

Vladyslav Milosta

Células estaminais dentárias e regeneração dentária - revisão narrativa

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2021

Vladyslav Milosta

Células estaminais dentárias e regeneração dentária - revisão narrativa

Universidade Fernando Pessoa – Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2021

Vladyslav Milosta

Células estaminais dentárias e regeneração dentária - revisão narrativa

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa, como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Assinatura: _____

Resumo

A regeneração dentária baseia-se no uso de materiais, que têm que permitir o funcionamento adequado da dentição. A eficácia e durabilidade das terapias usadas é questionável, sendo necessários métodos biológicos alternativos que possibilitem um equilíbrio entre a formação do novo tecido dentário e as funções fisiológicas do dente. Diferentes tipos de células estaminais e novos métodos biológicos, têm sido aplicados na pesquisa de regeneração dentária. As células estaminais dentárias são cada vez mais uma fonte dessas pesquisas. Face à complexidade e inovação do tema, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma revisão narrativa sobre o estado de arte na utilização de células estaminais dentárias na reparação ou regeneração total dos dentes permanentes. Mantêm-se desafios significativos como a integração sinérgica de sinais estruturais e moléculas biológicas relevantes, tamanho e forma anatômica da coroa, formação de um periodonto adequado e complicações que podem ocorrer durante ou após o transplante.

Palavras-chave: Reparação dentária, Regeneração dentária, Células estaminais dentárias, engenharia celular.

Abstract

Dental regeneration is based on the use of materials, which have to allow proper functioning of the dentition. The effectiveness and durability of the therapies used are questionable, and alternative biological methods are needed, allowing a balance between the formation of new tooth tissue and the physiological functions of the tooth. Different types of stem cells and new biological methods have been applied in tooth regeneration research. Dental stem cells are increasingly becoming a source of such research. In view of the complexity and innovation of the topic, the present work aimed to conduct a narrative review on the state of the art in the use of dental stem cells in the repair or total regeneration of permanent teeth. Significant challenges remain such as the synergistic integration of relevant structural signals and biological molecules, size and anatomical shape of the crown, formation of an adequate periodontium, and complications that may occur during or after transplantation.

Key words: Dental repair, Dental regeneration, Dental stem cells, cell engineering

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Ana Rita Castro e coorientadora Sandra Clara Soares, pela disponibilidade e apoio que me dispensaram e pelas suas sugestões que me ajudaram na realização deste trabalho.

Aos meus Professores, pelos conhecimentos que me transmitiram, conselhos e pelo modo com que sempre me trataram ao longo do curso.

À minha mãe pelo seu apoio e incentivo para que a concretização deste trabalho e de todo o curso fosse possível.

Aos meus amigos e em especial para Armin pela ajuda para que eu alcançasse este meu sonho, sem ele teria sido uma tarefa ainda mais árdua.

Aos meus colegas de curso, por toda a ajuda ao longo destes anos.

A todos vós aqui mencionados, o meu muito obrigado.

Índice

I – Introdução	1
1. Materiais e métodos	2
II – Desenvolvimento	3
1. Odontogénese	3
2. Células estaminais dentárias	4
3. Engenharia de tecidos em Medicina Dentária	5
3.1 Injeção e indução celular	5
3.2 Matriz ou “scaffold” celular.	6
4. Regeneração dentária com células estaminais dentarias	7
4.1 Ensaios clínicos com DSCs	8
4.2 Regeneração de dente inteiro	9
4.2.1 Métodos para regeneração do dente inteiro	9
III – Discussão	12
IV – Conclusão	14
V – Referências bibliográficas	15

Índice de Abreviaturas

DE - Epitélio dentário (do inglês, *dental epithelium*)

dECM - Matriz extracelular descelularizada (do inglês, *decellularized extracellular matrix*)

DM - Mesênquima dentário (do inglês, *dental mesenchyme*)

DSC – células estaminais dentárias

DPSC - Células estaminais da polpa dentária (do inglês, *dental pulp stem cells*)

dTB - botão do dente descelularizado (do inglês, *decellularized tooth buds*)

ECM - Matriz extracelular (do inglês, *extracellular matrix*)

EK - Nó de esmalte (do inglês, *enamel knot*)

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

MSC - Células estaminais mesenquimais (do inglês, *mesenchymal stem cells*)

PDL - Ligamento periodontal (do inglês, *periodontal ligament*)

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

SHED - Células estaminais de dentes decíduos esfoliados (do inglês, *stem cells from exfoliated deciduous teeth*)

I – Introdução

A medicina regenerativa é uma área interdisciplinar que estuda a capacidade de regeneração dos tecidos e órgãos funcionais com o intuito da sua utilização para substituir aqueles afetados por doenças, lesões ou envelhecimento (Mao *et al.*, 2015; Yadav *et al.*, 2016).

A capacidade regenerativa dos dentes no ser humano é muito limitada. Atualmente, as intervenções terapêuticas em medicina dentária baseiam-se no uso de materiais e implantes especialmente adaptados, que nem sempre permitem o funcionamento adequado da dentição. A eficácia e durabilidade dessas terapias são questionáveis, pelo que são necessários métodos biológicos alternativos que possibilitem um equilíbrio entre a formação do novo tecido dentário e as funções fisiológicas do dente. Para reconstruir esta estrutura natural é indispensável ter um conhecimento profundo dos eventos biológicos ligados à odontogênese (Mitsiadis *et al.*, 2015; Miran *et al.*, 2016).

