

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**CÉLULAS ESTAMINAIS DE TECIDOS DENTÁRIOS
NA REGENERAÇÃO DENTÁRIA**

Fernanda Manuela Cabral Ramos

MESTRADO INTEGRADO

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**CÉLULAS ESTAMINAIS DE TECIDOS DENTÁRIOS
NA REGENERAÇÃO DENTÁRIA**

Fernanda Manuela Cabral Ramos

Dissertação orientada pelo Professor Doutor Paulo Valejo Coelho

MESTRADO INTEGRADO

2011

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Valejo Coelho pela disponibilidade, sabedoria e todo o apoio prestado durante a orientação desta dissertação.

Aos meus pais por todo o apoio e amor incondicionais, principalmente nesta última etapa da minha vida académica. Mesmo estando longe a vossa presença foi sempre constante. Serão sempre os meus grandes exemplos de responsabilidade, de esforço, de trabalho, de humildade e de carácter.

Ao Rui, o grande amor da minha vida, pela dedicação, ajuda e compreensão incansáveis ao longo deste tempo.

Por último e não menos importante, a todos os meus amigos, os de infância e os da faculdade pelo papel que tiveram no meu crescimento enquanto pessoa. Sem vocês não seria a mesma coisa.

RESUMO

A rápida expansão do conhecimento sobre a biologia da célula estaminal associada à bioengenharia permitiu alcançar metas importantes no que diz respeito ao potencial das células estaminais de origem dentária e à regeneração dos tecidos dentários. Cada vez mais se caminha no sentido de um novo conceito de reabilitação oral baseado na formação tissular por células.

Esta revisão bibliográfica tem por objectivo resumir os avanços médico-científicos que se têm desenvolvido no âmbito do estudo e aplicação clínica das células mesenquimatosas dentárias para regeneração dentária.

As células estaminais mesenquimatosas do estroma medular (BMSCs) ainda são consideradas o “*gold standard*” na regeneração tissular, no entanto recentes pesquisas têm concentrado esforços na procura de novas fontes de células estaminais adultas com potencial de regeneração tão ou melhor que as BMSCs. Uma fonte promissora parecem ser as células mesenquimatosas dentárias (DSCs), que quando aliadas a técnicas de regeneração tissular, tornam mais próxima a realidade de um novo método de reabilitação oral aplicado a humanos.

Há evidências na literatura, apoiadas pelos resultados dos casos apresentados em que as células mesenquimatosas dentárias apresentam vantagens como o seu fácil acesso, uma elevada proliferação, viabilidade e facilidade em serem induzidas a diferenciarem-se em diferentes linhagens celulares. A aplicação destas células na bioengenharia de tecidos dentários ainda se encontra numa fase inicial, existindo muitos desafios no âmbito da medicina regenerativa que precisam ser explorados e ultrapassados.

PALAVRAS-CHAVE: Células estaminais mesenquimatosas, Células estaminais dentárias, Células estaminais, Regeneração dentária, Biodente, Células estaminais mesenquimatosas e Regeneração dentária.

ABSTRACT

The rapid expansion of our knowledge of stem cell biology and bioengineering allowed the achievement of important goals in what concerns dental stem cells potential and dental tissues regeneration. More than ever we are reaching to a new concept of stem cell-based oral rehabilitation.

The objective of this bibliographic review is to resume the medical and scientific progresses that have been developed in the field of mesenchymal stem cell clinical application for dental tissue regeneration.

Bone marrow stromal stem cells (BMSCs) still the tissue regeneration gold standard, but recent studies have been focused in the search of new sources of adult stem cells with equal or better regeneration potential than BMSCs. A promise source seems to be dental mesenchymal stem cells (DSCs) that when associated with tissue engineering methods makes tooth regeneration applied to humans a realistic possibility in the near future.

There is evidence in the literature, supported by the results of the presented cases in which dental stem cells show advantages such as high proliferation rate, easy accessibility, high viability and easy to be induced to distinct cell lineages. Dental stem cells application on dental tissue bioengineering is still at an initial stage with many challenges that need to be overcome.

KEY-WORDS: Mesenchymal stem cells, Dental stem cells, Stem cells, Tooth regeneration, Biotooth, Mesenchymal stem cells & Tooth regeneration.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS E MÉTODOS.....	1
OBJECTIVO.....	2
1. Células estaminais.....	3
1.1 Células mesenquimatosas da medula óssea <i>versus</i> células mesenquimatosas dentárias.....	4
1.1.1 O terceiro molar como fonte de células mesenquimatosas dentárias.....	6
1.2 Células mesenquimatosas dentárias e o seu potencial de diferenciação e regeneração tissular.....	6
1.2.1 Células estaminais da polpa dentária adulta.....	6
1.2.2 Células estaminais de dentes decíduos exfoliados.....	7
1.2.3 Células estaminais do ligamento periodontal.....	8
1.2.4 Células estaminais da papila apical.....	10
1.2.5 Células estaminais do folículo dentário.....	11
1.3 Células estaminais dentárias de origem ectodérmica.....	15
2. Regeneração de um dente.....	15
2.1 Matrizes.....	17
2.2 Factores de crescimento.....	20
2.3 Recriar a odontogénese.....	21
2.3.1 Estudos clínicos utilizando células de origem dentária para regeneração de um dente.....	24
2.4 Desafios actuais na regeneração dentária.....	27
CONCLUSÃO.....	30
BIBLIOGRAFIA.....	31

ABREVIATURAS

hESCs - human Embryonic Stem Cells.

MSCs - Mesenchymal Stem Cells.

BMSCs - Bone Marrow mesenchymal Stem Cells.

DSCs - Dental Stem Cells.

DPSCs - Dental pulp stem cells.

SHEDs - células estaminais de dentes decíduos exfoliados.

PDLSCs - Periodontal Ligament Stem Cells.

SCAPs - Stem Cells of Apical Papilla.

DFPCs - Dental Follicle Precursor Cells.

ABCG2 - ATP-ligand cassette sub-family G member 2.

RT-PCR - Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction.

BMPs - Bone Morphogenetic Proteins.

HA - Hydroxyapatite

TCP - Tricalcic phosphate.

PGA - Polyglycolic Acid.

PLGA - Poly coglycolic Acid copolymer.

GCHT - Gelatin-Chondroitin-Hialuronan Tri-copolymer.

TGF- β - Transforming Growth Factor beta.

FGF - Fibroblast Growth Factor.

Hgs - Hedgehog proteins.

Wnts - Wingless and int-related proteins.

