

Adnan AL ADIB

Células estaminais de tecidos dentários: potencial na regeneração periodontal

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências de Saúde
2019

Adnan AL ADIB

Células estaminais de tecidos dentários: potencial na regeneração periodontal

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências de Saúde
2019

Adnan AL ADIB

Células estaminais de tecidos dentários: potencial na regeneração periodontal

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

Adnan AL ADIB

RESUMO

As células estaminais são células indiferenciadas com uma ampla capacidade de diferenciação, com enorme potencial na regeneração tecidual. A biologia celular combinada com a engenharia tecidual, têm vindo a ampliar a capacidade de regeneração dos mais diversos tecidos, surgindo como estratégia promissora para abordar a doença periodontal – condição inflamatória crónica do periodonto que conduz à perda progressiva, irreversível dos tecidos de suporte.

O objetivo do trabalho foi fazer uma revisão bibliográfica narrativa das propriedades das células estaminais dentárias e seu potencial de regeneração dos tecidos periodontais. Foi realizada uma pesquisa nos motores de busca Pubmed, Medline, Scielo, Google académico utilizando as palavras-chave “*stem cells*”, “*mesenchymal stem cells*”, “*periodontal regeneration*”.

São inúmeras as evidencias do potencial das células estaminais mesenquimatosas na regeneração do periodonto, recorrendo diretamente às células ou aos seus exossomas – procedimentos inicialmente explorados em modelos animais e mais recentemente também em humanos com periodontite crónica.

Palavras-chave: células estaminais, células estaminais mesenquimatosas, regeneração periodontal..

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells with a wide differentiation capacity with an enormous potential in tissue regeneration. Cell biology and tissue engineering have increased the capacity of regeneration of the most diverse tissues and thus emerges as a promising strategy to approach periodontal disease – a chronic inflammatory condition of periodontium leading to progressive and irreversible loss of supporting tissues.

The work aimed to make a bibliographic narrative review of the properties of dental stem cells and their potential for regeneration periodontal tissues. Research was carried out in Pubmed, Medline, Scielo and Google academic platforms and the keywords “stem cells”, “mesenchymal stem cells”, “periodontal regeneration” were used.

There are numerous evidences of the potential of the mesenchymal stem cells in the regeneration of the periodontium, using directly the cells or their exosomes - procedures initially explored in animal models and more recently also in humans with chronic periodontitis.

Keywords : stem cells, mesenchymal stem cells, periodontal regeneration.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a meu pai e minha mãe, você sempre esteve lá, você ainda está lá e eu sei que você estará lá até o fim. Então eu queria dizer obrigado, por tudo, por você. Eu vos amo das profundezas do meu coração. É graças a você que digo a mim mesmo que nada é impossível, porque nunca estarei sozinho.

Para meu irmão e minhas irmãs, neste momento da nossa vida, podemos nos orgulhar de nós mesmos e do que conseguimos. Nós fazemos nossos pais orgulhosos, eu vos amo ainda mais a cada dia.

Para toda minha grande família, em todos os cantos do mundo, eu vos amo. Eu sinto muito sua falta.

À minha orientadora, Teresa Sequeira, Agradeço a honra que você fez ao aceitar a direção de minha tese. Sou grato por seu valioso conselho no desenvolvimento do meu trabalho e sua velocidade de resposta para suas correções. Obrigado por se disponibilizar quando o solicitei.

Para o meu binomio, com quem vivi essa experiência e meus estudos, nos veremos novamente, é certo !

A minha Trinity com a qual passemos todas as fim de semanas, voce já sabem.

Para o meu colega do ginásio, com quem eu me diverti muito.

A minha prima, com quem eu ri muito no café do bairro.

Ao meu colega de quarto este ano, terminei o meu ano em beleza conhecendo você.

Para todos os meus amigos e os maravilhosos encontros que fiz aqui, por todos os bons momentos que compartilhamos.

ÍNDICE:

I. INTRODUÇÃO	1
I 1. Materiais e Método	1
II. DESENVOLVIMENTO	2
II 1. Células estaminais	2
II 1.1. Células estaminais totipotentes	3
II 1.2. Células estaminais pluripotentes	3
II 1.3. Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)	3
II 1.4. Células estaminais multipotentes	4
II 1.4.1. Células estaminais mesenquimatosas	4
II 2. Células estaminais dentárias	4
II 2.1. Células estaminais de dentes permanentes (DPSC)	4
II 2.2. Células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED)	5
II 2.3. Células estaminais da papila apical (SCAPs)	6
II 2.4. Células estaminais do folículo dentário (DFSC)	7
II 2.5. Células estaminais do ligamento (PDLSCs)	8
II 3. Células estaminais mesenquimatosas e o potencial de regeneração do periodonto	9
II 3.1. A doença periodontal	9
II 3.2. Células estaminais mesenquimatosas e regeneração periodontal	10
II 3.2.1. Modelos animais	10
II 3.2.2. Estudo clínico em Humanos	11
III. DISCUSSÃO	12
IV. CONCLUSÃO	13
V. BIBLIOGRAFIA	14

ÍNDICE DE ABREVIATURAS :

CE – Células Estaminais

iPSC – induced Pluripotent Stem Cells

CEM – Célula Estaminal Mesenquimatosa

DPSC – Dental Pulp Stem Cell

SHED – Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth

PDLSC – PerioDontal Ligament Stem Cell

SCAP – Stem Cells of Apical Papilla

DFSC – Dental Follicle Stem Cell

STRO-1 – Mesenchymal stem cell marker.

