methods on the Osteo/Odontogenic Differentiation Potential of Human Dental Stem Cells Derived from Deciduous Teeth. *Calcified Tissue International*, volume 88, pp. 130-141.

Bernardi, L. *et alii.* (2011). The Isolation of Stem Cells From Human Deciduous Teeth Pulp Is Related to the Physiological Process of Resorption. *Stem Cell Isolation from Deciduous Teeth Pulp Relates to Resorption*, volume 37, Nº7, pp. 973-979.

Bluteau, G. *et alii.* (2008). Stem Cells For Tooth Engineering. *European Cells and Materials*, volume 19, pp. 1-9.

Chotkowski, G. (2008). Stem Cells: Emerging Medical and Dental Therapies and the Dental Professional. [Em linha]. Disponível em < <http://www.friendsofhu-friedy.com>>. [Consultado em 20/12/2014].

d'Aquino, R. *et alii.* (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tooth For Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, volume 4, pp. 21-26.

d'Aquino, R. *et alii.* (2008). Human Dental Pulp Stem Cells: From Biology to Clinical Applications. *Journal of Experimental Zoology (Part B Molecular and Developmental Evolution)*, volume 312(B), Nº5, pp. 408-415.

d'Aquino, R. *et alii.* (2009). Human Mandible Bone Defect Repair By The Grafting Of Dental Pulp Stem/Progenitor Cells And Collagen Sponge Biocomplexes. *European Cells and Materials*, volume 18, pp. 75-83.

Dualibi, M. *et alii.* (2004). Bioengineered Teeth From Cultured Rat Tooth Bud Cells. *Biomaterials & Bioengineering*, volume 83, Nº7, pp. 523-528.

Ferrari, M. *et alii.* (2007). Adult Stem Cells: Perspectives for Therapeutic Applications. *Veterinary Research Communications*, volume 31, Nº1, pp. 1-8.

Friedlander, L., Cullinan, M. e Love, R. (2009). Dental Stem Cells and Their Potential Role in Apexogenesis and Apexification. *International Endodontic Journal*, volume 42, pp. 955-962.

Gandia, C. *et alii.* (2008). Human Dental Pulp Stem Cells Improve Left Ventricular Function Induce Angiogenesis, and Reduce Infarct Size in Rats With Acute Myocardial Infarction. *Stem Cells*, volume 26, pp. 638-645.

George, T. *et alii.* (2006). In Vitro Characterization of Human Dental Pulp Cells: Various Isolation Methods and Culturing Environments. *Cell and Tissue Research*, volume 324, pp. 225-236.

Giordano, A., Galderisi, U. e Marino, I. (2006). From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology*, volume 211, Nº 1, pp. 27-35.

Giordano, G. *et alii.* (2011). Stem Cells from Oral Niches: A Review. *Annali di Stomatologia*, volume 2, Nº1-2, pp. 3-8.

Govindasamy, V. *et alii.* (2010). Inherent Differentiation Propensity of Dental Pulp Stem Cells Derived From Human Deciduous and Permanent Teeth. *Journal of Endodontics*, volume 36, Nº9, pp. 1504-1515.

Gronthos, S. *et alii.* (2000). Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) In Vitro and In Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, volume 87, Nº25, pp. 13625-13630.

Gronthos, S. *et alii.* (2003). Molecular and Cellular Characterisation of Highly Purified Stromal Stem Cells Derived From Human Bone Marrow. *Journal of Cell Science*, volume 116, Nº 9, pp. 1827-1835.

Guo, W. *et alii.* (2011). Dental Follicle Cells and Treated Dentin Matrix Scaffold for Tissue Engineering the Tooth Root. *Biomaterials*, volume 33, pp. 1291-1302.

Hau, G. *et alii.* Revisão Preliminar Sobre a Viabilidade de Utilização de Células-Tronco Provenientes de Dentes Humanos Decíduos e Permanentes na Regeneração Tecidual. *Revista Publicatio UEPG, Ciências Biológicas e da Saúde*, volume 12, Nº1, pp. 45-55.