Os dentes são órgãos de mastigação altamente diferenciados, formados por esmalte, dentina, cimento, polpa e tecido periodontal. Devido ao seu mecanismo de regulação especializado, origem histológica, estrutura diversa e função, estudos no campo de regeneração dentária são ainda escassos. Na última década, novas ideias para a regeneração dentária foram propostas em grande parte devido ao rápido desenvolvimento de tecnologias em engenharia celular. Diferentes tipos de células estaminais e novos métodos biológicos, têm sido aplicados na pesquisa de regeneração dentária. As células estaminais são células indiferenciadas que estão presentes na fase embrionária, fetal e adulta, com potencial de auto-replicação e diferenciação multidirecional. São vistas como células universais devido à sua capacidade de diferenciação em células funcionais, tecidos e órgãos (Catón *et al.*, 2011; Kolios *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2019).

As células estaminais dentárias podem ser facilmente obtidas de dentes pré-molares e dos sisos e são cada vez mais uma fonte de pesquisas em medicina regenerativa. Grandes quantidades de células estaminais viáveis podem ser obtidas dos tecidos dentários saudáveis, enquanto nos tecidos inflamados ou traumatizados estas células viáveis existem em quantidades muito mais baixas. Para promover a regeneração dentária é possível a utilização das próprias células estaminais dentárias sendo que estas tem que ser extraídas e colocadas em culturas celulares *in vitro*, suplementadas para promover a sua expansão, e depois novamente utilizadas *ex vivo* no paciente (Liu *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2011b; Zhai *et al.*, 2019).

1. Materiais e métodos

Esta revisão narrativa foi realizada entre Março e Julho de 2021, utilizando a base de dados PubMed. Como critérios de inclusão foram considerados artigos publicados entre 2016-2021, escritos na língua inglesa, encontrados com a expressão de pesquisa (“dental stem cells”) AND (“tooth regeneration”) OR (“dental stem cells”) AND (“tissue engineering”) AND (“tooth regeneration”).

Foram obtidos 295 resultados. Inicialmente, a seleção foi realizada com base na leitura do título e do resumo, tendo sido considerados critérios de inclusão artigos publicados nas línguas inglesa e portuguesa, tendo sido rejeitados todos aqueles que, divergiam da temática em estudo ou cuja disponibilidade estava impossibilitada. Foram obtidos 19 artigos para leitura integral. Foram ainda utilizadas referências e palavras-chave relevantes desses artigos, resultando num total de 75 artigos para discussão.

II – Desenvolvimento

1. Odontogênese

A odontogênese é caracterizada pela interação entre o epitélio, derivado da endoderme embrionária, e o mesênquima, derivado das células da crista neural craniana. O epitélio dá origem ao esmalte e o mesênquima dá origem à dentina, cimento, polpa, e aparelho periodontal (Baranova *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020).

O espessamento do epitélio oral marca o início do desenvolvimento do dente e em 48 horas este prolifera e invagina-se no mesênquima dentário (DM) subjacente. O DM condensa-se à volta do epitélio e nas 96 horas seguintes o epitélio continua a proliferar e alongar à volta do DM, formando assim o botão dentário. Posteriormente forma-se o nó de esmalte (EK), um conjunto de células que produzem moléculas de sinalização que vão controlar o desenvolvimento e morfologia da coroa do dente: direcionam a proliferação e diferenciação do epitélio dentário (DE) e do DM nas proximidades do EK, regulando assim a formação das cúspides. A seguir à formação da coroa, começa a formação da raiz juntamente com a formação dos tecidos periodontais. Após a erupção o dente é ancorado ao osso alveolar circundante por meio do ligamento periodontal (PDL). O centro de sinalização responsável pela formação da raiz do dente é a bainha epitelial de Hertwig, que se situa na alça cervical formada pelas camadas de células DEs internas e externas. As principais vias de sinalização entre DE e DM são as proteínas morfogénicas ósseas (BMP) os fatores de crescimento de fibroblastos, as proteínas hedgehog (Shh) e as proteínas Wnt. Além da sinalização celular as forças tecidulares, como contração epitelial, condensação mesenquimal ou biomecânica óssea, participam na formação da morfologia do dente durante o seu desenvolvimento (Calamari *et al.*, 2018; Ten Cate 1996; Wang *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

2. Células estaminais dentárias

As células estaminais são células indiferenciadas, com potencial para auto-regeneração e diferenciação em uma ou mais células especializadas e dividem-se quanto à sua origem em embrionárias ou adultas (somáticas) e de acordo com seu potencial de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes. Designam-se totipotentes quando possuem a capacidade para originar todas as células diferenciadas criando assim um organismo completo. Pluripotentes são descendentes das células totipotentes, formam as três camadas germinativas: endoderme, mesoderme e ectoderme. Multipotentes diferenciam-se em várias células especializadas. Oligopotentes diferenciam-se em alguns tipos de células. Unipotentes diferenciam-se em apenas um tipo de célula (Abou Neel *et al.*, 2014, Robey 2000; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011).

As células estaminais dentárias caracterizam-se como células estaminais mesenquimais (MSCs) de origem dentária, multipotentes com a capacidade autorregenerativa (Botelho *et al.*, 2017).

