

APLICAÇÕES DA BIOENGENHARIA EM MEDICINA DENTÁRIA

Alexandre Arribança

Licenciado em Medicina Dentária
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP

Inês Lopes Cardoso

Professora Associada
Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
mic@ufp.edu.pt

COMO REFERENCIAR ESTE ARTIGO: ARRIBANÇA, Alexandra ; CARDOSO, Inês Lopes - Aplicações da bioengenharia em medicina dentária. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto : Edições Universidade Fernando Pessoa. ISSN 1646-0480. 6 (2009) 40-49.

RESUMO

A engenharia de tecidos é um novo campo da medicina que tenta criar tecidos e órgãos funcionais que serão usados em caso de lesão. Devido à relativa simplicidade e grande potencial, a medicina dentária é um dos primeiros candidatos a esta tecnologia. A dentística e a endodontia parecem ser duas áreas com grande potencial. O desenvolvimento de novos materiais e de novos protocolos clínicos poderá tornar obsoletos os actualmente usados.

PALAVRAS-CHAVE

Células estaminais, dentina, esmalte, dentes naturais

ABSTRACT

Tissue engineering is a new field of medicine, which tries to create healthy as well as functional tissues and organs to replace injured ones. Due to its simplicity and its profit potential, dentistry is one of the preferential candidates for this technology. Dentistics and endodontics seem to be areas with great potential. New materials and clinical protocols development may cause the current state of affairs to become obsolete.

KEYWORDS

Stem cells, dentin, enamel, natural teeth

1. INTRODUÇÃO

A Bioengenharia define-se como o estudo da fisiologia e estrutura tecidular com o objectivo de regenerar tecidos danificados por tumores, outras patologias ou trauma (Nakashima, 2005). O corpo humano tem uma espantosa capacidade de regeneração. Células de tecidos como sangue e epitélio, dividem-se rapidamente e são regeneradas continuamente durante toda a vida, enquanto que as células da maioria dos outros tecidos têm um *turn-over* celular mais lento respondendo a sinais biológicos específicos (Krebsbach et al., 2002). Esta capacidade de regeneração dos tecidos é conferida pelas células estaminais pós-natais, que têm capacidade de divisão, proliferação e diferenciação (Harada et al., 1999; Bluteau et al., 2008; Honda et al., 2008). Células estaminais embrionárias e adultas têm sido sujeitas a profundas investigações para o desenvolvimento *in vitro* de novos órgãos como cabelo, pele e osso. As células estaminais adultas, que possuem um restrito potencial de diferenciação, podem facilmente ser isoladas a partir de um paciente e, após amplificação *in vitro* e/ou diferenciação poderiam ser re-injectadas no mesmo paciente evitando rejeição.

Alguns investigadores, devido à complexidade da bioengenharia de órgãos, consideraram que a medicina dentária seria a melhor área para começar investigações relacionadas com bioengenharia de órgãos vitais (Silva et al., 2004), uma vez que as características de barreira de dentina reparativa/regenerativa constituem uma melhor protecção para a polpa comparativamente a material artificial, e devido à dependência da prática clínica dentária em materiais de restauração, que na sua maioria não têm as mesmas características físicas e químicas que a dentina (Nakashima, 2005; Silva et al., 2004; Bluteau et al., 2008; Honda et al., 2008).

O grande potencial da engenharia de tecidos é o tratamento de cárie dentária através do desenvolvimento de técnicas de regeneração tecidular (pulpar ou dentinária) (Kaigler et al., 2001; Bluteau et al., 2008). Outra perspectiva a longo prazo seria a colaboração entre engenheiros genéticos e médicos dentistas na reabilitação oral de pacientes (Silva et al., 2004; Bluteau et al., 2008).