CD 146 – Cluster of differentiation 146

CP 23 – Cementitious Protein 23

BMP – Bone Morphogenetic Proteins

LP – Ligamento Periodontal

I INTRODUÇÃO

O termo "células estaminais" (CE) é usado para designar células indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação e que, quando colocadas em ambientes apropriados, são capazes de se diferenciar em células especializadas adquirindo uma morfologia e função específica. Este processo de diferenciação é normalmente irreversível (Muschler *et al.*, 2004).

Desde a sua descoberta, as CE têm vindo a ser identificadas em numerosos tecidos, incluindo os dentários (Petrovic e Stefanovic, 2009). Assim, compreende-se que o número de publicações (com impacto científico crescente) sobre as suas características e potencial de diferenciação não tenha parado de crescer, circunstância evidenciada pela atribuição do Prémio Nobel de Medicina de 2012, aos cientistas John Gurdon e Shinya Yamanaka pela produção de CE induzidas (iPSC : induced Pluripotent Stem Cells) a partir de células diferenciadas da epiderme humana (Maartens, 2017).

Esse interesse pelas CE pode ser amplamente explicado pelo desenvolvimento da medicina regenerativa – abordagem terapêutica muito promissora e por isso em ampla expansão – que, recorrendo à ciência tecidual, visa melhorar ou mesmo reconstruir um tecido ou órgão inteiro, idêntico ao original e pronto para ser enxertado (Petrovic e Stefanovic, 2009).

Os médicos dentistas, como todos os atores de profissão em saúde, são também naturalmente confrontados com o potencial de aplicação das CE num contexto regenerativo. Abordagens regenerativas baseadas na utilização de CE para o tratamento e reparação de tecidos dentários irão ampliar significativamente o leque de abordagens terapêuticas disponíveis e terão por isso um grande impacto na prática da medicina dentária (Orsini *et al.*, 2018).

O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão sobre as propriedades básicas das CE, a sua presença no dente e tecidos de suporte e o seu potencial de regeneração de tecidos dentários, muito em particular, o periodonto.

I 1. Materiais e Método

Recorreu-se a artigos científicos indexados em bases de dados como *PubMed*, *Medline*, *Google Scholar*, *Science Direct* para fazer uma revisão narrativa. As palavras chave utilizadas foram: "stem cells", "dental regeneration", "mesenchymal stem cells", "stem cells from human exfoliated deciduous teeth", "periodontal ligament stem cells", adicionando-se filtros como

“full text available” e “10 years”. Contudo, dada a relevância científica e histórica de algumas referências anteriores a 2009, optou-se pela sua inclusão neste estudo. Os critérios de inclusão foram os seguintes: consideraram-se os artigos escritos em francês, português ou inglês e de acesso livre. Os critérios de exclusão foram os seguintes: artigos com abordagens menos pertinentes para o trabalho. Foram no final selecionados 52 artigos, livros e páginas na internet com informação considerada relevante para o desenvolvimento da tese.

II DESENVOLVIMENTO

II 1. Células estaminais

Uma CE é uma célula indiferenciada que possui um potencial de diferenciação em pelo menos um tipo de célula (Huang *et al.*, 2009). De um ponto de vista citológico, as CE têm uma elevada relação núcleo / citoplasma o que significa que a cromatina se encontra bastante relaxada e o citoplasma contém poucos organelos.

Em função da fase/evolução do organismo em desenvolvimento, são identificados três grandes grupos de CE – as CE fetais, as CE embrionárias e as CE adultas – que revelam diferentes potenciais de diferenciação. Assim, as CE fetais têm o potencial de gerar todos os tecidos do organismo incluindo os anexos embrionários necessários para o desenvolvimento de todo um organismo. As CE embrionárias distinguem-se das CE adultas por uma propriedade importante: elas têm o potencial de gerar todos os tecidos do organismo, incluindo células da linhagem germinativa (gâmetas) e são por isso designadas de totipotentes. As CE adultas não se diferenciam em células da linha germinativa e são por designadas, em termos de potencial de diferenciação, pluripotentes (Barrando *et al.*, 2000). Mediante circunstâncias diversas, as CE adultas podem ter ainda menor potencial de diferenciação, podendo ser multipotentes, a diferenciação depende do folheto embrionário original, ou unipotentes, quando podem apenas diferenciar-se num único tipo de celular e com capacidades de autorrenovação mais limitadas (Wagers e Weissman, 2004).

A auto-renovação é a capacidade de uma célula proliferar indefinidamente, mantendo um estado indiferenciado e, portanto, todas as potencialidades. As CE podem se multiplicar por divisão simétrica ou assimétrica. A divisão homoplástica simétrica corresponde à divisão celular que gera duas células-filhas idênticas à célula-mãe e que serão destinadas a adquirir o

mesmo destino. Em geral, esse tipo de divisão celular é usado por CE embrionárias, mas também em caso de lesão para regenerar o reservatório de CE teciduais (Muschler *et al.*, 2004). As CE também podem realizar uma divisão heteroplástica simétrica: as duas células-filhas produzidas serão idênticas, mas mais diferenciadas da célula-mãe. As CE também têm a capacidade para gerar simultaneamente cópias idênticas de si e células-filha diferenciadas assimétricas (Muschler *et al.*, 2004).