Honda, M. *et alii.* (2010). Dental Follicle Stem Cells and Tissue Engineering. *Journal of Oral Science*, volume 52, Nº4, pp. 541-552.

Huang, A. *et alii.* (2008). Putative Dental Pulp-Derived Stem/Stromal Cells Promote Proliferation and Differentiation of Endogenous Neural Cells in the Hippocampus of Mice. *Stem Cells*, volume 26, pp. 2654-2663.

Huang, G., Gronthos, S. e Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived From Dental Tissues vs. Those From Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, volume 88, Nº9, pp. 792-806.

Iohara, K. *et alii.* (2008). A Novel Stem Cell Source for Vasculogenesis in Ischemia: Subfraction of Side Population Cells from Dental Pulp. *Stem Cells*, volume 26, pp. 2408-2418.

Jinhua, Y. *et alii.* (2007). Odontogenic Capability: Bone Marrow Stromal Stem Cells versus Dental Pulp Stem Cells. *Biology of the Cell*, volume 99, N°8, pp. 465-474.

Kadar, K. *et alii.* (2009). Differentiation Potential of Stem Cells from Human Dental Origin – Promise for Tissue Engineering. *Journal of Physiology and Pharmacology*, volume 60, N°7 pp. 167-175.

Karaos, E. *et alii.* (2009). Isolation and In Vitro Characterisation of Dental Pulp Stem Cells from Natal Teeth. *Histochemistry and Cell Biology*. DOI: 10.1007/S00418-009-0646-5.

Király, M. *et alii.* (2009). Simultaneous PKC and Camp Activation Induces Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells into Functionally Active Neurons. *Neurochemistry International*, volume 55, pp. 323-332.

Koyama, N. *et alii.* (2009). Evaluation of Pluripotency in Human Dental Pulp Cells. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, volume 67, pp. 501-506.

Krebsbach, P. e Robey, P. (2002). Dental and Skeletal Stem Cells: Potential Cellular Therapeutics for Craniofacial Regeneration. *Journal of Dental Education*, volume 66, N°6, pp. 766-773.

Laberge, T. e Cheung, H. (2011). Multipotent Dental Stem Cells: An Alternative Adult Derived Stem Cell Source for Regenerative Medicine. *Embryonic Stem Cells – Differentiation and Pluripotent Alternatives*, volume 23, pp. 452-472.

Machado, E., Fernandes, M. e Gomes, P. (2011). Dental Stem Cells for Craniofacial Tissue Engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. DOI:10.1016/j.tripleo.2011.05.039.

Miura, M. et alii. (2003). SHED: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, volume 100, Nº 10, pp. 5807-5812.

Modino, S. e Sharpe, P. (2005). Tissue Engineering of Teeth using Adult Stem Cells. *Archives of Oral Biology*, volume 50, pp. 255-258.

Mohamed, J. et alii. (2011). Dental Stem Cells and their potential role in Regenerative Medicine. *Journal of Medical Sciences*, volume 4, Nº2, pp. 53-61.

Morszeck, C. et alii. (2004). Isolation of Precursor Cells (PCs) from Human Dental Follicle of Wisdom Teeth. *Matrix Biology*, volume 24, pp. 155-165.

Morszeck, C. et alii. (2008). Somatic Stem Cells for Regenerative Dentistry. *Clinical Oral Investigations*, volume 12, pp. 113-118.

Nakahara, T. (2011). Potential Feasibility of Dental Stem Cells for Regenerative Therapies: Stem Cell Transplantation and Whole-Tooth Engineering. *Odontology*, volume 99, pp. 105-111.

Nakamura, S. et alii. (2009). Stem Cell Proliferation Pathways Comparison Between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, volume 35, Nº11, pp. 1536-1542.

Naujoks, C. et alii. (2008). Principles of Cartilage Tissue Engineering in TMJ Reconstruction. *Head & Face Medicine*, volume 4, Nº3.

Nishino, Y. *et alii.* (2011). Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy*. DOI: 10.3109/14653249.2010.542462.