2. BIOENGENHARIA EM MEDICINA DENTÁRIA

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar em expansão com elevado potencial para o desenvolvimento de tecidos e órgãos de modo a recuperar a sua função ou mesmo substituí-los. Os princípios da embriogénese dentária têm vindo a ser usados para o desenvolvimento de métodos de reconstruir estruturas dentárias e craniofaciais ou mesmo para a formação de dentes que possam ser usados para substituir peças dentárias em humanos.

Uma vez que a formação do dente resulta de interacções epitélio-mesênquima, duas distintas populações de células embrionárias devem ser tidas em conta: células estaminais epiteliais que darão origem a ameloblastos, células estaminais de mesênquima que darão origem a odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos de ligamento periodontal (Bluteau et al., 2008).

Assim, a bioengenharia de dentes através da utilização de células estaminais baseia-se no isolamento e cultura em condições *in vitro* ou *ex vivo* para o desenvolvimento da morfogénese do dente e em seguida a diferenciação celular em células específicas de dentes que irão dar origem a dentina, esmalte, cimento e osso alveolar.

2.1. BIOENGENHARIA DE TECIDOS DENTÁRIOS

A cultura de células da polpa dentária, extraídas de terceiros molares imaturos, levou à produção de fibras de colagénio tipo I seguida de início da deposição mineral. Durante 8 semanas a formação de fibras e deposição de minerais foi contínua. As células contíguas à estrutura mineralizada apresentavam uma estrutura polarizada, tal como aquela observada *in vivo*, apesar de não se observar a formação de túbulos dentinários. Só foram obtidos estes resultados em culturas tratadas com β -glicerofosfato (About et al., 2000). As células desta cultura para além de expressarem colagénio tipo I, também expressavam osteonectina e nestina. Análise em espectrofotómetro revela que, quer a composição mineral quer a orgânica têm características semelhantes à da dentina (About et al., 2000).

Outros autores (Batouli et al 2003, Gronthos et al. 2002) transplantaram para o dorso de ratinhos imunocomprometidos uma mistura de células estaminais da polpa dentária (DPSC), hidroxiapatite (HA) e fosfato tricálcico. Após quatro semanas observou-se a diferenciação destas células em odontoblastos e produção de dentina reparativa. Mais ainda, observou-se a formação de polpa dentária e a existência de vasos e tecido conjuntivo, onde se encontraram nichos de células estaminais que não se diferenciaram. Após 16 semanas de transplante ainda existia a capacidade de produzir dentina. Para além de serem capazes de produzir um complexo pulpo-dentinário, estas células também eram capazes de induzir as células do hospedeiro a participar no processo reparativo/produutivo (Batouli et al., 2003). Gronthos et al (2002) observaram a formação de dentina similar à dentina primária (figura 1). Após análise dos odontoblastos existentes, concluíram que 85% são originários das células transplantadas e 15% do hospedeiro. Em 2004, Goldberg demonstrou em ratinhos que moléculas bioactivas presentes na matriz extracelular, induzem a formação de uma ponte de dentina ou uma área mineralizada na polpa coronária. Em estudos recentes (Goldberg et al., 2009) demonstrou-se a formação de dentina reparativa após implantação de moléculas da matriz dentinária extracelular em polpas expostas.