II 1.1. Células estaminais totipotentes

As CE totipotentes são definidas pela seu potencial em gerar um organismo completo. Elas têm assim propriedade de se diferenciar em todos os tipos de células de um organismo resultantes dos grandes folhetos germinativos - endodérmicos, mesodérmicos e ectodérmicos - assim como na formação de apêndices embrionários (vesícula vitelina, âmnio, membrana serosa, córion). Estas células são encontradas no organismo apenas entre o estado de zigoto ao estado de mórula (8-16 células) que decorre durante os primeiros 4 dias após a fertilização (Bacakova *et al.*, 2018).

II 1.2. Células estaminais pluripotentes

As CE pluripotentes têm a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células de um organismo derivado dos três folhetos embrionários, tal como as CE totipotentes, tendo perdido no entanto a capacidade de se diferenciar em células que integram os anexos embrionários (Rostovskaya *et al.*, 2019). Elas células estão presentes na massa celular interna do blastocisto (embrioblasto) desde 5º dia até o 7º após a fertilização. Há também células pluripotentes que permanecem até estágios mais avançados (5-9 semanas de desenvolvimento), as CE fetais (Rostovskaya *et al.*, 2019).

II 1.3. Células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs)

As iPSCs resultam de células diferenciadas humanas adultas manipuladas em laboratório. Com o auxílio de retrovírus, são introduzidas nestas células diferenciadas uma combinação de

vários genes, encontrados ativos nas CE (Oct-3/4, Sox2, c-Myc e Klf4), gerando assim iPSCs que exibem características próximas às CE pluripotentes (Tomokiyo *et al.*, 2018).

II 1.4. Células estaminais multipotentes

As CE adultas são multipotentes. Embora estejam envolvidas numa certa especialização, elas têm ainda capacidade de proliferação e auto-renovação, apesar de mais restrita que a das CE embrionárias. Estas células apresentam capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células do folheto embrionário no qual tiveram origem. As CE adultas estão presentes num estado indiferenciado na maioria dos tecidos e contribuem para homeostase para órgãos e tecidos ao longo da vida do indivíduo (Wagers e Weissman, 2004). As CE mesenquimatosas, inicialmente isoladas da medula óssea nas décadas de 1960 e 1970, são um tipo particular destas células.

II 1.4.1. Células estaminais mesenquimatosas

As CE mesenquimatosas (CEM) possuem propriedades de potencialidade múltipla e têm vindo a ser-lhes atribuídas propriedades reguladoras imunológicas e inflamatórias (Lee *et al.*, 2010). A terapia celular com base no seu transplante parece ser uma abordagem particularmente promissora no presente, uma vez que estas células podem diferenciar-se em adipócitos, condrócitos, osteoblastos, células do músculo liso e em células endoteliais (Delorme *et al.*, 2009).

A utilização de CEM em terapia celular parece ser devido a diferentes mecanismos: transdiferenciação, fusão celular, estimulação da angiogénese, secreção de citocinas ou de factores de crescimento benéficos, a estimulação da proliferação de CE endógenas, a inibição da apoptose e o efeito imunomodulador (Herrero e Pérez-Simón, 2010).

II 2. Células estaminais dentárias

II 2.1. Células estaminais de dentes permanentes (DPSC)

A polpa dentária é um tecido conjuntivo inicialmente laxo quando jovem localizado no centro do dente, circundado por um tecido mineralizado: a dentina. A polpa, que tem origem em tecido embrionário, ectomesenquimatoso, tem todos os elementos celulares de um tecido conjuntivo propriamente dito com a exceção de apresentar uma população celular singular, apenas aí encontrada, os odontoblastos - estas células, localizadas na periferia da polpa, diferenciam-se durante a odontogênese, por interação com as células epiteliais do órgão dentário em formação. A polpa contém também fibras nervosas e vasos sanguíneos, assim como vários tipos de células, incluindo fibroblastos que sintetizam a matriz extracelular. Em caso de agressão dentária (química, mecânica, térmica ou bacteriana), os odontoblastos, total ou parcialmente destruídos, podem ser substituídos pela presença de tais células ectomesenquimatosas indiferenciadas que aí permanecem desde a formação da papila (Li e Clevers, 2010).

Fisiologicamente, essas DPSC estarão num estado quiescente, mas quando expostas a circunstâncias adversas - ataque bacteriano durante a cárie, por exemplo - elas podem ser ativadas, mediante sinais adequados (essencialmente citocinas pró-inflamatórias), exibindo a possibilidade de se diferenciar em células tipo-odontoblastos (*odontoblast-like cells*). Tais células serão as responsáveis pela formação da dentina terciária reactiva que protege a polpa e minimiza assim o impacto adverso da perda odontoblástica, permitindo que tal reação pulpar se aproxima da homeostasia (Gronthos *et al.*, 2002; Li e Clevers, 2010).

As CE da polpa são CE adultas e foram descobertas em 2000 (Gronthos *et al.*, 2000). As CE da polpa dentária imaturas foram identificadas através da cultura de órgãos da polpa dentária como uma subpopulação pluripotente de DPSCs em 2006. Essas CE da polpa representam uma reserva potencial acessível de CE pluripotentes pós-natais (Yang *et al.*, 2018).