Existem cinco tipos de MSCs de origem dentária: células estaminais da polpa dentária (DPSCs), células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs), células estaminais da papila apical (SCAP), e células progenitoras do folículo dentário (DFPCs) (Botelho *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2009; Rodríguez-Lozano *et al.*, 2011; Yadav *et al.*, 2016).

3. Engenharia de tecidos em Medicina Dentária

A engenharia de tecidos aborda a regeneração de novos tecidos através do uso de mediadores biológicos e de uma matriz. O seu objetivo é aproveitar a capacidade do próprio organismo de regenerar o tecido fisiologicamente ativo que responde ao metabolismo, em vez de substituí-lo por enxertos e dispositivos biônicos. Durante a regeneração ocorrem os principais eventos da formação e crescimento do tecido, tais como a migração celular, proliferação, apoptose, diferenciação, interações indutivas e inibitórias e morfogénese. A abordagem a usar em cada regeneração depende do tipo de células usadas, moléculas de sinalização e da estrutura matriz, a fim de reproduzir a sequência de eventos na regeneração tecidular (Abou Neel *et al.*, 2014; Nussenbaum *et al.*, 2006).

Na regeneração dentária baseada na engenharia de tecidos uma das estratégias mais usadas é o isolamento e cultura das células estaminais dentárias numa matriz biológica – “scaffold” *in vitro* conjuntamente com fatores de crescimento dentário. Posteriormente essa matriz é implantada no paciente de forma a possibilitar a regeneração dentária total (Bencherif *et al.*, 2013).

3.1 Injeção e indução celular

A injeção celular, nomeadamente de células estaminais dentárias, é o método mais promissor para regenerar os tecidos. As propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias das MSCs derivadas da mucosa oral e gengiva colocam-nas como uma potencial fonte de células nas terapias de reparação de feridas, doenças relacionadas à inflamação e regeneração dentária. As MSCs podem regular a intensidade da resposta imune induzindo a apoptose de células T, podendo até ter um potencial efeito terapêutico (Abou Neel *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

No entanto, existem vários fatores que podem limitar a eficácia deste procedimento, nomeadamente a fraca capacidade de implantação, a área afetada, a manutenção fenotípica celular e a própria rejeição imunológica pelo organismo. Para evitar reações de rejeição e ser mais preciso na área de implantação das células e na libertação das mesmas, pode ser usado um veículo de transporte, estratégia promissora em regenerações ósseas e de cartilagem (Abou Neel *et al.*, 2014; Ravichandran *et al.*, 2012).

Caso o uso de células estaminais dentárias seja uma impossibilidade pode-se optar pela indução celular, que consiste na indução da osteogénese através da injeção de biomateriais

osteointutivos. Para maximizar o potencial dos biomateriais osteointutivos, o fenómeno de osteointução é dividido em 3 princípios. Primeiro, os materiais osteointutivos devem ser capazes de recrutar MSCs para superfícies de enxerto ósseo através da libertação de factores de crescimento. Segundo, o material deve promover a diferenciação dos MSCs em osteoblastos. Terceiro, os osteoblastos devem ser capazes de formar osso ectópico in vivo (Abou Neel *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2012).

Teoricamente o material osteocondutor ideal não necessita de nenhum componente biológico exógeno para induzir a osteogénese, mas na prática estes componentes ainda são utilizados, através da injeção das moléculas de sinalização, como por exemplo, factores de crescimento ou diferenciação, para modular o comportamento celular. Embora esta abordagem tenha sido eficaz na regeneração de alguns tecidos, o custo da purificação e o desenvolvimento de um transportador apropriado para introduzir no organismo os factores de crescimento aos locais alvo limitam o seu campo de acção (Abou Neel *et al.*, 2014; Miron *et al.*, 2012).

3.2 Matriz ou “scaffold” celular.

As células isoladas do próprio paciente ou de um dador são expandidas em cultura e “semeadas” numa estrutura natural ou sintética que define a forma do tecido e suporta as células durante seu crescimento. Essas estruturas, chamadas de matrizes, podem ser tridimensionais, e criam artificialmente um ambiente capaz de direccionar a adesão, proliferação e diferenciação celular. Idealmente, as células aderem ao suporte, proliferam, diferenciam-se e formam o tecido necessário. Posteriormente, o tecido recém-formado pode ser transplantado para o paciente (Abou Neel *et al.*, 2014; Gupte *et al.*, 2012; Marler *et al.*, 1998; Tomlinson *et al.*, 2013). Os materiais que compõe a matriz podem ser diversos, nomeadamente polímeros ou cerâmica, dependendo das propriedades necessárias de adaptação/mimetização do tecido a regenerar. A porosidade da matriz é indispensável, não só para o crescimento ósseo, como para a migração celular e libertação de factores de crescimento (Zhang *et al.*, 2013).