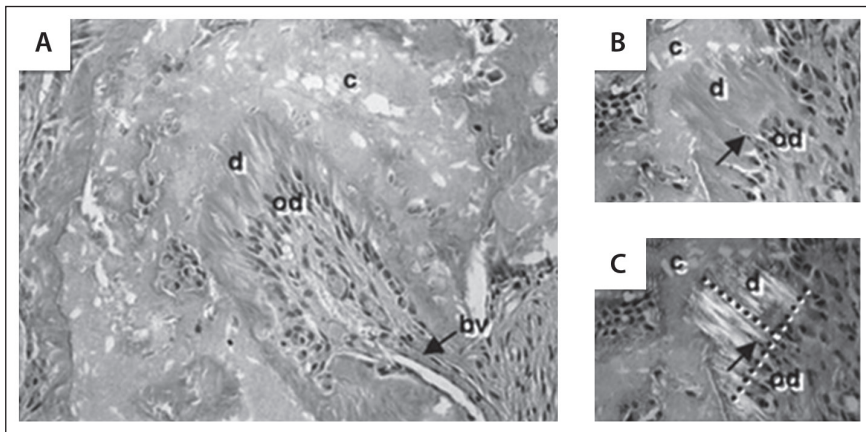


Figura 1. Corte sagital de transplantes de DPSC 6 semanas pós-transplante. A) Observa-se a estrutura de HA/TCP (c) circundada por uma área de dentina (d) seguida de uma camada de odontoblastos (od) na zona pulpar onde também se observam vasos sanguíneos (bv). B) Visão ampliada da matriz dentinária onde se observam os processos odontoblasticos (setas). C) luz polarizada mostra a perpendicularidade entre odontoblastos e a fibras de colagénio da dentina (Adaptado de Gronthos et al., 2000).

O uso de células estaminais parece ainda ser promissor no tratamento da doença periodontal. Kramer et al. (2004) conduziram estudos para determinar o potencial das células estaminais de mesênquima e células progenitoras do tecido do ligamento periodontal, para produzir diferentes tipos de tecidos orais assim como a possibilidade de reparar lesões causadas por doenças orais. Neste estudo demonstraram o desenvolvimento de tecido semelhante a ligamento periodontal a partir das células testadas. Num estudo piloto de Marei et al. (2009) foram utilizadas células estaminais de mesênquima de medula óssea numa tentativa de regeneração de tecido periodontal junto a implantes dentários. Este estudo permitiu a formação experimental de estruturas periodontais rodeando implantes de titânio em cabras.

O epitélio do órgão do esmalte só permanece como camada protectora do esmalte até à erupção dentária. Por esta razão, em contraste com a dentina, o esmalte não regenera após trauma. Mesmo assim, algumas células epiteliais poderão ter a capacidade de se diferenciarem em ameloblastos, como em certos animais (ratinhos), que apresentam reservatórios de células estaminais epiteliais como forma de substituir dentes perdidos. Thesleff et al. (2003) consideram que o estudo do processo de diferenciação do epitélio dentário poderá levar a soluções para a regeneração do esmalte. Uma nova estratégia para a bioengenharia de tecido de esmalte *in vitro* foi utilizada por Honda et al. (2009). Neste estudo foram cultivadas células do epitélio de esmalte, isoladas a partir de esmalte. Estas células em cultura retêm a capacidade de produzir estruturas de esmalte. Estas células foram colocadas sobre uma esponja de colagénio, juntamente com células primárias de polpa dentária, isoladas na fase inicial de formação da coroa, e estas construções foram transplantadas para ratos. Após 4 semanas foram detectadas nos implantes, estruturas complexas de esmalte-dentina. Este estudo demonstra a possibilidade de produzir esmalte *in vivo*. Um outro estudo (Wang et al., 2009) explorou o crescimento directo de estruturas humanas semelhantes a esmalte em dentes humanos, através da utilização de pastas de fluoroapatite/ácido fosfórico.

2.2. BIOENGENHARIA DE DENTES

Têm sido referenciados dois nichos diferentes de células estaminais para a bioengenharia de dentes: a ansa cervical de incisivos de roedores para as células estaminais epiteliais (Harada et al., 1999; Mitsiadis et al., 2007) e o nicho perivascular na polpa dentária adulta para as células estaminais de mesênquima (Shi e Gronthos, 2003). Para além destas últimas, outras populações de células estaminais de mesênquima foram já isoladas de tecidos dentários humanos como por exemplo o ligamento periodontal (Seo et al., 2004, 2005) e o fóliculo dentário (Morsczeck et al., 2005) não se sabendo da existência de nichos nestes tecidos.