Foi demonstrado que a expressão dos marcadores de CE, STRO-1 e CD 146, era restrita a células encontradas na periferia dos vasos sanguíneos e ausente no tecido fibroso circundante bem como na camada odontoblástica, sugerindo que os nichos do DPSC poderiam estar localizados nas regiões perivasculares da polpa. As DPSC já podem ser recolhidas, processadas e armazenadas criogenicamente (Hollands *et al.*, 2018).

II 2.2. Células estaminais de dentes decíduos esfoliados (SHED)

As CE de dentes decíduos esfoliados, também conhecidas como SHED (para *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth*), são uma fonte de CE multipotentes, relativamente acessíveis que podem ser isoladas e cultivadas *ex vivo* (Martinez Sael *et al.*, 2016). Exibem uma maior taxa de proliferação que as DPSC – contudo, só podem ser recolhidas em crianças (Miura *et al.*, 2003). A sua plasticidade é alta, podendo diferenciar-se em células neuronais, adipócitos, miócitos e condrócitos (Petrovic e Stefanovic, 2009; Kerkis *et al.*, 2006).

As SHED permitem ainda a indução e o recrutamento de células osteogénicas processo relevante na formação óssea, contribuindo para explicar a natureza dentição primária cuja reabsorção radicular é acompanhada pela formação óssea (Telles *et al.*, 2010). Assim, a dentição decídua não será apenas um “guia” para os dentes definitivos, mas também estará envolvida na indução da formação óssea durante a erupção (Seo *et al.*, 2008).

Cordeiro e colaboradores (2008), utilizaram SHED de polpas de terceiros molares, prepararam-nas em cultura e transplantaram-nas subcutaneamente em ratos imunodeficientes. Observaram então que, para além do tecido resultante apresentar uma arquitectura e celularidade muito próxima de uma polpa dentária, havia indícios de que algumas SHED se podem diferenciar em células tipo odontoblastos (odontoblast-like cells) *in vivo*. (Cordeiro *et al.*, 2008). As SHED são uma população celular multipotente, composta por células potencial mais imaturas do que outras células mesenquimatosas pós-natais. São capazes também de expressar marcadores neuronais como a nestina (Govindasamy *et al.*, 2010).

II 2.3. Células estaminais da papila apical (SCAPs)

As CE da papila apical, ou SCAP (*Stem Cells of Apical Papilla*) têm um papel na formação contínua de raízes dentárias. De facto, elas parecem ser a fonte dos odontoblastos, responsáveis pela formação da dentina radicular, enquanto as DPSC são responsáveis pela substituição dos odontoblastos que formam a dentina reparadora (Aydin e Şahin, 2019; Nada e El Backly, 2018). Num estudo realizado em leitões, a remoção cirúrgica da papila apical na fase inicial do desenvolvimento radicular, interrompe tal desenvolvimento. O tecido pulpar permanece intacto e as outras raízes do mesmo dente onde a papila apical ainda estava presente têm um desenvolvimento completo (Huang *et al.*, 2009). Essas SCAP estão localizadas na região apical da raiz dos dentes permanentes imaturos e parecem concentrar-se

em nichos perivasculares, mas também podem estar espalhadas no tecido (Sonoyama *et al.*, 2008).

In vitro, as SCAP podem sofrer diferenciação odontogénica, adipogénica, osteogénica e neurogénica (Sonoyama *et al.*, 2006). A equipa de Sonoyama (2006) identificou estas células e mostrou que tem uma elevada taxa de absorção para a bromodeoxiuridina (um indicador de proliferação celular). Quando estimuladas com fosfato inorgânico e com dexametasona complementada com L-ascorbato-2-fosfato, as SCAP sofrem de uma diferenciação odontogénica. A equipa mostrou ainda que as SCAP, tal como as DPSCs, são capazes de recriar um complexo funcional de polpa/dentina *in vivo* quando transplantados para matriz adequada (hidroxiapatita / fosfato tricálcico) (Sonoyama *et al.*, 2006).

Num estudo *in vitro* de Bakopoulou *et al.*, (2011), a equipa comparou o potencial de diferenciação osteogénico/odontogénico entre DPSCs e as SCAPs. Para isso, as células foram recolhidas a partir de terceiros molares inclusos em fase desenvolvimento radicular e analisada o potencial de mineralização, morfologia celular e características de crescimento. Os resultados obtidos revelaram que ambas, DPSCs e SCAP, apresentaram um potencial de migração e produziram estruturas mineralizadas tridimensionais. Contudo, as SCAP mostraram uma taxa de proliferação e potencial de mineralização significativamente mais elevados que as DPSC. (Bakopoulou *et al.*, 2011).

II 2.4. Células estaminais do folículo dentário (DFSC)

O folículo dentário é um tecido ectomesenquimatoso que envolve o órgão do esmalte e a papila durante o desenvolvimento do germe dentário antes de sua erupção, mas pode persistir durante toda a vida do indivíduo, no caso de dentes incluídos (Yang *et al.*, 2019). Este tecido contém células progenitoras, as DFSC (*Dental Follicle Stem Cells*) que formam o periodonto: o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Morszeck *et al.*, 2005). Estes precursores de células podem ser isolados a partir de folículos dentários humanos de dentes do siso incluídos ou no estado de germe antes da formação das raízes (D'Aquino *et al.*, 2011).