TNF - Tumor Necrosis Factor.

iPS - induced Pluripotent Stem cells.

INTRODUÇÃO

Até muito recentemente era assumido que as células multipotentes adultas estavam comprometidas a linhagens específicas. Contudo, colheitas feitas na medula óssea, tecidos hematopoiéticos, neuronais e de origem mesenquimatosa têm demonstrado ser possível a diferenciação destas células em tipos celulares derivados das várias camadas germinais.

Apesar dos dentes não serem órgãos essenciais à vida e não serem considerados um alvo primordial da medicina regenerativa em comparação por exemplo com doenças cardíacas ou neurodegenerativas, este facto torna os dentes ideais para se testarem terapias baseadas em células. A acessibilidade aos dentes não requer um procedimento cirúrgico muito invasivo e estes contêm populações altamente proliferativas de células estaminais, as quais podem ser facilmente obtidas de dentes naturalmente perdidos ou cirurgicamente extraídos. As células estaminais dentárias podem ser utilizadas para reparação e regeneração dos próprios tecidos dentários, mas mais importante que isso, podem ajudar a desenvolver terapias no combate a doenças que representam um elevado risco de vida.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Critérios para pesquisa: Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados primárias (Quadro 1).
2. Limites da pesquisa: Ensaio clínico, *Meta-Analysis*, Revisões.

Critérios para a Pesquisa		
Pubmed	Base de dados da biblioteca FMDUL e FMUL	Outros
“Mesenchymal stem cells”; “Dental stem cells”; “Células estaminais”; “Tooth Regeneration”; “Biotooth” “Mesenchymal stem cells” & “Tooth Regeneration”	“Mesenchymal stem cells”; “Dental stem cells”; “Células estaminais”; “Tooth Regeneration”; “Biotooth” “Mesenchymal stem cells” & “Tooth Regeneration”	Artigos pesquisados a partir das referências bibliográficas

A Pesquisa foi realizada desde início da base de dados até Junho de 2011

Resultados da pesquisa efectuada

1977 Artigos que se adequavam: 150 Obtidos: 65	Pedidos: 13 Obtidos: 7	Artigos que se adequavam: 60 Obtidos: 35
--	---------------------------------	---

Total de artigos utilizados: 107

Quadro 1 – Critérios e resultados da pesquisa bibliográfica

OBJECTIVO

Esta revisão bibliográfica tem por objectivo resumir os avanços médico-científicos que se têm desenvolvido no âmbito do estudo e aplicação clínica das células mesenquimatosas totipotenciais para regeneração dentária.

1. Células Estaminais

A biologia da célula estaminal tornou-se um importante campo para a compreensão da regeneração tissular e implementação da medicina regenerativa. As células estaminais são células indiferenciadas e capazes de se transformar em células especializadas. Podem ser classificadas em dois grandes grupos: células estaminais embrionárias e células estaminais somáticas/adultas. Dependendo do seu tipo e sob certas condições, estas células indiferenciadas podem ser totipotentes (células que são capazes de se diferenciar em todos os 216 tecidos que formam o corpo humano, incluindo a placenta e anexos embrionários. São encontradas nos embriões nas primeiras fases de divisão, isto é, quando o embrião tem até 16 - 32 células, que corresponde a 3 ou 4 dias de vida), pluripotentes ou multipotentes (capazes de se diferenciarem em quase todos os tecidos humanos, excluindo a placenta e anexos embrionários, ou seja, a partir de 32 - 64 células, aproximadamente a partir do 5º dia de vida, fase considerada de blastocisto), oligotentes (células que se diferenciam em poucos tecidos) e unipotentes (células que se diferenciam num único tecido). O principal recurso das células estaminais embrionárias (hESCs) é o interior da massa celular nos 5 a 6 dias de existência do blastocisto humano. O uso de hESCs está frequentemente associado a controvérsias éticas, religiosas e políticas (Lee, Hui 2006), o que não se verifica com as células estaminais multipotentes e progenitoras de tecidos adultos, cuja utilização na prática clínica está mais bem pesquisada e documentada (Wakitani, Imoto *et al.*, 2002; Wakitani, Mitsuoka *et al.*, 2004; Wakitani, Nawata *et al.*, 2007). Estas apresentam uma série de características que as tornam candidatas à sua utilização terapêutica: têm capacidade para auto-renovação por um processo de divisão celular assimétrico, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo o seu estado indiferenciado, proporcionando de forma constante a reposição da sua população nos tecidos e dão origem a células progenitoras que têm uma capacidade de auto-renovação limitada e, por definição, situam-se entre a célula estaminal e a célula terminalmente diferenciada (Muschler, Midura 2002; Muschler, Midura *et al.*, 2003; Muschler, Nakamoto *et al.*, 2004); mais interessantes ainda, estas células progenitoras são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares (Bydlowski *et al.*, 2009) derivados dos vários folhetos germinativos, denominando-se esta característica de plasticidade. A plasticidade das células estaminais adultas permanece um tema controverso

devido à escassez de um adequado número de marcadores de diferenciação definitiva, assim como também à falta de protocolos e resultados fiáveis (Yen *et al.*, 2010). As células estaminais não são facilmente identificáveis nos tecidos, para tal os cientistas baseiam-se em propriedades como os marcadores de superfície, ciclos celulares lentos, clonogenicidade, ou estados indiferenciados. Contudo, nenhum destes critérios é específico, excepto a avaliação da capacidade de auto-renovação a qual se baseia no isolamento e transplantação de uma suposta célula estaminal, seguida da sua transplantação em série e reconstituição de um tecido a longo prazo (Bluteau *et al.*, 2008).