Usando células estaminais do epitélio recolhidas de germens dentários de terceiros molares de porco na fase de botão, Young et al. (2002, 2005) produziram dentes em laboratório. As células foram transplantadas para ratinhos imunocomprometidos num *scaffold* tridimensional em forma de dentes incisivos e molares. O material usado para produzir o *scaffold* foi um copolímero de ácido poliglicólico e ácido poliláctico (PLGA). Após 20 semanas verificou-se a formação de uma estrutura de 2 por 2 mm com forma semelhante à de uma coroa dentária. Foi observada a presença de uma camada de odontoblastos seguidos de uma camada de pré-dentina e outra de dentina mineralizada, não se observando formação de esmalte (Young et al., 2002). Às 25 semanas, observou-se a formação de matriz de esmalte não calcificado (presença de amelogénica na imunofluorescência), adjacente à dentina. Às

30 semanas, observou-se a formação de uma camada de esmalte. Circundando o esmalte existia uma estrutura semelhante ao órgão de esmalte com um retículo estrelado e epitélio do esmalte externo e interno. Adjacente à dentina observou-se a presença de cimentoblastos e de uma camada de cimento (Young et al., 2002).

Em 2004, Duailibi et al. repetiram as experiências descritas, usando dois materiais diferentes para produção do Scaffold 3D - ácido poliglicólico (PGA) e PLGA – e usando células estaminais de duas espécies animais diferentes (rato e porco). Estes autores realizaram para além de análise histológica, uma análise radiográfica que permitiu observar uma estrutura mineralizada com forma semelhante a um dente (Duailibi et al., 2004).

Experiências semelhantes às descritas anteriormente, foram efectuadas com células estaminais retiradas de germens dentários de terceiros molares imaturos. As fases de desenvolvimento destes dentes são semelhantes às da embriogénese dentária, com algumas diferenças, como por exemplo a formação radicular começa ao mesmo tempo que a formação do esmalte. Apesar de se usarem *scaffolds* de PGA, a forma e tamanho dos dentes não é previsível (Honda et al., 2005).

Ohazama et al. (2004) sujeitaram diferentes populações de células estaminais ao estímulo do epitélio oral da fase embrionária E 10. As populações de células estaminais usadas foram células estaminais embrionárias, células estaminais neurais e células estaminais da medula óssea (BMSCs). Após 3 semanas todas as populações expressavam marcadores exclusivos do mesênquima odontogénico. Após transplante para cápsulas renais de ratinhos imunossuprimidos, foi observada a formação de coroas dentárias associadas a tecido ósseo e mucosa em todas as populações celulares usadas. Este estudo prova que, nem só as DPSCs têm capacidade de formar tecido dentário, mas também outras populações de células estaminais, quando estimuladas pelo epitélio oral embrionário (Ohazama et al., 2004).

No estudo de Young et al. (2005) foram criados tecidos híbridos dente-osso. Na interface dos tecidos dentário e ósseo produzidos estavam presentes: tecido conjuntivo positivo para colagénio tipo III semelhante a ligamento periodontal, e estruturas de raízes dentárias (Young et al., 2005). Estratégias semelhantes foram usadas em estudos de Honda et al. (2005, 2007) que são bastante promissoras para a formação do dente e regeneração.

Vários autores executaram transplantes de germens dentários para a mandíbula de ratinhos adultos e observaram que os dentes continuavam a desenvolver-se, formando dentes de tamanho normal (Modino et al., 2005; Ohazama et al., 2004). Duailibi et al. (2008) mostraram que células de germens dentários de rato em cultura, colocadas em scaffolds biodegradáveis, implantadas nas mandíbulas de ratos adultos e crescidas durante 12 semanas, formam pequenas e organizadas coroas dentárias, contendo dentina, esmalte, polpa, e tecidos de ligamento periodontal.

De modo a corrigir defeitos da mandíbula, Abukawa et al. (2009) prepararam construções de dentes e osso a partir de tecido dentário de terceiros molares e osteoblastos derivados de medula óssea de porco, que foram implantados no mesmo animal. Após 20 semanas foram identificadas pequenas estruturas dentárias que eram constituídas por dentina organizada, esmalte, polpa, e tecidos de ligamento periodontal, rodeados por novo osso.