As DFPC mostram uma capacidade de diferenciação osteogénica *in vitro*. Foi observado uma expressão dois marcadores cementários específicos (proteína de ligação cementária e proteína cementária 23, CP-23), quando essas células são estimuladas em cultura pela BMP-2 e BMP-7. Depois de entrar em contato com diferentes elementos indutores de diferenciação,

observou-se que as DFSC podem diferenciar-se *in vitro*, em neurónios, osteoblastos, adipócitos e outros tipos de células (Kémoun *et al.*, 2007).

Quando as DFPC são transplantados *in vivo*, é obtido tecido fibroso. Não há formação de dentina, cemento ou osso, talvez devido ao baixo número de células na cultura inicial (Morsczeck *et al.*, 2008).

II 2.5. Células estaminais do ligamento (PDLSCs)

As CE do ligamento periodontal, ou PDLSC (*PerioDontal Ligament Stem Cells*) são CE que desempenham um papel endógeno na manutenção de um número constante de células do tecido periodontal pois o LP está constantemente sob o efeito de forças mastigatórias e porque isso necessita uma elevada taxa de renovação (Alves *et al.*, 2010). Estudos prévios já tinham demonstrado que o LP continha populações celulares capazes de formar cemento (cementoblastos) tecido ou osso (osteoblastos) (Gay *et al.*, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2017).

Seo e a sua equipa isolaram-se células do LP de terceiros molares extraídos de humanos, identificaram-nas (por imunohistoquímica) e isolaram as PDLSCs verificando que *in vivo* - quando transplantadas em ratos imunodeficientes – essas células eram capazes de reparar os tecidos periodontais formando cemento e ligamento periodontal (Seo *et al.*, 2004).

A presença destes diferentes tipos de células sugere que o LP contém progenitores celulares que mantêm a homeostase do tecido e regeneram o periodonto (Zhu e Liang, 2015). Os "nichos" onde PDLSC predominantemente parecem ser encontradas são perivascularose, extravasculares (Chen *et al.*, 2006). Essas células são capazes de se diferenciar, *in vitro*, em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, dependendo das condições de cultura (Gay *et al.*, 2007).

As PDLSC sintetizam colágeno tipo I que é capaz de se ligar com o cemento recém-formado, para simular fibras fisiológicas de Sharpey, responsáveis pela ligação funcional entre o cemento e o ligamento periodontal. Pode-se inferir que uma subpopulação celular seria capaz de se diferenciar em cementoblastos / cementócitos e outra população em células que sintetizam colágeno I *in vivo* (Huang *et al.*, 2009). Essas CE podem ser recolhidas na superfície das raízes extraídas.

II 3. Células estaminais mesenquimatosas e o potencial de regeneração do periodonto

II 3.1. A doença periodontal

A doença periodontal é uma condição inflamatória crônica do periodonto que é caracterizada pela destruição irreversível da fixação do dente ao osso alveolar. A doença, se não foi tratada, pode evoluir levar à perda progressiva do tecido gengival, do LP, do cemento e do osso alveolar de suporte, resultando numa dentição inestética e funcionalmente comprometida, favorecendo a perda prematura do dente (Han *et al.*, 2014).

É uma patologia multifatorial, significando que envolve uma interação complexa entre a resposta imune do hospedeiro, quando há uma colonização microbiana do LP, uma modificação dos fatores do hospedeiro, incluindo tabagismo e suscetibilidade genética. A periodontite não só dá origem a problemas funcionais e estéticos na cavidade oral, mas tem vindo a ser associada a um crescendo de doenças sistêmicas, como diabetes, parto prematuro, doença cardiovascular, acidente vascular cerebral e doença pulmonar (Iwata *et al.*, 2018).

As consequências da doença periodontal não tratada têm amplas implicações na qualidade de vida de um indivíduo e têm portanto impacto sobre o sistema de saúde com um alto custo económico (Han *et al.*, 2013).

É importante tratar a doença periodontal para reduzir o risco de perda dentária, evitar/reduzir a hiperensibilidade dentinária, reduzir os danos da estrutura exposta da raiz (cemento ou mesmo dentina radicular), reduzir a incidência de cárie profunda e restaurar um sorriso saudável.

O sucesso ideal da terapia periodontal envolveria a reposição da integridade, da estrutura e por isso da função integral dos componentes do periodonto. Os tratamentos convencionais têm vindo essencialmente a permitir retardar ou interromper a evolução da periodontite (Iwata *et al.*, 2018).

As citoterapias, que combinam a biologia celular das CE e a engenharia tecidual, surgem assim como estratégias promissoras para ultrapassar estas limitações, ampliando as potenciais abordagens terapêuticas, mais individualizadas, e com a perspectiva de reverter uma condição considerada crônica (Iwata *et al.*, 2018; Tomokiyo *et al.*, 2018).

II 3.2. Células estaminais mesenquimatosas e regeneração periodontal

II 3.2.1. Modelos animais

As CEM são CE adultas capazes de originar múltiplos tipos de células especializadas. Devido à sua extensa distribuição em muitos tecidos adultos, incluindo aqueles de origem dentária, as CEM tornaram-se muito interessante para uso na regeneração periodontal (Han *et al.*, 2014).