1.1 Células mesenquimatosas do estroma medular versus Células mesenquimatosas dentárias

A presença de células estaminais mesenquimatosas no estroma da medula óssea não-hematopoiética (BMSCs) foi primeiro sugerida pelo patologista alemão Julius Clonheim, em 1867, que as descreveu *in vitro* como sendo semelhantes a fibroblastos. Em 1976, Friedstein, na Rússia, identificou as multipotentes BMSCs e descreveu-as como unidades formadoras de colónias de fibroblastos que se diferenciavam numa linhagem osteogénica (Bydlowski *et al.*, 2009). Caplan (1991) e Pittenger *et al.*, (1999) mostraram que estas células podiam sofrer diferenciação osteogénica, condrogénica, e adipogénica em resposta a diferentes sinais bioquímicos. Estas células foram caracterizadas mais tarde por outros investigadores e desde então que populações de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) provenientes de outros tecidos têm sido caracterizadas com base no “*Gold Standard*” estabelecido para as BMSCs (Huang *et al.*, 2009). A medula óssea é ainda considerada a principal fonte de MSCs para terapia celular (Tomar *et al.*, 2010). Porém, a sua maior desvantagem é ter uma baixa produção de MSCs, a qual varia entre 0,001 a 0,01%, havendo assim uma limitação quanto à disponibilidade de células biologicamente competentes e é também relativamente difícil colher um grande volume de medula óssea humana. A quantidade de MSCs neste tecido varia também com a idade, sendo que a medula óssea das crianças contém uma maior concentração destas células do que a de um adulto (Bydlowski *et al.*, 2009). Para se obter sucesso nas aplicações clínicas destas células é fundamental haver um grande número de MSCs funcionalmente competentes que

apresentem fenótipo estável, sendo por isso necessário fazer expansão *in vitro*. As BMSCs têm uma capacidade de auto-renovação, potencial de diferenciação e morfologia altamente variáveis e limitados, exibindo senescência numa cultura *in vitro*, o que as leva a perder as suas características de células estaminais (Bonab *et al.*, 2006).

A procura por MSCs em tecidos específicos conduziu à descoberta nas últimas décadas de uma variedade de células estaminais em todos os órgãos e tecidos do corpo, desde o cordão umbilical, líquido amniótico, fígado, pulmões, pele, músculo esquelético, tecido adiposo, folículos capilares e dentes, sugerindo que os nichos de MSCs não estão limitados à medula óssea (Coppi *et al.*, 2007; Bydlowski *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2010; Tomar *et al.*, 2010). Nichos são microambientes especializados que abrigam populações de células estaminais adultas permitindo que estas se mantenham indiferenciadas e envolvidas por uma matriz extracelular; os nichos são influenciados por factores como a vascularidade e a pressão. A compreensão destes microambientes e da sua regulação é a principal chave para a reprodução dos mesmos e para a engenharia *ex vivo* de um órgão funcional (Bluteau *et al.*, 2008).

As populações de MSCs derivadas de tecido dentário à semelhança de outras, têm capacidade intrínseca de auto-renovação, de diferenciação multipotente e apresentam grandes vantagens, nomeadamente a facilidade de isolamento e a sua capacidade de propagação em cultura (Bydlowski *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Tomar *et al.*, 2010). Estas células são classificadas de acordo com as respectivas regiões anatómicas e são caracterizadas pelos seus marcadores, capacidade de formar colónias e função de regeneração dentária (Huang *et al.*, 2010). O primeiro tipo de células estaminais dentárias foi isolado do tecido pulpar humano, as células estaminais da polpa dentária adulta (DPSCs), na região perivascular da polpa dentária (Bluteau *et al.*, 2008). Subsequentemente mais três tipos foram isolados e caracterizados: células estaminais de dentes decíduos exfoliados (SHEDs), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs), células estaminais da papila apical (SCAPs). Estudos recentes identificaram um outro tipo de células designadas por células estaminais do folículo dentário (DFPCs) (Huang *et al.*, 2009) e indicam que as células mesenquimatosas dentárias (DSCs) têm potencial de regeneração óssea, do ligamento periodontal e possivelmente de um dente completo (Morsczeck *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2010). (Quadro 2)

1.1.1 O terceiro molar como fonte de células mesenquimatosas de origem dentária

Uma das melhores formas de colher células estaminais adultas é a partir de tecidos que à partida seriam descartados. Todos os anos milhões de dentes como os do siso são extraídos por razões terapêuticas. Muitos deles têm a sua estrutura íntegra o que os torna ótimas fontes para colheita deste tipo de células (Figura nº 1) (Techawattanawisal *et al.*, 2007; Volponi *et al.*, 2010). Contudo, os dentes extraídos muitas vezes apresentam lesões de cárie e como estão de certa forma infectados, apresentam um risco de contaminação durante a preparação e cultura de células estaminais, por isso o ideal seria utilizar terceiros molares inclusos que normalmente não apresentam lesões (Ikeda *et al.*, 2006).

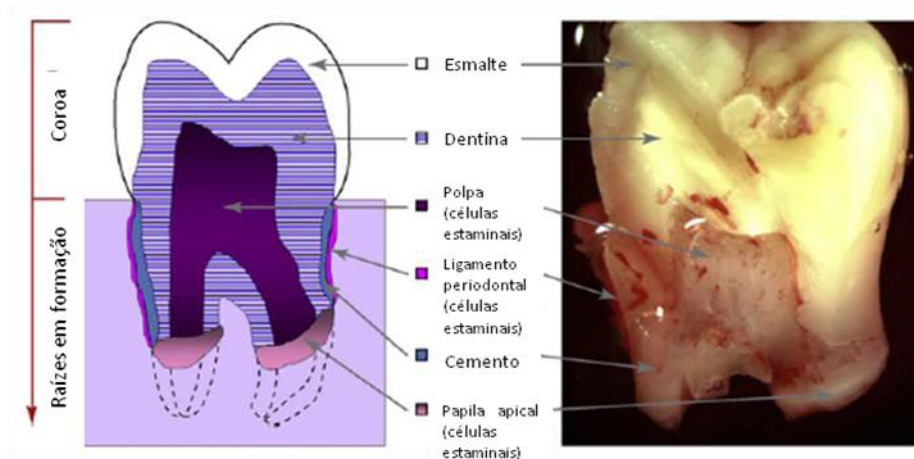


Figura nº 1 – Fotografia e diagrama de um terceiro molar humano após extração. Adaptado de um estudo de Volponi *et al.*, (2010)

1.2 Células mesenquimatosas dentárias e o seu potencial de diferenciação e regeneração tissular

1.2.1 Células estaminais da polpa dentária adulta

A existência de MSCs na polpa dentária foi sugerida através da observação de formação de dentina terciária quando uma lesão cáriosa atinge a polpa, em que ocorre formação de odontoblastos responsáveis pela produção de dentina reparacional (Sveen & Hawes, 1968). Nos anos 90 isolaram-se as primeiras células precursoras da polpa dentária