Para este método as MSCs de origem dentária, nomeadamente as MSCs derivadas da mucosa oral e gengiva continuam a ser as candidatas mais prováveis. No entanto, devido à sua localização anatómica específica na cavidade oral, é necessário perceber se a resposta imune de defesa do hospedeiro dessas MSCs é diferente das células estaminais derivadas da medula óssea e como se poderão comportar numa matriz específica. Permanecem desafios técnicos significativos que precisam de considerar a integração sinérgica de sinais estruturais e

moléculas biológicas relevantes, para alcançar o funcionamento adequado da estrutura dentária (Abou Neel *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

4. Regeneração dentária com células estaminais dentárias

Como referido anteriormente, as células estaminais somáticas do próprio paciente podem ser usadas para gerar os tecidos e órgãos desejados, reprogramando-as para células estaminais pluripotentes induzidas (iPS), e por sua vez, reprogramando essas células iPS para os tipos de células desejadas (Takahashi *et al.*, 2006; Thesleff *et al.*, 2018). As iPS podem ser geradas a partir das SCAP, DPCS, SHED, terceiro molar, fibroblastos da mucosa bucal, fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (Lee and Seo, 2016; Malhotra, 2016).

Na reprogramação celular, tal como em todos os tipos de manipulação, há um risco aumentado da geração de tumores e instabilidade cromossómica (Radwan *et al.*, 2020). Além disso, na maioria dos protocolos de isolamento e expansão de células estaminais são utilizados produtos xenogénicos. Os meios de cultura são compostos por células xenogénicas e soro fetal bovino, os quais tem por objectivo manter as células num estado indiferenciado, e salvaguardar a sua pluripotência (Erickson *et al.*, 1991; Lee and Seo, 2016; Polo *et al.*, 2010; Takeda-Kawaguchi *et al.*, 2014; Villa-Diaz *et al.*, 2013).

O ambiente circundante, chamado nicho de células estaminais influencia fortemente o comportamento e as propriedades das células estaminais. Este nicho é uma combinação de células, matriz extracelular e factores de crescimento, que está sob a influência de tensões mecânicas e químicas (Jones *et al.*, 2008; Miran *et al.*, 2016; Mitsiadis *et al.*, 2007; Pagella *et al.*, (2014).

O microambiente adequado para a regeneração do complexo dentina-polpa é produzido pela interação entre a matriz e as células. Segundo alguns estudos, a matriz tridimensional, mesmo de origem biológica, quando implantada não consegue guiar a regeneração funcional do complexo dentina-polpa de maneira consistente (Zhai *et al.*, 2019).

Noutros estudos, a matriz revestida com dentina e preparada com células estaminais derivadas dos folículos dentários quando implantada em ratinhos, por via subcutânea foi capaz de regenerar tecidos de dentina de forma completa. Também o tecido semelhante a polpa foi regenerado em raízes dentárias humanas, através do uso de matrizes injectáveis, misturadas com SHED (Guo *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2019).

Após a implantação de células estaminais dentárias na estrutura da matriz, pode ser formado o tecido semelhante a polpa, no entanto, as matrizes/estruturas disponíveis, atualmente, não possuem na sua totalidade as características da matriz extracelular natural, com falta de comunicação intercelular, degradação selectiva e remodelação. Em alternativa, ao uso de células que revestem a matriz tridimensional existem outras estruturas biológicas que promovem a comunicação intercelular e produzem mais matriz extracelular. O uso de esferóides DPSC de micro tecido livre, pré-vascularizados por suspensão com células endoteliais da veia umbilical humana, demonstraram uma regeneração com boa vascularização e tecido semelhante a polpa. Os esferóides ou agregados celulares simulam a condensação celular, fornecendo assim uma estimulação adequada para o desenvolvimento e regeneração dos órgãos, evitando assim as principais desvantagens do uso da matriz (Zhai *et al.*, 2019).

4.1 Ensaios clínicos com DSCs

No ensaio clínico de Xuan e colaboradores (2018) foi observada a regeneração pulpar bem-sucedida e desenvolvimento contínuo da raiz em dentes permanentes monorradiculares imaturos tratados com SHEDs autólogos. Um grupo de 26 pacientes recebeu um implante autólogo de SHED e um grupo de 10 pacientes recebeu um tratamento padrão para apexificação. Todos os pacientes que receberam agregados de SHED cultivados regeneraram a polpa dentária altamente vascularizada, apesar de a regeneração de estruturas semelhantes à dentina ter sido limitada. Não foi observada nenhuma maturação da raiz em dentes controlo tratados, embora o desenvolvimento da raiz tenha continuado em todas as amostras SHED (Xuan *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Estudos clínicos para regeneração de PDL, envolvem a regeneração do próprio PDL, cimento e osso alveolar. Na clínica é geralmente empregue a terapia de regeneração tecidual guiada para a regeneração de PDL no tratamento de periodontite e outras doenças periodontais. O número muito baixo de PDLSCs julga-se ser responsável pelo potencial regenerativo limitado do periodonto. Células estaminais STRO-1 + / CD146 + presentes no PDL são sugeridas como uma fonte de células estaminais para terapias regenerativas. Estudos sobre a origem desta linhagem celular no incisivo do rato em erupção contínua demonstraram que o tecido do PDL é derivado em parte das células progenitoras mesenquimais Igfbp5 + e Lrig1 +, enquanto outros demonstraram que as células epiteliais fragmentadas da raiz do dente também contribuem para a formação de tecido do PDL. No ensaio clínico de Chen e colaboradores (2016) conduzido em 30 pacientes com periodontite, tratados com PDLSCs autólogos, não foi observada

significância estatística nas diferenças entre os grupos tratados com PDLSC e controle, porém foi constatado um aumento na altura do osso em ambos os grupos (Chen *et al.*, 2016; Itaya *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2021).