2.3. PERSPECTIVAS PARA O FUTURO

Os primórdios dentários, formados *in vitro* através de bioreactores e/ou *in vivo* em modelos animais, podem ser a base para transplante para a boca, onde poderão continuar a desenvolver-se (figura 2).

Células estaminais implantadas num *scaffold* podem ser usadas para produção de um complexo pulpo-dentinário funcional, podendo este ser transplantado para a polpa dentária exposta (figura 3) (Nakashima, 2005).

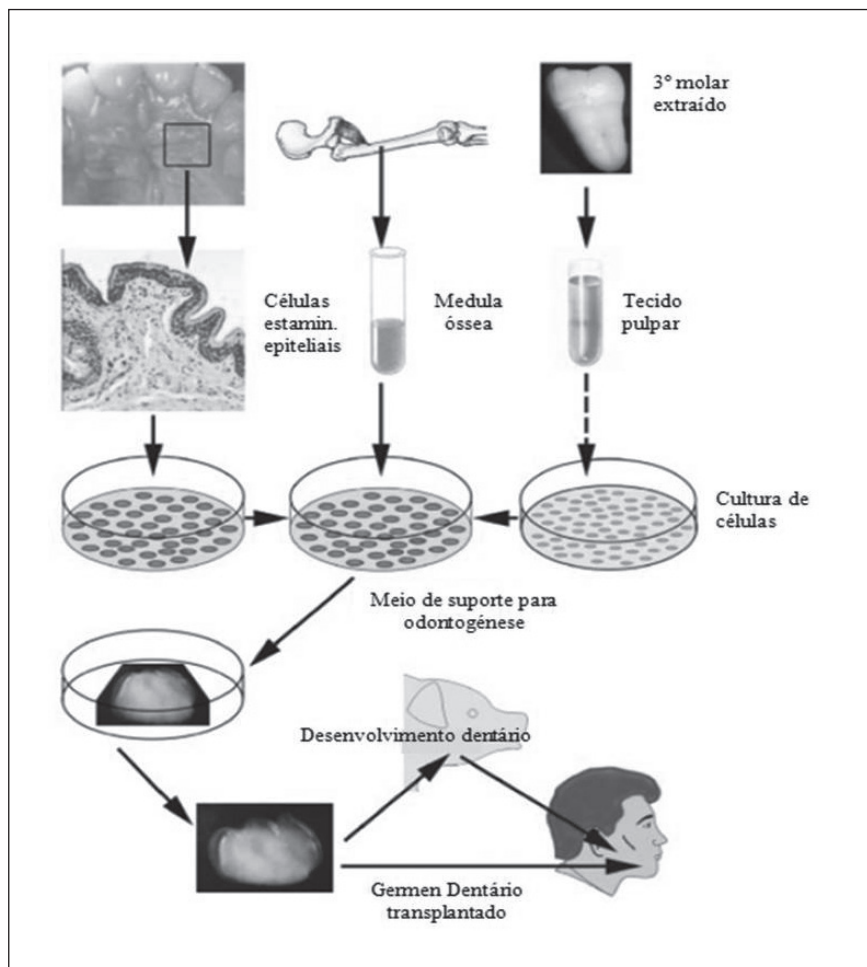


Figura 2. Esquema de possível terapêutica para substituição dentária usando células estaminais. Células estaminais epiteliais podem ser colhidas do palato enquanto que células mesenquimatosas podem ser colhidas da medula óssea ou da polpa dentária. Estas células são multiplicadas *in vitro*. Com uma combinação de células mesenquimatosas e células epiteliais, um germen dentário pode desenvolver-se, com o uso de sinais que são fornecidos, quer através de um bioreactor quer através de um ser vivo. Entre a fase de capuz e campânula transplanta-se o germen para um espaço desdentado. O seu desenvolvimento continua, posteriormente dá-se a erupção dentária e o início de função oclusal. (Adaptado de Chai et al., 2003).