(Stanislawski *et al.*, 1997). Mais tarde, estas células foram isoladas a partir de terceiros molares e exibiam uma elevada proliferação e capacidade de formação de colónias. Gronthos *et al.*, (2000), utilizaram terceiros molares inclusos humanos extraídos de adultos jovens, para isolar células estaminais das respectivas polpas dentárias a que chamaram DPSCs e compararam-nas às células estaminais do estroma da medula óssea aspiradas a partir de voluntários. Após um processo de digestão enzimática com colagenase tipo I e dispase das polpas dentárias colhidas, foram obtidas suspensões das mesmas e também das células do estroma medular; foram transferidas para meios de cultura e incubadas a 37° em 5% de CO₂. Avaliou-se o potencial de diferenciação destas células *in vitro*. Os resultados mostraram que as DPSCs partilhavam um padrão de expressão proteica semelhante às BMSCs *in vitro*, mas apresentaram uma maior proliferação do que estas últimas. As DPSCs mostraram uma capacidade de se diferenciarem *in vitro* noutros tipos celulares como por exemplo os odontoblastos, osteoblastos ou mesmo células neuronais. A sua transplantação *in vivo* em ratos imunodeficientes associadas a um pó de hidroxiapatite/fosfato tricálcio (HA/TCP) mostrou que estas células originavam um complexo pulpo-dentinário. Mais tarde, num estudo do mesmo autor, Gronthos *et al.*, (2002) verificou que as DPSCs também se poderiam diferenciar em adipócitos *in vitro*. Num estudo *in vivo* de Prescott *et al.*, (2008) verificou-se a formação de um complexo pulpo-dentinário associando DPSCs, uma matriz de colagénio e proteína da matriz da dentina 1 (DMP1). Yang *et al.*, (2009) mostraram num estudo *in vivo* que associando às DPSCs o gene da proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) se podia obter tecido mineralizado mais semelhante a osso do que a dentina.

1.2.2 Células estaminais de dentes decíduos exfoliados

São células isoladas a partir de dentes decíduos exfoliados que têm capacidade dentinogénica, osteoindutora, e de se diferenciarem noutros tipos celulares *in vitro*, como por exemplo adipócitos, condrócitos, miócitos ou mesmo células neuronais (Huang *et al.*, 2009). Tal como as outras MSCs de origem dentária, as SHEDs derivam do ectomesênquima da crista neural, e por isso mesmo todas elas deveriam ter um desenvolvimento e ser funcionalmente idênticas. No entanto, estudos mostraram diferenças genéticas entre elas e consequentemente comportamentos diferentes. Em contraste com as

DPSCs, as SHEDs apresentam taxas de proliferação mais elevadas, duplicação de populações aumentada e capacidade osteoindutora *in vivo*. (Miura *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2009). Cordeiro *et al.*, (2008), através de um estudo *in vivo*, utilizaram terceiros molares recentemente extraídos que foram cortados transversalmente a nível cervical em lâminas com 1mm de espessura, as suas polpas removidas tendo sido implantadas SHEDs previamente preparadas em cultura, e os espécimes foram transplantados subcutaneamente em modelos animais (ratos) imunodeficientes. Os resultados mostraram que o novo tecido formado exibia arquitectura e celularidade muito semelhante à da polpa dentária. Já Miura *et al.*, em 2003, através de um estudo *in vivo* num modelo animal tinham chegado aos mesmos resultados, ou seja, as SHEDs tinham carácter dentinogénico, formando estruturas semelhantes à polpa dentária, mas eram incapazes de formar um complexo pulpo-dentinário completo. Este estudo mostrou também que apesar das SHEDs não terem capacidade de se diferenciar directamente em osteoblastos, têm capacidade osteoindutora recrutando as células osteogénicas do hospedeiro, promovendo a formação de osso. Assim, os dentes decíduos podem não só ser importantes para guiar a erupção dos dentes permanentes subjacentes, mas podem ter um papel relevante na indução da formação óssea durante a erupção dos mesmos. São capazes também de expressar marcadores neuronais como a nestina (Govindasamy *et al.*, 2010).

1.2.3 Células estaminais do ligamento periodontal

A presença de células estaminais mesenquimatosas no ligamento periodontal foi inicialmente proposta por Melcher em 1976 (Alves *et al.*, 2010). Desde então, esse conceito tem sido pesquisado através de vários estudos. Num estudo *in vivo* de Seo *et al.*, (2004) isolaram-se células do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos de humanos e analisaram-nas através da técnica imunohistoquímica, para identificar marcadores de células estaminais. Quando transplantadas em ratos imunodeficientes, as referidas células mostraram a capacidade de formar estruturas como cemento e ligamento e assim contribuir para a reparação dos tecidos periodontais. Em condições de cultura os autores verificaram ainda que houve diferenciação das células em cementoblastos, osteoblastos, adipócitos e fibroblastos. Um estudo do mesmo autor, em 2005, demonstrou que as células estaminais

pós-natais podem ser recuperadas a partir de células criopreservadas do ligamento periodontal, promovendo dessa forma uma acessível prática clínica para a utilização de tecidos criopreservados para isolamento de células estaminais e regeneração tissular. Gronthos *et al.*, (2006) usaram uma estratégia de imunoselecção para purificar as células mesenquimatosas clonogénicas do ligamento periodontal de ovinos, baseada na reactividade ao anticorpo que identifica o CD106 (molécula de adesão celular expressa também pelas células mesenquimatosas da polpa dentária). A positividade para o antígeno CD106 das células do ligamento periodontal de ovinos demonstrou a capacidade destas formarem um agregado de células semelhantes a fibroblastos quando manipuladas em baixa densidade *in vitro*. A expansão *ex-vivo* dessas células exibiu um alto grau de proliferação *in vitro*. Demonstraram também a capacidade de regenerar tecido mineralizado, semelhante ao cimento, como também ligamento periodontal, quando transplantadas em ratos imunodeficientes. Kanawabe *et al.*, (2006), verificaram num estudo *in vitro*, utilizando dentes extraídos por motivos ortodônticos, que 3,9% das células do ligamento periodontal expressavam o marcador ABCG2 característico das células estaminais e que essas células participavam na regeneração periodontal. Leon *et al.*, (2007), realizaram um estudo *in vitro* para examinar o efeito da interleucina-11 na diferenciação osteoblástica das células do ligamento periodontal de humanos. As células do ligamento periodontal cultivadas foram estimuladas com interleucina-11 e/ou ácido ascórbico, com ou sem inibidores do colagénio tipo I. Os autores concluíram que a interleucina-11 e/ou o ácido ascórbico induzem a diferenciação osteoblástica através da produção de colagénio tipo I. Trubiani *et al.*, (2007), verificaram que o ligamento periodontal pode ser fácil e eficientemente uma fonte autóloga de células mesenquimatosas indiferenciadas com uma grande capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células osteogénicas que podem colonizar e crescer em matrizes biocompatíveis. Coura (2008), através de um estudo *in vitro* verificou que o ligamento periodontal humano em adição a derivados mesodérmicos produz células semelhantes às células da crista neural.