No estudo de Tamaoki e colaboradores (2010) as células de polpa dentária foram usadas para induzir células iPS. Das 6 linhas de células de polpa dentária, testadas com fatores de reprogramação convencionais, as células iPS foram estabelecidas a partir de 5 linhas de células de polpa dentária: existe uma grande eficiência da geração de células iPS a partir de células de polpa dentária. Além da alta eficiência de geração de iPS e fácil disponibilidade de células doador, a alta proliferação e as condições de cultura simples encorajaram a geração de células iPS a partir de células de polpa dentária. A reprogramação das células somáticas dos pacientes vai permitir a terapia de transplante livre de rejeição imunológica (Tamaoki *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2021).

4.2 Regeneração de dente inteiro

É um processo complexo que requer interações temporoespaciais precisas e sinalização molecular entre o DE e o DM. As pesquisas anteriores demonstraram que o DE embrionário em estágio inicial pode iniciar o desenvolvimento dentário, enquanto no estágio mais avançado a capacidade odontogénica passa para o DM, permitindo-lhe induzir a formação do dente quando recombinado com o epitélio. Os dentes maduros do homem perdem a sua capacidade regenerativa porque o DE não está presente nos dentes erupcionados (Balic, 2018; Zhang *et al.*, 2021).

Em alternativa, pode ser empregue uma estratégia híbrida para a regeneração de dente inteiro, na qual as divisões de tecido criados biologicamente, como por exemplo, o PDL ou uma coroa de dente, são combinados com um implante metálico ou de cerâmica ou uma raiz de dente regenerada seria combinada com uma coroa protética (Baranova *et al.*, 2020; Oshima *et al.*, 2014; Sonoyama *et al.*, 2006).

4.2.1 Métodos para regeneração do dente inteiro

Para explorar os possíveis métodos de regeneração dentária, o modelo de botão de dente embrionário de rato é o mais estudado. No ensaio de Hu e colaboradores (2006) as camadas de células DE e DM do rato foram criadas e combinadas para formar o botão de dente artificial. Essencialmente este modelo consiste no uso de tecido DE em estágio embrionário inicial, intacto ou dissociado, para assegurar a formação dentária bem-sucedida. No ensaio de

Ohazama e colaboradores (2004) observou-se a formação de dentes quando a camada DE foi combinada com células DM dissociadas, de uma mistura de células estaminais neurais embrionárias colhidas da medula espinhal embrionária ou células embrionárias da medula óssea. Nakao e colaboradores (2007) observaram pela primeira vez a regeneração bem-sucedida de dentes totalmente funcionais, usando botões artificiais dentários, a partir de células embrionárias de botão dentário. Nos anos seguintes os estudos de Ikeda e colaboradores (2009) e Oshima e colaboradores (2011) demonstraram a formação de dentes totalmente funcionais. As suspensões de células únicas de DE e DM colhidas de germes embrionários de dente do rato foram combinadas com uma gota de colagénio, cultivadas *in vitro* para se desenvolver no estágio inicial de sino e transplantadas numa mandíbula de rato com 8 semanas de idade. (Ikeda *et al.*, 2009). Este estudo relatou a formação de dentes de tamanho normal que erupcionaram de forma semelhante aos dentes naturais (Catón *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2009; Nakao *et al.*, 2007; Ohazama *et al.*, 2004; Oshima *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2021).

Ao mesmo tempo noutros estudos foi adoptado o uso de fontes de células obtidas de dentes pós-natais. As células DE e DM foram colhidas de dentes de porco não erupcionados com 6 meses de idade. As células DE e DM misturadas, ou sozinhas, aplicadas em estruturas tridimensionais biodegradáveis de poliéster em forma de dente, foram transplantadas para o omento de ratos atímicos. Na observação dos implantes retirados verificou-se a formação de pequenas coroas dentárias anatomicamente organizadas, constituídas de dentina, odontoblastos, polpa e esmalte. Nenhuma estrutura da raiz do dente tinha sido verificada nesses dentes. Posteriormente, foram concebidas construções ósseas da mandíbula e botão dentário híbrido, composto por um botão dentário modificado, criado a partir de células DM humanas e e uma matriz com células DE de suíno. Esse modelo, permitiu a formação de estruturas semelhantes à coroa do dente, e à raiz contendo tecidos do PDL que estavam integrados no osso circundante recém-formado. Embora seja um resultado extremamente promissor, a coroa do dente e as estruturas radiculares tinham tamanhos e formas variáveis, indicando a necessidade de melhores métodos para regular a formação dos tecidos dentários regenerados de forma mais precisa (Duailibi *et al.*, 2008; Honda *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2021).