As CEM foram inicialmente transplantadas para modelos animais e observado o seu potencial para reconstituir o cemento. Este estudo (Han *et al.*, 2014), sugeriu fortemente o papel importante das CEM para a regeneração do periodonto. Posteriormente, outros investigadores como a equipa de Tomokiyo (2018) têm vindo a estudar a regeneração do periodonto pela combinação de CEM com fatores de crescimento. Para que tal ocorra, os eventos de regeneração, devem progredir em uma sequência extremamente ordenada e programada, tanto temporal como espacialmente, replicando os eventos-chave no desenvolvimento periodontal. (Tomokiyo *et al.*, 2018). Atualmente, sabe-se que as células progenitoras apropriadas devem primeiro migrar para o local da lesão e unir-se à superfície da raiz desnudada para proliferar e diferenciar-se nos componentes teciduais indispensáveis a uma inserção periodontal funcional (Han *et al.*, 2014).

Na regeneração tecidual, em particular dos tecidos periodontais, têm sido considerados críticos os seguintes fatores: primeiro, uma quantidade suficiente de células progenitoras adequada, abundante com a capacidade de diferenciação nos fenótipos necessários, incluindo osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos; segundo, os sinais apropriados para modular tal diferenciação e assim permitir neogénese tecidual; e finalmente, um suporte de matriz extracelular tridimensional que facilite esses processos (Han *et al.*, 2013).

Vários estudos têm reportado muitas vantagens no transplante de CEM na regeneração do periodonto, tentando ultrapassar as limitações enunciadas (Kawai *et al.*, 2015; Sakaguchi *et al.*, 2017). Contudo, foi mais recentemente que Chew e os seus colaboradores (2019) mostraram, em modelo de rato com lesão periodontal cirurgicamente induzida, que exossomas de CEM humanas, veiculados em esponjas de colagénio, têm a capacidade de promover regeneração de tecidos periodontais e formar novo osso alveolar, não identificando qualquer resposta adversa (Chew *et al.*, 2019). Estes investigadores acompanharam ao longo de 4 semanas, os animais tratados (implantes de esponja de colagénio com exossomas de

CEM humanas colocada no local da lesão) e compararam com dois grupos de controlo (animais que receberam apenas a esponja de colagénio no local da lesão e um outro grupo em que nada foi colocado no local da lesão). Ao fim de 2 semanas, já era possível observar nos animais tratados a formação de novo osso alveolar, sendo o efeito mais evidente no final de 4 semanas. Identificaram ainda atividade proliferativa e migratória das células do LP e a formação de fibras funcionalmente orientadas. Ainda, e pelo facto de se ter tratado de um único implante que resultou em efeitos crescentes ao longo das 4 semanas estudadas, e sugere ainda tratar-se de uma combinação sinérgica que possibilita o aumento da viabilidade celular, a migração, a proliferação, a síntese de matriz extracelular e a diferenciação necessária para formar novo osso e inserção das fibras do LP (Chew *et al.*, 2019).

II 3.2.2 Estudos clínicos em Humanos

Há quase 100 anos que se têm vindo a estudar terapias com o objectivo de regenerar o periodonto (Hegedus, 1923). Várias abordagens têm vindo a ser desenvolvidas para regenerar os tecidos periodontais, contudo com efeitos limitados para tratar lesões severas, precisamente as que mais comprometem a saúde (Jayakumar *et al.*, 2010; Iwata *et al.*, 2015).

A investigação tem evoluído e muito recentemente, a equipa de Iwata *et al.*, (2018), realizou um estudo para verificar a segurança e a eficácia na regeneração do periodonto em humanos, aplicando camadas de células autólogas derivadas do LP, em pacientes com periodontite. Para tal, foram extraídos dentes do siso de 10 pacientes diagnosticados com periodontite crónica, com idades entre 33 e 63 anos, as células do LP preparadas em camadas segundo o método “*Cell Sheet Engineering Technology*” já estabelecido pelo grupo (Yamada *et al.*, 1990) e aplicadas, as referidas camadas combinadas com β -tricálcio fosfato, quatro vezes, ao longo de 6 meses. A eficácia do tratamento foi avaliada mediante parâmetros clínicos e radiográficos que incluíram nível clínico de inserção, profundidade de sondagem, ganho ósseo linear. Um paciente queixou-se de dor intensa durante uma semana após a cirurgia mas não foram relatadas quaisquer outras complicações associadas a este procedimento. Os resultados mostram que todos parâmetros clínicos melhoraram significativamente aos 3 meses e 6 meses e não foi detetada nenhuma evidência de anquilose em qualquer dos participantes (Iwata *et al.*, 2018).

III DISCUSSÃO

Terapias baseadas em células, citoterapias, têm vindo a ampliar as abordagens terapêuticas, particularmente no contexto da regeneração tecidual. As CE, e mais em particular as CEM, têm-se revelado uma ferramenta promissora no tratamento de defeitos periodontais (Iwata *et al.*, 2018; Tassi *et al.*, 2017; Tomokiyo *et al.*, 2018).

Se no passado a obtenção de CE levantava questões éticas, a sua identificação nos mais diversos tecidos pós-natais tem vindo a ultrapassar esta limitação. No caso concreto das CEM, é evidente potencial na regeneração do periodonto. A equipa de Tassi (2017) realizou uma revisão sistemática da literatura concluindo que, apesar da heterogeneidade das evidências, os dados indicam claramente que as CEM pode ser usadas com sucesso para tratar defeitos periodontais em modelos animais (Tassi *et al.*, 2017).