1.2.4 Células estaminais da papila apical

A papila apical refere-se ao tecido mole presente nos apéxes de dentes permanentes em desenvolvimento, fazendo com que o isolamento destas células só possa ser feito até determinada fase do desenvolvimento dentário (Sonoyama *et al.*, 2006). A polpa dentária distingue-se da papila apical por esta ser a precursora da polpa radicular. Assim, seria de esperar que as células estaminais da papila apical fossem semelhantes às células estaminais da polpa dentária que originam a dentina coronária produtora de odontoblastos (Huang *et al.*, 2009). As SCAPs parecem ser a fonte dos odontoblastos responsáveis pela formação da dentina radicular, enquanto as DPSCs são responsáveis pela substituição dos odontoblastos que formam a dentina reparacional (Huang *et al.*, 2008). De facto, até hoje não está esclarecido se as SCAPs se convertem em DPSCs ou se estas últimas derivam de um outro nicho de células estaminais. De um modo geral, as SCAPs derivam de um tecido em desenvolvimento que pode representar uma população de células estaminais iniciais as quais podem ser uma fonte major de células para regeneração tissular, uma vez que possuem uma maior capacidade de regeneração dentinária do que as DPSCs por conterem um maior número de células estaminais do que a polpa adulta; são também menos diferenciadas do que as células estaminais da polpa dentária adulta, por se originarem a partir de um tecido do tipo embrionário (Sonoyama *et al.*, 2006). Além disso, estas células realçam o facto dos tecidos em desenvolvimento conterem células com características diferentes daquelas presentes nos tecidos adultos (Huang *et al.*, 2009).

In vitro, as células estaminais da papila apical podem sofrer diferenciação odontogénica (Kikuchi *et al.*, 2004; Sonoyama *et al.*, 2006; Bakopoulou *et al.*, 2010; Ulmer *et al.*, 2010), osteogénica (Sonoyama *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2009; Bakopoulou *et al.*, 2010; Ulmer *et al.*, 2010), adipogénica e neurogénica (Sonoyama *et al.*, 2006; Bakopoulou *et al.*, 2010; Ulmer *et al.*, 2010). Num estudo de Sonoyama *et al.*, em 2006, identificaram estas células e cultivaram-nas, verificando que se formaram cerca de 50 colónias a partir de 10^5 células. Esta população celular mostrou uma elevada taxa de absorção para a bromodeoxiuridina (indicador de proliferação celular), exibindo mais de 70 populações duplicadas *in vitro*. Quando estimuladas com dexametasona complementada com L-ascorbato-2-fosfato e fosfato inorgânico, as células da papila apical podem sofrer diferenciação odontogénica.

Num estudo *in vitro* de Bakopoulou *et al.*, (2010), comparou-se o potencial de diferenciação osteogénico/odontogénico entre DPSCs e as SCAPs. As células foram colhidas a partir de terceiros molares inclusos (fase de desenvolvimento radicular) de jovens saudáveis, cultivadas e induzidas pela dexametasona, KH₂PO₄ e β-glicerofosfato a sofrerem diferenciação osteo/odontogénica. As culturas foram então analisadas quanto à morfologia celular, características de crescimento, potencial de mineralização (método do Vermelho de Alizarina) e quanto aos marcadores de diferenciação (sialofosfoproteína da dentina, sialoproteína óssea, osteocalcina e fosfatase alcalina) usando imunocitoquímica e a técnica da reacção da transcriptase reversa seguida da reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR). Os resultados obtidos mostraram que quer as células estaminais da polpa dentária, quer as da papila apical tinham potencial de migração, organização e mineralização, produzindo estruturas mineralizadas tridimensionais. Contudo, as SCAPs mostraram uma taxa de proliferação e potencial de mineralização significativamente mais elevados do que as DPSCs, o que pode ser uma vantagem para a engenharia tissular no que diz respeito a regeneração dentária.

In vivo podem diferenciar-se em osteoblastos (Ikeda *et al.*, 2006; Sonoyama *et al.*, 2006; Sonoyama *et al.*, 2008) e originar um complexo pulpo-dentinário quando transplantadas em ratos imunodeficientes usando uma matriz osteocondutora de HA/TCP (Sonoyama *et al.*, 2006; Sonoyama *et al.*, 2008).

1.2.5 Células estaminais do folículo dentário

O folículo dentário é um tecido com origem no ectomesênquima que envolve o órgão do esmalte e papila dentária do dente em desenvolvimento antes e durante a sua erupção, ou seja, é o saco embrionário do gérmen dentário. Tem a importante função de coordenar a erupção dentária, regulando a osteoclastogénese e osteogénese, (Slater, 2000; Wise *et al.*, 2002). A sua diferenciação celular é induzida pela bainha epitelial de Hertwig formada durante o desenvolvimento radicular e mediada por uma rede de moléculas reguladoras incluindo factores de crescimento e citoquinas (Saygin *et al.*, 2000; Diekwisch, 2001; Zeichner-David *et al.*, 2003). O folículo dentário humano durante a fase de formação radicular contém células progenitoras que *in vitro* originam estruturas semelhantes aos

tecidos periodontais (cimento, ligamento periodontal, osso alveolar) (Bosshardt & Shroeder, 1996; Chai *et al.*, 2000; Cho & Garant, 2000; Morszeck *et al.*, 2005). O mesmo se aplica aos folículos dentários de ratos na fase de formação radicular (Yao *et al.*, 2008). Pensa-se que as DFPCs internas, ou seja, próximas da raiz em formação se diferenciem em cementoblastos, e que as DFPCs externas, ou próximas do osso alveolar se diferenciem em osteoblastos formadores da matriz osteóide; as DFPCs que se encontram entre estas duas últimas descritas originam os fibroblastos que segregam a matriz extracelular do ligamento periodontal (Bosshardt & Shroeder, 1996). Apesar de um estudo sugerir que os cementoblastos provêm da bainha epitelial de Hertwig (Zeichner-David *et al.*, 2003) outra investigação mostrou que estes provêm das DFPCs (Diekwisch, 2001).