O uso de uma matriz extracelular de botão de dente natural criada a partir de botão de dente pós-natal descelularizado (dTB) para proporcionar o desenvolvimento adequado de dentes é uma das soluções propostas. No estudo de Traphagen e colaboradores (2012) foi demonstrado que os processos de descelularização podem ser usados para remover componentes

imunogénicos de órgãos e tecidos inteiros de forma segura, mantendo a ECM natural e os seus componentes de sinalização. Com base no uso bem-sucedido de matrizes extracelulares descelularizadas (dECM) para aplicações em medicina regenerativa, foram criadas as estruturas dTB-ECM a partir de botões de dentes suínos pós-natais e revestidas novamente com células DE suínas e DPSCs humanas, juntamente com células endoteliais de veia umbilical humana para facilitar a revascularização. As estruturas foram assim transplantadas para cavidades de dentes extraídos de miniporcos adultos e cultivadas por 1 a 3 meses. Na análise da colheita, foi observada a formação de dentes de tamanho semelhante aos dentes humanos naturais (Sicari *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2017; Traphagen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

III – Discussão

Atualmente, o modelo de botão de dente embrionário de rato é o mais avançado para regeneração funcional de dentes a partir de tecidos embrionários. Este modelo demonstrou a formação de dentes de tamanho normal que erupcionaram de forma semelhante aos dentes naturais (Ikeda *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2021). Contudo, do ponto de vista ético devem ser avaliadas as vantagens e desvantagens deste modelo, privilegiando os estudos *in vitro*.

De acordo com a literatura, a falta de fontes adequadas de células DE humanas é o principal desafio para a criação de botões dentários fisiologicamente viáveis, daí que a fonte de células mais promissora podem ser as células iPS, diferenciadas posteriormente em células DE competentes. No entanto, atualmente nenhum ensaio clínico foi relatado para regeneração dentária usando as células iPS (Takahashi *et al.*, 2006; Thesleff *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021), revelando assim a importância de mais ensaios sobre a viabilidade destas células.

Um problema adicional que cria um obstáculo para a aplicação clínica de células iPS é a sua utilização quando derivadas de fibroblastos da polpa dentária, mucosa oral/gengival: apesar de a eficiência de produção ser 4 a 10 vezes maior com o uso de outras células, ainda é relativamente baixa para aplicação em regeneração dentária (Lee and Seo, 2016; Romanazzo *et al.*, 2019).

A co-cultura de células iPS com células e fatores de crescimento pode ser uma solução promissora, simulando as condições *in vivo* para assim otimizar os resultados da regeneração. Tal como, co-cultivar células iPS com células DE e DM pode induzir sinais de interação epitelial-mesenquimal desencadeando o processo de desenvolvimento dentário. Contudo, reproduzir uma interação epitelial-mesenquimal representa um grande desafio na regeneração dentária (Arakaki *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2013).

Em alternativa, o uso de células obtidas de dentes pós-natais para regeneração dentária resultou na formação de coroa e estruturas radiculares com tamanhos e formas variáveis. O tamanho anatómico correto, forma da coroa e relevo da superfície oclusal são condições importantes para uma oclusão funcional adequada numa dentição. Uma solução possível é usar ECM de botão de dente natural, criada a partir de dTB para orientar a formação de dentes de tamanho e formato específicos. A matriz de dECM foi recentemente aprovada pela *Food and Drug Administration* para aplicações terapêuticas em humanos, tornando este modelo uma terapia potencialmente promissora para a regeneração dentária (Baranova *et al.*, 2020; Sicari *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2017; Traphagen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021).

Outros desafios no desenvolvimento dentário, é a escolha das moléculas de sinalização estimuladoras do crescimento e induzir a sua atuação no local adequado de forma a obter o resultado pretendido. Além disso, a forma, tamanho e cor da coroa do dente são também um desafio apesar de serem características possíveis de serem corrigidas por métodos existentes na clínica dentária (Zhang *et al.*, 2021).

São necessárias mais pesquisas para obter uma compreensão mais detalhada das redes de sinalização que regulam a formação dentária, e como essas redes podem ser manipuladas para regular o tamanho e a forma na regeneração dentária (Cai *et al.*, 2007).

As células expandidas e reprogramadas, mesmo usando células autólogas, acarretam o risco de transformação em células cancerígenas. Para reduzir esses riscos o uso de vetores não virais para reprogramação, aliado à utilização de células pré-diferenciadas em linhagens específicas, por exemplo em as MSCs, poderá ser promissor (Cao *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016; Montserrat *et al.*, 2011; Radwan *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2014).

Outra limitação associada à maioria dos protocolos atuais de isolamento e expansão de células estaminais reside na utilização de produtos xenogênicos. Os meios de cultura são compostos por células xenogênicas e soro fetal bovino, os quais mantêm as células num estado indiferenciado, e salvaguardando a sua pluripotência. O uso desses produtos em ensaios clínicos pode acarretar um risco de transmissão de doenças, provocar uma reação imunogénica e afetar a reprodutibilidade (Erickson *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2016; Polo *et al.*, 2010; Takeda-Kawaguchi *et al.*, 2014; Villa-Diaz *et al.*, 2013).

IV – Conclusão

Os métodos atuais de reparação ou substituição dentária como implantes dentários ou próteses parciais removíveis utilizam materiais sintéticos cujas propriedades biológicas, físicas e mecânicas são bastante diferentes do dente natural. Os ensaios realizados até à data demonstram que a regeneração ou reparação do tecido biológico dentário com células estaminais dentárias com as mesmas propriedades biológicas, físicas e mecânicas do dente é promissora.

Atualmente, tal representa um desafio por várias razões: como tamanho e forma anatómica da coroa, formação de um periodonto adequado ou complicações que podem ocorrer durante ou após o transplante. Também o custo elevado associado à manipulação *ex vivo* das células é um factor que contribui negativamente para o avanço de regeneração dentária.