Papaccio, G. *et alii.* (2006). Long-Term Cryopreservation of Dental Pulp Stem Cells (SBP-DPSCs) and their Differentiated Osteoblasts: A Cell Source for Tissue Repair. *Journal of Cellular Physiology*, volume 208, pp. 319-325.

Petrovic, V. e Stefanovic, V. (2009). Dental Tissue – New Source for Stem Cells. *The Scientific World Journal*, volume 9, pp. 1167-1177.

Rodríguez-Lozano, F. e Moraleda, J. (2011). Use of Dental Stem Cells in Regenerative Dentistry: A Possible Alternative. *Translational Research*, volume 158, pp. 385-386.

Rodríguez-Lozano, F. *et alii.* (2011). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues. *International Endodontic Journal*, volume 44, pp. 800-806.

Rosa *et alii.* (2012). Tissue Engineering: from Research to Dental Clinics. *Dental Materials*. DOI: 10.1016/j.dental.2011.11.025.

Sakai, K. *et alii.* (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*, volume 122, N°1, pp. 80-90.

Seo, B. *et alii.* (2004). Investigation of Multipotent Postnatal Stem Cells from Human Periodontal Ligament. *The Lancet*, volume 364, N°9429, pp. 149-155.

Seo, B. *et alii.* (2005). Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research*, volume 84, N°10, pp. 907-912.

Shi, S. e Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, volume 18, Nº4, pp. 696-704.

Shi, S. *et alii.* (2005). The Efficacy of Mesenchymal Stem Cells to Regenerate and Repair Dental Structures. *Orthodontics & Craniofacial Research*, volume 8, pp. 191-199.

Smith, A. (2004). Tooth Tissue Engineering and Regeneration – A Translational Vision! *Journal of Dental Research*, volume 83, Nº7, pp. 517.

Sonoyama, W. *et alii.* (2008). Characterization of the Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*, volume 34, Nº2, pp. 166-171.

Spath, L. *et alii.* (2009). Explant-Derived Human Dental Pulp Stem Cells enhance Differentiation and Proliferation Potentials. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, volume 14, Nº6B, pp. 1635-1644.

Suchanek, J. *et alii.* (2007). Human Dental Pulp Stem Cells – Isolation and Long Term Cultivation. *Acta Médica Portuguesa*, volume 50, Nº3, pp. 195-201.

Suchanek, J. *et alii.* (2008). Dental Pulp Stem Cells and their characterization. *Biomedical Papers*, volume 153, Nº1, pp. 31-35.

Telles, P., Machado, M. e Sakap, V. (2010). Pulp Tissue from Primary Teeth: New Source of Stem Cells. *Journal of Applied Oral Science*, volume 19, Nº3, pp. 189-194.

Volponi, A., Pang, Y. e Sharpe, P. (2010). Stem Cell-Based Biological Tooth Repair and Regeneration. *Trends in Cell Biology*, volume 20, Nº12, pp. 715-722.

Wang, J. (2010). Stem Cells from Human-Exfoliated Deciduous Teeth can differentiate into Dopaminergic Neuron-like Cells. *Stem Cells and Development*, volume 19, N°9, pp. 1375-1383.

Wong, R. (2011). Mesenchymal Stem Cells: Angels or Demons?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011.

Woods, E. *et alii.* (2009). Optimized Cryopreservation Method for Human Dental Pulp-derived Stem Cells and their Tissues of Origin for Banking and Clinical use. *Cryobiology*, volume 59, pp. 150-157.

Yamada, Y. *et alii.* (2011). Promising Cell-Based Therapy for Bone Regeneration using Stem Cells from Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Bone Marrow. *Cell Transplantation*, volume 20, pp. 1003-1013.

Yan, X. *et alii.* (2010). iPS Cells Reprogrammed from Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells and Development*, volume 19, N°4, pp. 469-480.

Yang, M. *et alii.* (2011). A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-Tooth. *Stem Cells Reviews and Reports*, volume 7, pp. 161-171.

Zhang, W. *et alii.* (2006). The Performance of Human Dental Pulp Stem Cells on different Three-Dimensional Scaffold Materials. *Biomaterials*, volume 27, pp. 5658-5668.