Yagyuu *et al.*, (2010), avaliaram *in vitro* e *in vivo* o potencial de formação de tecido mineralizado das DFPCs em comparação com as células estaminais da papila dentária em humanos. Utilizaram gérmenes dentários de terceiros molares de pacientes jovens durante a fase de formação coronária, extraídos por motivos ortodônticos. Os tecidos dos gérmenes foram separados em folículos dentários e papilas dentárias. Os tecidos foram sujeitos a digestão enzimática pela colagenase, centrifugados e mantidos em suspensão. Uma parte dessa suspensão foi transferida para a primeira cultura. Quando as células atingiram uma confluência de 80-90% foram separadas com tripsina e EDTA-4Na. As células tripsinizadas foram utilizadas para análise das suas superfícies ou foram novamente transferidas para uma segunda cultura; atingindo uma confluência de 80-90%, foram novamente sujeitas à acção da tripsina e mantidas em suspensão; 1ml dessa suspensão foi criopreservado a -80°C. As células criopreservadas foram então utilizadas para avaliar a sua capacidade de proliferação, os antigénios de superfície, e a capacidade de formar tecido mineralizado.

Para a avaliação *in vitro*, parte dessas células foram utilizadas em cultura associada a um meio de indução composto por dexametasona, β -glicerofosfato, L-ácido ascórbico, 2-magnésio de fosfato n-hidratado. Foi utilizada uma outra cultura para controlo sem meio de indução. Ao fim de duas semanas, observou-se mineralização através do Vermelho de Alizarina e o método de fluorescência com calceína mostrou uma maior mineralização na cultura com meio de indução do que na de controlo.

Para a avaliação *in vivo*, parte das células criopreservadas foram combinadas com discos de hidroxiapatite (HÁ) e transplantadas subcutaneamente para ratos

imunodeficientes durante oito semanas. Recorreu-se igualmente a um grupo de controlo transplantando discos de HA sem células em ratos imunodeficientes. Ambos os transplantes de células precursoras do folículo dentário e da papila dentária foram seccionados para avaliação histológica e mostraram formação de tecido mineralizado na superfície dos discos de HA. Tecido esse semelhante a cimento ou osso, não se conseguindo determinar com exactidão se se tratava de dentina, osso ou cimento. No grupo de controlo não se observou qualquer mineralização.

Ambos os tipos celulares (células do folículo e da papila) mostraram uma grande capacidade de proliferação, expressaram antigénios semelhantes e foram capazes de formar tecido mineralizado *in vitro* e *in vivo*. Contudo, detectaram-se duas diferenças, a primeira é que as células da papila apresentaram uma acumulação de cálcio mais elevada do que as do folículo e isto pode ser explicado pelo estágio de desenvolvimento dentário em que se encontravam os espécimes, pois numa fase de formação coronária, existem áreas de mineralização já detectáveis nas células da papila (dentinogénese), o que não acontece nas do folículo responsáveis pela cementogénese. A segunda diferença é que as células do folículo expressaram um marcador cementoblástico e as células da papila um marcador odontoblástico. Este estudo permite-nos concluir que estas células têm realmente potencial de mineralização, no entanto presume-se que estes dois tecidos (folículo dentário e papila dentária) contêm diferentes tipos de células estaminais, direccionadas para a linhagem cementoblástica e para a linhagem odontoblástica respectivamente.

In vitro, as DFPCs podem diferenciar-se em células semelhantes a osteoblastos e cementoblastos sob estimulação da dexametasona e insulina (Morsczeck *et al.*, 2006); osteoblastos, cementoblastos (Seo *et al.*, 2004; Morsczeck *et al.*, 2005; Trubiani *et al.*, 2008); osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos, condrócitos e adipócitos sob estimulação da BMP-2 e BMP-7 e derivados da matriz do esmalte (Kémoun *et al.*, 2007); osteoblastos, cementoblastos, adipócitos e células neuronais (Yao *et al.*, 2008); Morsczeck *et al.*, (2009) obtiveram o primeiro transcriptoma humano de DFPCs antes e depois da diferenciação osteogénica. Isolaram-se e transferiram-se para cultura estas células num meio indutivo composto por dexametasona; a análise genética mostrou que factores de transcrição específicos dos osteoblastos como o Osterix e Runx2 eram expressos pelas DFPCs diferenciadas.

Honda *et al.*, (2010), pretenderam avaliar o potencial de diferenciação destas células *in vitro* e o seu potencial osteogénico *in vivo*, utilizando três terceiros molares inclusos extraídos a três pacientes jovens por motivos ortodônticos. Isolaram as DFPCs e realizaram culturas obtendo três populações distintas em termos de morfologia, padrões de expressão genética e capacidade de diferenciação. Foram transferidas para culturas e submetidas a meios de indução osteogénico, adipogénico e condrogénico, sendo que não houve diferenciação em condrócitos. Todas as três populações promoveram a formação de osso quando transplantadas em defeitos ósseos criados cirurgicamente (periósteo previamente removido) em ratos imunodeficientes em comparação com um grupo controlo em que não foram transplantadas células.

Tipos de células mesenquimatosas dentárias

Propriedades	DPSC	SCAP	SHED	PDLSC	DFPC
Localização	Polpa dentária adulta	Papila apical da raiz em formação	Polpa dentária de dentes decíduos exfoliados	Ligamento periodontal	Folículo dentário do dente em desenvolvimento
Proliferação	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
Heterogeneidade	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Multipotencialidade	Odontoblasto, osteoblasto, condrócito, miócito, neurócito, adipócito, célula epitelial da córnea, célula melanótica, iPS	Odontoblasto, osteoblasto, miócito, neurócito, adipócito, iPS	Odontoblasto, osteoblasto, condrócito, miócito, neurócito, adipócito, iPS	Odontoblasto, osteoblasto, condrócito, cementoblasto, neurócito	Odontoblasto, osteoblasto, neurócito
Regeneração tissular	Regeneração óssea, miogénica, complexo pulpo-dentinário, neuroregeneração	Regeneração óssea, complexo pulpo-dentinário, neuroregeneração, formação radicular	Regeneração óssea, neuroregeneração, dentina tubular	Regeneração óssea, periodontal, formação radicular	Regeneração óssea e periodontal

Quadro 2 – Resumo dos tipos de células mesenquimatosas dentárias. Adaptado de um estudo de Estrela, Alencar *et al.*, (2011)

Dada a sua capacidade de produzir e secretar factores neurotróficos, as células dentárias podem representar uma vantagem no tratamento de doenças neurodegenerativas

como por exemplo a Doença de Parkinson e na reparação de neurónios motores (Estrela *et al.*, 2011).