O progresso na regeneração de dentes inteiros com iPS exigirá ensaios clínicos de modo a assegurar a eficácia com a segurança exigida, e mais pesquisas no sentido de compreender melhor as redes de sinalização entre DE e DM.

V – Referências bibliográficas

- Abou Neel, E.A. *et al.* (2014). Tissue engineering in dentistry. *Journal of Dentistry*, 42(8), pp. 915-928.
- Arakaki, M. *et al.* (2012). Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 287(13), pp. 10590–10601.
- Balic, A. (2018). Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(4), pp. 382–388.
- Baranova, J. *et al.* (2020). Tooth Formation: Are the Hardest Tissues of Human Body Hard to Regenerate? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), pp. 1-31.
- Bencherif, S.A. *et al.* (2013). Advances in the design of macroporous polymer scaffolds for potential applications in dentistry. *Journal of periodontal & implant science*, 43(6), pp. 251–261.
- Botelho J. *et al.* (2017). Dental stem cells: recent progresses in tissue engineering and regenerative medicine. *Annals of Medicine*, 49(8), pp. 644-651.
- Calamari, Z.T. *et al.* (2018). Tissue Mechanical Forces and Evolutionary Developmental Changes Act Through Space and Time to Shape Tooth Morphology and Function. *Bioessays*, 40(12), pp. 1-21.
- Cai, J. *et al.* (2007). Patterning the size and number of tooth and its cusps. *Developmental biology*, 304(2), pp. 499–507.
- Cai, J. *et al.* (2013). Generation of tooth-like structures from integration-free human urine induced pluripotent stem cells. *Cell regeneration*, 2(1), pp. 1-6.
- Cao, X. *et al.* (2013). Non-viral co-delivery of the four yamanaka factors for generation of human induced pluripotent stem cells via calcium phosphate nanocomposite particles. *Advanced Functional Materials*, 23(43), pp. 5403–5411.
- Catón, J. *et al.* (2009). Current knowledge of tooth development: patterning and mineralization of the murine dentition. *Journal of anatomy*, 214(4), pp. 502–515.
- Catón, J. *et al.* (2011). Future dentistry: cell therapy meets tooth and periodontal repair and regeneration. *J Cell Mol Med*, 15(5), pp. 1054–1065.
- Chen, F.M. *et al.* (2016). Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem cell research & therapy*, 7(33), pp. 1-11.
- Duailibi, S.E. *et al.* (2008). Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *Journal of dental research*, 87(8), pp. 745–750.
- Erickson, G.A. *et al.* (1991). Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. *Developments in Biological Standardization*, 75, pp. 173–175
- Guo, W. *et al.* (2009). The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomaterials*, 30(35), pp. 6708–6723.
- Gupte, M.J *et al.* (2012). Nanofibrous scaffolds for dental and craniofacial applications. *J Dent Res*, 91(3), pp.227-234.
- Honda, M.J. *et al.* (2007). The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials*, 28(4), pp. 680–689.
- Hu, B. *et al.* (2006). Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue engineering*, 12(8), pp. 2069–2075.

- Huang, G.T. *et al.* (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 88(9), pp. 792-806.
- Ikeda, E. *et al.* (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), pp. 13475–13480.
- Itaya, S. *et al.* (2017). Hertwig's epithelial root sheath cells contribute to formation of periodontal ligament through epithelial-mesenchymal transition by TGF- β . *Biomedical research*, 38(1), pp. 61–69.
- Jones, D.L. *et al.* (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), pp. 11–21.
- Kolios, G. *et al.* (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1), pp. 3-10.
- Lee, C.H. *et al.* (2011). The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticle based transfection. *Biomaterials*, 32(28), 6683–6691.
- Lee, J. H. e Seo, S.J. (2016). Biomedical Application of Dental Tissue-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells international*, 2016, pp. 1-7
- Liu, J. *et al.* (2019). Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*, 8(6), pp. 1-24.
- Liu, N. *et al.* (2011). High levels of β -catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *The Journal of Bone and Mineral Research*, 26(9), pp. 2082–2095.
- Liu, Y. *et al.* (2011). miR-17 modulates osteogenic differentiation through a coherent feed-forward loop in mesenchymal stem cells isolated from periodontal ligaments of patients with periodontitis. *Stem Cells*, 29(11), pp. 1804–1816.
- Malhotra N. (2016) Induced pluripotent stem (iPS) cells in dentistry: a review. *International Journal of Stem Cells*, 9(2), pp 176-185
- Mao, A.S. *et al.* (2015). Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), pp. 14452-14459.
- Marler, J. *et al.* (1998). Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Advanced drug delivery reviews*, 33(1-2), pp. 165–182.
- Miran, S. *et al.* (2016). Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry. *Stem Cells International*, 2016, pp. 1-7.
- Miron, R.J. *et al.* (2012). Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *Journal of Dental Research*. 91(8), pp. 736–744.
- Mitsiadis, T.A. *et al.* (2007). Stem cell niches in mammals. *Experimental cell research*, 313(16), pp. 3377–3385.
- Mitsiadis, T.A. *et al.* (2015). Stem cell-based approaches in dentistry. *European Cells & Materials*, 30, pp. 248-257.
- Montserrat, N. *et al.* (2011). Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system. *The Journal of biological chemistry*, 286(14), pp. 12417–12428.
- Nakao, K. *et al.* (2007) The development of a bioengineered organ germ method. *Nature methods*, 4(3), pp. 227–230.
- Nussenbaum, B. *et al.* (2006). The role of gene therapy for craniofacial and dental tissue engineering. *Advanced drug delivery reviews*, 58(4), pp. 577–591.