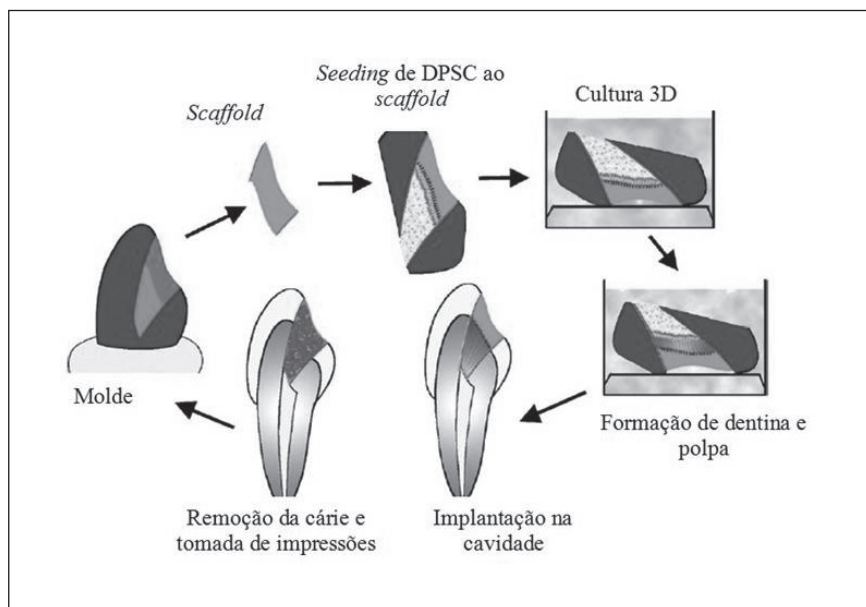


Figura 3. Formação de dentina tubular com orientação e forma pré-determinada para utilização clínica. As células podem ser cultivadas num meio com proteína morfogénica do osso para indução de diferenciação em odontoblastos e formação de dentina tubular *in vivo* para posterior transplante sob polpa exposta. (Adaptado de Nakashima, 2005).

O possível desenvolvimento de células estaminais, universalmente imunocompatíveis, poderá tornar possível a produção em massa de células estaminais, podendo ser uma mais valia para tornar esta tecnologia acessível à prática clínica diária (Nakashima, 2005; Bluteau et al., 2008; Honda et al., 2008).

BIBLIOGRAFIA

- ABOUT I., BOTTERO M. J. ET AL. (2000) Human dentin production *in vitro*. *In: Exp Cell Res*, 258, 1, pp.33-41.
- ABUKAWA H., ZHANG W. ET AL. (2009) Reconstructing mandibular defects using autologous tissue-engineered tooth and bone constructs. *In: J Oral Maxillofac Surg*, 67, 2, pp. 335-347.
- BATOULI S., MIURA M., ET AL. (2003) Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *In: J Dent Res*, 82, 12, pp. 976-981.
- BLUTEAU G, LUDER H-U. ET AL. (2008) Stem Cells for tooth engineering. *In: Eur Cells and Mat*, 16, pp. 1-9.
- CHAI, Y. E SLAVKIN, H.C. (2003) Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *In: Microsc Res Tech*, 60, 5, pp. 469-479.
- DUAILIBI M.T., DUAILIBI S.E. ET AL. (2004) Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. *In: J Dent Res*, 83, 7, pp. 523-528.
- DUAILIBI S.E., DUAILIBI M.T. ET AL. (2008) Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. *In: J Dent Res*, 87, 8, pp. 745-750.
- GOLDBERG M (2004) Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *In: Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 1, pp. 13-27.