1.3 Células estaminais dentárias de origem ectodérmica

Ao contrário dos roedores que possuem uma contínua regeneração dos seus incisivos, nos humanos as células estaminais responsáveis pela formação do esmalte são perdidas após a erupção do dente (Morszeck *et al.*, 2008). Estas células podem ser extraídas de dentes de roedores, no entanto, a sua implementação clínica em humanos acarreta problemas de cariz imunológico havendo um risco acrescido de rejeição dos tecidos do hospedeiro. Ainda não foi possível encontrar uma fonte de células estaminais epiteliais dentárias adultas em humanos para regenerar esmalte pós-eruptivo. Uma aposta promissora no âmbito da regeneração dentária será a realização de experiências em modelos animais recém-nascidos ou jovens de forma a obter este tipo de células a partir dos seus terceiros molares. Teoricamente o mesmo poderia ser feito em crianças humanas, extraindo estas células dos botões dentários de terceiros molares, uma vez que estes ainda não são radiograficamente visíveis porque a mineralização ainda não ocorreu. Contudo, todo este procedimento realizado em crianças não é aceitável do ponto de vista ético (Ulmer *et al.*, 2010). Assim, terão de se investigar fontes alternativas de células dentárias ectodérmicas. Existem estudos que apresentam potenciais soluções para este problema através do uso de células estaminais não dentárias para a produção de esmalte em que se demonstrou que as BMSCs podem originar células semelhantes a ameloblastos (Hu *et al.*, 2006).

2. Regeneração de um dente

O edentulismo permanece até aos dias de hoje como um problema de saúde pública (Cooper *et al.*, 2009) e a reabilitação oral destes pacientes passa em muito pela confecção de próteses, as quais estão associadas a complicações como estomatite protética, hiperplasia das mucosas, úlceras traumáticas, disgeusia e nalguns casos até síndrome de ardor bucal (Holm-Pederson *et al.*, 2008). É também sabido que a perda dentária leva a reabsorção do

osso alveolar, por isso é premente criarem-se métodos alternativos para substituição dentária. O conceito de osteointegração foi introduzido nos anos 50 por Per-Ingvar Branemark que observou a formação directa de uma conexão estrutural e funcional entre o osso e o titânio e actualmente a reabilitação oral com implantes endósseos é uma opção de tratamento bem aceite e bastante difundida (Kim *et al.*, 2008). Porém, a conexão directa entre o osso e o titânio carece de tecidos de suporte periodontais presentes nos dentes naturais, cuja função passa entre muitas pelo amortecimento das forças mastigatórias. Além disso, os implantes dentários estão também dependentes da quantidade de osso presente, o que muitas vezes obriga à realização de cirurgias para aumento do volume ósseo, daí que se tenham estabelecido novas metas na área da reabilitação oral, investindo-se cada vez mais na engenharia tissular (Lin *et al.*, 2009).

O termo “engenharia tissular” foi descrito em 1993 por Langer e Vacanti, e parte da premissa de que a manipulação controlada do microambiente extracelular pode levar ao controlo sobre a habilidade das células em organizarem-se, crescerem, diferenciarem-se e formarem uma matriz extracelular funcional que em última instância pode originar um novo tecido funcional. Estamos a falar de todo um complexo processo que requer sinalização autócrina, parácrina e endócrina, interacções células-matriz, forças mecânicas e interacções célula-célula para formar um tecido tridimensional e funcional (Scheller *et al.*, 2009).

Na área da medicina dentária, o interesse por este conceito tem crescido bastante entre os investigadores. Um dos motivos para tal, é o facto dos médicos dentistas estarem familiarizados com técnicas de regeneração tissular, como por exemplo a regeneração tissular guiada para regenerar o periodonto. Contudo, o desenvolvimento de técnicas para gerar uma peça dentária completa continua sob investigação. O factor chave para aperfeiçoar esta tecnologia dentro do contexto da engenharia tissular é a utilização de células estaminais (Yen *et al.*, 2010). O transplante de células estaminais autólogas representa o “*golden standard*” actual, por não implicarem transmissões patogénicas ou tratamentos imunossupressores pós-transplante. Estas células têm também de ser capazes de uma proliferação extensiva a fim de repararem defeitos macroscópicos e representarem uma alternativa terapêutica (Bianco, Kuznetsov *et al.*, 1998). Para além disso, têm de ser capazes de interagir com biomateriais, porque estes são capazes de interagir com células

estaminais conduzindo-as a uma arquitectura correcta e ajudando-as a estabelecer os contactos célula-célula e célula-matriz (Horwitz, Prockop *et al.*, 1999).

As actuais abordagens utilizadas para desenvolver futuras terapias regenerativas dependem da nossa compreensão sobre a biologia da célula estaminal, engenharia tissular e desenvolvimento embrionário.

Para a engenharia tissular é essencial uma tríade composta por células, por uma matriz que funcione como esqueleto arquitectural e por factores de crescimento como estímulo para a diferenciação celular (Soares *et al.*, 2007).

2.1 Matrizes

Para a engenharia tissular, uma matriz é essencial pois fornece a estrutura necessária para o transporte de oxigénio, nutrientes e resíduos metabólicos; a matriz deve ser biocompatível, não irritante e resistente; pode ser composta por materiais sintéticos ou naturais. Os componentes da matriz funcionam activando morfogenes das células implantadas, enquanto esta é gradualmente degradada e substituída pelo tecido regenerado (Nakashima, 2005; Scheller *et al.*, 2009). Para a formação de tecido dentário têm sido utilizadas as matrizes à base de pó de HA/TCP (Gronthos *et al.*, 2002; Mao *et al.*, 2006) que apesar de serem mais resistentes, têm um período de degradação mais longo; matrizes de ácido poliglicólido (PGA) (Duailibi *et al.*, 2004), copolímero do ácido poli coglicolídeo (PLGA) (Duailibi *et al.*, 2004; Iohara *et al.*, 2004), ambas apresentando semelhanças quanto ao suporte de crescimento de tecidos dentários altamente especializados. Contudo, estes materiais apresentam algumas desvantagens, como o facto dos seus produtos de degradação serem acídicos e baixarem o valor do pH do tecido após transplantação *in vivo* o que poderá levar a inflamação (Chang *et al.*, 2003).