- Ohazama, A. *et al.* (2004) Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *Journal of dental research*, 83(7), pp. 518–522.
- Oshima, M. *et al.* (2011). Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PloS one*, 6(7), pp. 1-11.
- Oshima, M. *et al.* (2014). Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy. *Scientific reports*, 4, pp. 1-10.
- Pagella, P. *et al.* (2014). Roles of innervation in developing and regenerating orofacial tissues. *Cellular and molecular life sciences*, 71(12), pp. 2241–2251.
- Polo, J.M. *et al.* (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 28(8), pp. 848–855.
- Radwan, I.A. *et al.* (2020). Induced Pluripotent Stem Cells in Dental and Nondental Tissue Regeneration: A Review of an Unexploited Potential. *Stem cells international*, 2020, pp. 1-24.
- Ravichandran, R. *et al.* (2012). Minimally invasive cell-seeded biomaterial systems for injectable/epicardial implantation in ischemic heart disease. *Int J Nanomedicine*. 7, pp. 5969-5994.
- Robey, P.G. (2000). Stem cells near the century mark. *J Clin Invest*. 105(11), pp. 1489-91.
- Rodríguez-Lozano, F.J. *et al.* (2011). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *International Endodontic Journal*, 44(9), pp. 800-806.
- Romanazzo, S. *et al.* (2019). iPSC bioprinting: where are we at? *Materials*, 12(15), pp. 1-18.
- Rosa, V. *et al.* (2013). Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *Journal of dental research*, 92(11), pp. 970–975.
- Sicari, B.M. *et al.* (2014). An acellular biologic scaffold promotes skeletal muscle formation in mice and humans with volumetric muscle loss. *Science translational medicine*, 6(234), pp. 1-24.
- Smith, E.E. *et al.* (2017). Developing a biomimetic tooth bud model. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 11(12), pp. 3326–3336.
- Sonoyama, W. *et al.* (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one*, 1(1), pp. 1-8.
- Takahashi, K. *et al.* (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp. 663–676.
- Takeda-Kawaguchi, T. *et al.* (2014). Derivation of iPSCs after culture of human dental pulp cells under defined conditions. *PLoS One*, 9(12), pp. 1-15.
- Tamaoki, N. *et al.* (2010). Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *Journal of dental research*, 89(8), pp. 773–778.
- Ten Cate, A.R. (1996). The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis*, 2(1), pp. 55-62.
- Thesleff, I. (2018). From understanding tooth development to bioengineering of teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 126(1), pp. 67-71.
- Tomlinson, M.J. *et al.* (2013). Cell separation: Terminology and practical considerations. *Journal of tissue engineering*, 4, pp.1-14.
- Traphagen, S.B. *et al.* (2012). Characterization of natural, decellularized and reseeded porcine tooth bud matrices. *Biomaterials*, 33(21), pp. 5287–5296.

- Villa-Diaz, L.G. *et al.* (2013). Concise review: the evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells*, 31(1), pp. 1–7.
- Wang, J. *et al.* (2017). Signaling Pathways Critical for Tooth Root Formation. *J Dent Res*, 96(11), pp. 1221–1228.
- Wang, L. *et al.* (2012). Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *Journal of dental research*, 91(11), pp. 1003–1010.
- Xuan, K. *et al.* (2018). Deciduous autologous tooth stem cells regenerate dental pulp after implantation into injured teeth. *Science translational medicine*, 10(455), pp. 1–13.
- Yadav, P. *et al.* (2016). Test Tube Tooth: The Next Big Thing. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 10(6), pp. 1–3.
- Yan, X. *et al.* (2010). iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem cells and development*, 19(4), pp. 469–480.
- Yu, T. *et al.* (2020). Molecular and cellular mechanisms of tooth development, homeostasis and repair. *Development*, 147(2), pp. 1–15.
- Zhai, Q. *et al.* (2019). Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med.*, 13(2), pp. 152–159.
- Zhang, Q.Z. *et al.* (2012). Human oral mucosa and gingiva: a unique reservoir for mesenchymal stem cells. *Journal of dental research*, 91(11), pp. 1011–1018.
- Zhang L. *et al.* (2013) Review scaffold design and stem cells for tooth regeneration. *Japanese Dental Science Review*, 49(1), pp.14–26.
- Zhang, W. *et al.* (2009). Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. *Methods*, 47(2), pp. 122–128.
- Zhang, W. *et al.* (2017). Decellularized Tooth Bud Scaffolds for Tooth Regeneration. *Journal of dental research*, 96(5), pp. 516–523.
- Zhang, W. *et al.* (2021). Tooth Repair and Regeneration: Potential of Dental Stem Cells. *Trends in Molecular Medicine*, 27(5), pp. 501–511.
- Zhao, Q.C. *et al.* (2015). MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(2), pp. 530–535
- Zhu, K. *et al.* (2014). Reprogramming fibroblasts to pluripotency using arginine-terminated polyamidoamine nanoparticles based non-viral gene delivery system. *International journal of nanomedicine*, 9, pp. 5837–5847.