As CEM podem ser encontradas em vários tecidos dentários, e as populações amplificadas para aumentar a disponibilidade celular. Isto representa uma fonte considerável de CEM que são atualmente descartadas como resíduos médicos (Hollands *et al.*, 2018). A padronização dos meios de cultura é essencial para a industrialização de tecnologias baseadas nessas células (Zhu e Liang, 2015; Chew *et al.*, 2019).

Recentemente, surge ainda a possibilidade de recorrer às iPSCs que podem ser geradas a partir dos próprios pacientes. Esta é uma abordagem cientificamente interessante, contudo complexa e naturalmente dispendiosa (Tomokiyo *et al.*, 2018). Ainda, o fato das iPSCs terem vindo a ser associadas a oncogénese levanta um desafio significativo à segurança da sua utilização em terapias regenerativas (Han *et al.*, 2014).

Alternativamente, estratégias livres de células, recorrendo a exossomas de CEM, têm vindo a ser desenvolvidas e já testadas com sucesso em modelos animais, apesar da extensão da regeneração global não ser ainda óptima. São ainda necessários mais estudos para otimizar doses óptimas de exossomas, melhores suportes para os exossomas e compreender melhor a evolução da regeneração através de *follow-up* mais longos (Chew *et al.*, 2019).

Contudo, estas estratégias – quer utilizando diretamente as CEM quer os seus exossomas - são particularmente muito importantes para desenvolver novas linhas de investigação, clinicamente relevantes, pois na realidade, uma limitação fundamental a considerar, é o fato dos defeitos periodontais cirurgicamente induzidos em modelos animais, não refletirem,

muito provavelmente a inflamação crônica da periodontite induzida por placa nos humanos. Contudo, muito do conhecimento proporcionado em modelos animais, começa a ser aplicado em ensaios clínicos com resultados muito promissores (Iwata *et al.*, 2018).

IV CONCLUSÃO

As CE estão no centro da investigação científica no âmbito da medicina regenerativa. Já é possível recolher, isolar e cultivar CEM presentes na cavidade oral, expandindo-as, favorecendo assim a sua potencial utilização.

São já inúmeras as evidências do potencial das CEM na regeneração do periodonto, recorrendo quer diretamente às células quer aos seus exossomas – procedimentos inicialmente explorados em modelos animais e mais recentemente, com algum sucesso, também aplicados a humanos com periodontite crônica.

É muito provável que nos próximos anos, a medicina dentária seja capaz de oferecer mais tratamento regenerativos para estruturas até hoje consideradas irreversivelmente comprometidas, como o osso, gengiva, ligamento periodontal (ou mesmo até, um gérmen dentário com potencial de evolução e desenvolvimento como um gérmen dentário normal). Isso amplificaria substancialmente o leque de opções terapêuticas disponíveis na prática clínica, eventualmente mais adequadas para cada indivíduo.

A profissão de médico dentista, como todas as profissões médicas, evolui continuamente de acordo com o progresso técnico-científico – é por isso particularmente importante manter uma atitude crítica e informada relativa a tal progresso de forma a proporcionar aos pacientes as melhores abordagens terapêuticas.

V BIBLIOGRAFIA

- Alves, L.B., Lins, R.D.A.U e Barboza, C.A.G. (2010). Identificação de células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal e perspectivas na regeneração periodontal: Revisão de literatura, *Odontol. Clín.-Cient.*, 9(1), pp. 7-12.
- Aydin, S. e Şahin, F. (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues, *Adv Exp Med Biol*, pp. 123-132.
- Bacakova, L. *et al.* (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review, *Biotechnology Advances*, 36(3), pp. 1111-1126.
- Bakopoulou, A. *et al.* (2011). Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP), *Archives of oral biology*, 56(7), pp. 709-21.
- Chen, S.C. *et al.* (2006). Location of putative stem cells in human periodontal ligament, *Journal of Periodontal Research*, 41(6), pp. 547-53.
- Chew, J.R.J. *et al.* (2019). Mesenchymal stem cell exosomes enhance periodontal ligament cell functions and promote periodontal regeneration, *Acta Biomaterialia*, 89, pp. 252-264.
- Cordeiro, M.M. *et al.* (2008). Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth, *JOE*, 34(8), pp. 962-9.
- D'Aquino, R. *et al.* (2011). Human Neural Crest-Derived Postnatal Cells Exhibit Remarkable Embryonic Attributes Either *in vitro* OR *in vivo*, *European Cells and Materials*, 21(3), pp. 304-316.
- Delorme, B. *et al.* (2009). Specific Lineage-Priming of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Provides the Molecular Framework for Their Plasticity, *Stem Cells*, 27(5), pp. 1142-1151.
- Gay, I.C., Chen, S. e MacDougall, M. (2007). Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells, *Orthod Craniofacial Res*, 10(3), pp. 149-60.
- Govindasamy, V. *et al.* (2010). Inherent Differential Propensity of Dental Pulp Stem Cells Derived from Human Deciduous and Permanent Teeth, *JOE*, 36(9), pp. 1504-15.
- Gronthos, S. *et al.* (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl acad Sci U S A*, 97(25), pp. 13625-13630.
- Gronthos, S. *et al.* (2002). Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells, *J Dent Res*, 81(8), pp. 531-535.
- Han, J. *et al.* (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration, *Australian Dental Journal*,

59(1), pp. 117-130.