- GOLDBERG M., SIX N. ET AL.** (2009) Dentin extracellular matrix molecules implanted into exposed pulps generate reparative dentin: a novel strategy in regenerative dentistry, *In: J Dent Res*, 88, 5, pp. 396-399.
- GRONTHOS S. BRAHIM J. ET AL.** (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells, *In: J Dent Res*, 81, 8, pp. 531-535.
- GRONTHOS S., MANKANI M. ET AL.** (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *In: Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 25, pp. 13625-13630.
- HARADA H., KETTUNEN P. ET AL.** (1999) Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling, *In: J Cell Biol*, 147, 1, pp. 105-120.
- HONDA M.J., FONG H. ET AL.** (2008) Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells, *In: Med Mol Morphol*, 41, 4, pp. 183-192.
- HONDA M.J., SHINMURA Y. ET AL.** (2009) Enamel tissue engineering using subcultured enamel organ epithelial cells in combination with dental pulp cells, *In: Cells Tissues Organs*, 189, 1-4, pp. 261-267.
- HONDA M.J., SUMITA Y. ET AL.** (2005) Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis, *In: Arch Histol Cytol*, 68, 2, pp. 89-101.
- HONDA M.J., TSUCHIYA S. ET AL.** (2007) The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineering tooth regeneration, *In: Biomaterials*, 28, pp. 80-89.
- KAIGLER D. E MOONEY D.** (2001) Tissue engineering's impact on dentistry, *In: J Dent Educ*, 65, 5, pp. 456-462.
- KRAMER P.R., NARES S. ET AL.** (2004) Mesenchymal Stem Cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament *in vitro*, *In: Dent Res*, 83, 1, pp. 27-34.
- KREBSBACH P.H. E ROBEY P.G.** (2002) Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration, *In: J Dent Educ*, 66, 6, pp. 766-773.
- MAREI M.K., SAAD M.M. ET AL.** (2009) Experimental formation of periodontal structure around titanium implants utilizing bone marrow mesenchymal stem cells: a pilot study, *In: J Oral Implantol*, 35, 3, pp. 106-129.
- MITSIADIS T.A., BARRANDOU O. ET AL.** (2007) Stem cell niches in mammals, *In: Exp Cell Res*, 313, pp. 3377-3385.
- MODINO S.A. E SHARPE P.T.** (2005) Tissue engineering of teeth using adult stem cells, *In: Arch Oral Biol*, 50, 2, pp. 255-258.
- MORSZCECK C., GOTZ W. ET AL.** (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth, *In: Matrix Biol*, 24: 155-165.
- NAKASHIMA M.** (2005) Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy, *In: Cytokine Growth Factor Rev*, 16, 3, pp. 369-376.
- OHAZAMA A, MODINO, S.A. ET AL.** (2004) Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth, *In: J Dent Res*, 83, 7, pp. 518-522.
- SEO B.M., MIURA M. ET AL.** (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *In: Lancet*, 364, pp. 149-155.
- SEO B.M., MIURA M. ET AL.** (2005) Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament, *In: J Dent Res*, 84, pp. 907-912.
- SHI S., GRONTHOS S.** (2003) Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp, *In: J Bone Miner Res*, 18, pp. 696-704.
- SILVA A.P., SOUSA N.S. ET AL.** (2004) Medicina Dentária. que futuro! Terceira Dentição Natural, será Possível? *In: STOMA*, 71, pp. 30-33.
- THESLEFF I.** (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis, *In: J Cell Sci*, 116, 9, pp.1647-1648.
- WANG X., XIA C. ET AL.** (2009) Direct growth of human enamel-like calcium phosphate microstructures on human tooth, *In: J Nanosci Nanotechnol*, 9, 2, pp. 1361-1364.

- YOUNG C.S., ABUKAWA H. ET AL.** (2005) Tissue-engineered hybrid tooth and bone, *In: Tissue Eng*, 11, 9-10, pp. 1599-1610.
- YOUNG C.S., TERADA, S. ET AL.** (2002) Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds, *In: J Dent Res*, 81, 10, pp.695-700.