Hegedus, Z. (1923). The rebuilding of the alveolar processes by bone transplantation, *Dental Cosmos*.

Herrero, C. e Pérez-Simón, J.A. (2010). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells, *The Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(5), pp. 409-521.

Hollands, P., Aboyeji, D. e Orcharton, M. (2018). Dental pulp stem cells in regenerative medicine, *British Dental Journal*, 9(10), pp. 1371.

Huang, G.T.J., Gronthos, S. e Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative Medicine, *J Dent Res*, 88(9), pp. 792-806.

Iwata, T. *et al.* (2015). Cell sheet engineering and its application for periodontal regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(4), pp. 343-356.

Iwata, T. *et al.* (2018). Periodontal regeneration with autologous periodontal ligament-derived cell sheets – A safety and efficacy study in ten patients, *Regenerative Therapy*, 9(12), pp. 38-44.

Jayakumar, A. *et al.* (2010). Horizontal alveolar bone loss: a periodontal orphan, *J Indian Soc Periodontol*, 14(3), pp.181-185.

Kawai, T. *et al.* (2015). Secretomes from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells enhance periodontal tissue regeneration, *Cytotherapy*, 17(4), pp. 369-381.

Kémoun, P. *et al.* (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro, *Cell Tissue Res*, 329(2), pp. 283-94.

Kerkis, I. *et al.* (2006). Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers, *Cells Tissues Organs*, 184(3-4), pp. 105-16.

Lee, S.Y. *et al.* (2010). Effects of Cryopreservation of Intact Teeth on the Isolated Dental Pulp Stem Cells, *JOE*, 36(8), pp. 1336-40.

Li, H. e Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals, *Science*, 29(1), pp. 542-545.

Maartens, A. (2017). An interview with John Gurdon, *The Company of Biologists*, 144(9), pp. 1581-1583.

Martinez Saez, D. *et al.* (2016). Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth: A Growing Literature, *Cells Tissues Organs*, 202(5-6), pp. 269-280.

Miura, M. *et al.* (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *Proc Natl acad Sci U S A*, 100(10), pp. 5807-12.

- Morszeck, C. *et al.* (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth, *Matrix Biology*, 24(2), pp. 155-65.
- Morszeck, C. *et al.* (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry, *Clin Oral Invest*, 12(2), pp. 113-8.
- Muschler, G.F., Nakamoto, C. e Griffith, L.G. (2004). Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering, *J Bone Joint Surg Am.*, 86(7), pp. 1541-1558.
- Nada, O.A. e El Backly, R.M. (2018). Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration, *frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 103(6), pp. 10.
- Orsini, G., Pagella, P. e Mitsiadis, T.A. (2018). Modern Trends in Dental Medicine : An Update for Internists, *The American Journal Of Medicine*, 131(12), pp. 1425-1430.
- Petrovic, V. e Stefanovic, V. (2009). Dental Tissue – New Source for Stem Cells, *TheScientificWorldJournal*, 9, pp. 1167-1177.
- Rostovskaya, M., Stirparo G.G. e Smith A. (2019). Capacitation of human naïve pluripotent stem cells for multi-lineage differentiation, *The Company of Biologists*, 146(7), pp. 1242.
- Sakaguchi, K. *et al.* (2017). Periodontal tissue regeneration using the cytokine cocktail mimicking secretomes in the conditioned media from human mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 484(1), pp. 100-106.
- Seo, B.M. *et al.* (2008). SHED repair critical-size calvarial defects in mice, *Oral Dis.*, 14(5), pp. 428-34.
- Seo, B.M. *et al.* (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet*, 364(10), pp. 149-55.
- 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*, 18(4), pp. 696-704.
- Sonoyama, W. *et al.* (2008). Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth – A Pilot Study, *J Endod*, 34(2), pp. 162-171.
- Sonoyama, W. *et al.* (2006). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine, *PLoS One*, 1(12), pp. 79.
- Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*, 126(4), pp. 663-73.
- Tassi, S.A. *et al.* (2017). Efficacy of stem cells on periodontal regeneration : Systematic review of pre-clinical studies, *Journal of Periodontal Research*, 52(5), pp. 793-812.
- Telles, P. D. *et al.* (2010). Pulp tissue from primary teeth: new source of stem cells, *J Appl Oral Sci.*, 19(3), pp.

189-94.

Tomokiyo, A. *et al.* (2018). Detection Characterization, and Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells in Periodontal Ligament Tissue, *Stem Cells Int.*, pp 9.

Tucker, A. e Sharpe, P. (2004). The Cutting-Edge Of Mammalian Development ; How the Embryo Makes Teeth, *Nature Reviews*, 5(7), pp. 499-508.

Wagers, A.J. e Weissman, I.L. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells, *Cell Press*, 116(5), pp. 639-48.

Yamada, N. *et al.* (1990). Thermo- responsive polymeric surfaces; control of attachment and detachment of cultured cells, *Makromol Chem Rapid Commun*, 11.

Yang, X. *et al.* (2018). Recycle the dental fairy's package: overview of dental pulp stem cells, *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), pp. 347.

Yang, X. *et al.* (2019). Stem cells from human exfoliated deciduous teeth as an alternative cell source in bio-root regeneration, *Theranostics*, 9(9), pp. 2694-2711.

Zhu, W. e Liang, M. (2015). Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects, *Stem Cells International*, pp. 11.