Também pode ser utilizado um sistema de matriz com a configuração tri-dimensional, a partir do colagénio tipo I, para cultura de células estaminais, visando a sua diferenciação em odontoblastos (Deng *et al.*, 2005). Outro tipo de matriz que tem sido usado para regeneração dentária e periodontal é um hidrogel de um tri-copolímero de gelatina-condroitina-hialurónico (GCHT) (Kuo *et al.*, 2007) que inicialmente foi desenvolvido para regenerar cartilagem (Chang *et al.*, 2003) e apresenta vantagens,

nomeadamente, boa biocompatibilidade, é biodegradável e não produz metabólitos tóxicos (Kuo *et al.*, 2007). O sucesso da regeneração dentária *in vivo* com implantações de células/matrizes, actualmente ronda os 20-50%, sendo que a definição de sucesso varia, mas normalmente inclui a produção de três estruturas histologicamente intactas: esmalte, dentina, polpa, cemento ou ligamento periodontal (Scheller *et al.*, 2009). Existem estudos que procuram avaliar um outro tipo de matriz, a fibroína de seda, que para além de ser igualmente biocompatível, biodegradável e não originar produtos metabólicos tóxicos, contém aminoácidos de alanina e glicina formando uma estrutura bastante resistente (Zhang *et al.*, 2011). Sabe-se que um dos requisitos das matrizes é que estas possuam porosidades para permitir uma eficiente migração celular, para guiar a adesão, proliferação e difusão celular, através de uma melhor vascularização. A porosidade também tem um importante papel na taxa de degradação das matrizes, o que por sua vez também influencia a maturação dos tecidos recém-formados. Matrizes com poros demasiado pequenos permitem uma reduzida migração celular e difusão de nutrientes, mas oferecem uma grande área de superfície para adesão celular. Matrizes com poros grandes sofrem uma degradação mais rápida, mas beneficiam as células e difusão tissular em detrimento de uma boa área de superfície. Até hoje ainda não se conseguiu chegar a um consenso sobre o tamanho ideal dos poros das matrizes para aplicação no âmbito da bioengenharia dentária (Murphy *et al.*, 2010). Um estudo de Xu *et al.*, (2008) utilizando células mesenquimatosas dentárias de ratos e matrizes de seda à base de hexafluoroisopropanol com poros de diferentes diâmetros (550µm e 250µm), mostrou haver formação de osteodentina mineralizada nas matrizes de poros mais largos e para além disso, esses mesmos poros aparentavam guiar o tamanho e forma do tecido mineralizado. No entanto, um estudo do mesmo grupo em 2011, utilizando células mesenquimatosas dentárias humanas obteve resultados diferentes ao comparar matrizes de seda com poros de diâmetro 500µm e 1000µm, mostrando que apesar da porosidade permitir a formação de tecido mole, não se verificou formação de tecido duro em qualquer uma das matrizes.

Outras estratégias na área da nanobioengenharia têm sido propostas e mostram um grande potencial, como é o caso da utilização de péptidos “*self-assembling*”. Estes baseiam-se nos princípios da interacção proteína-proteína e do enovelamento de proteínas. Compreendendo como é que as estruturas supra-moleculares se organizam, a natureza

destes processos podem ser explorados em prol da confecção de materiais sintéticos (Zhang, 2003). Sabe-se também que o comportamento celular depende da topologia da superfície das matrizes, funções como a adesão celular e vias de sinalização intracelulares são sensíveis a topologias da micro e nano escala na ordem dos 10-100.000 nm (Curtis & Wilkinson, 1999; Stevens & George, 2005). A criação de materiais nanofibrosos a partir dos componentes da matriz extracelular ou a partir da mistura de polímeros sintéticos e naturais pode levar à criação de um material com duas características importantes: o tamanho necessário para influenciar funções biológicas; e a composição bioquímica semelhante ao ambiente da matriz extracelular com o qual as células interagem *in vivo* (Lutolf & Hubbell, 2005; Stevens & George, 2005). A chave para traduzir a nanotecnologia num implante com relevância clínica passa por integrar os nano elementos necessários para controlar as funções celulares num implante tridimensional com dimensões e propriedades que preencham os requisitos da aplicação dentária pretendida. Essa integração pode ser feita através do uso de materiais policristalinos com grãos na ordem dos sub-micron (Webster *et al.*, 2001; Balasundaram *et al.*, 2006). O uso de nanotopografias para aumentar a adesão celular e a osteointegração já se estabeleceu no contexto do processamento e revestimento dos implantes dentários (Mendonça *et al.*, 2008) e provavelmente irá expandir-se a matrizes de maiores dimensões para suportar o preenchimento ósseo de defeitos craniofaciais (Dalby *et al.*, 2007).

Também se têm verificado avanços na síntese de nanomateriais inorgânicos biomiméticos. Uma superfície mineral pode promover a absorção preferencial de moléculas reguladoras da função celular, levando a eventos que conduzem à biomineralização mediada por células (Kohn, 2009). Quando comparados com materiais sintéticos, os biomineerais presentes nos poros da matriz aumentam a adesão celular, a proliferação e diferenciação osteogénica e modelam a organização do citoesqueleto *in vitro* (Kohn *et al.*, 2005; Leonova *et al.*, 2006). Quando células progenitoras dos osteoblastos são transplantadas nestes materiais, é produzido um maior volume de osso comparado a matrizes não mineralizadas (Kohn *et al.*, 2005). O sucesso deste tipo de materiais na regeneração óssea é um sinal encorajador para a regeneração dentária e periodontal (Scheller *et al.*, 2009).

2.2 Factores de crescimento

A morfogénese dentária envolve uma série de interacções dinâmicas e recíprocas entre a ectoderme e o mesênquima. Os factores de crescimento são proteínas secretadas extracelularmente que controlam a morfogénese durante tais interacções e compreendem cinco famílias proteicas: as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) que pertencem à super-família dos factores de crescimento transformantes β (TGF- β); factores de crescimento dos fibroblastos (FGF); proteínas *Hedgehogs* (Hgs); proteínas *Wingless* e *int-related* (Wnts) e factor de necrose tumoral (TNF) (Nakashima *et al.*, 2005). No início da morfogénese dentária, BMP-2, BMP-4 e BMP-7 agem como importantes sinalizadores epiteliais que regulam a diferenciação do mesênquima derivado da crista neural na linhagem odontogénica (Li *et al.*, 1998; Yamashiro *et al.*, 2003). Tais sinalizadores ainda determinam o número e a posição das cúspides dos dentes (Zhang *et al.*, 2005). Um estudo de Iohara *et al.*, (2004) comprovou o efeito estimulatório da BMP-2 na formação de dentina, assim como um estudo de Casagrande *et al.*, (2010) mostrou que as SHEDs necessitam da BMP-2 para se diferenciarem em odontoblastos.

Foi demonstrado que a BMP-4 é expressa pelos pré-odontoblastos da bainha epitelial de Hertwigz. Além disso, BMP-2 e BMP-7 foram observadas em pré-odontoblastos e em odontoblastos durante um período relativamente curto de diferenciação, estando ausentes em odontoblastos maduros localizados na superfície da dentina coronária e radicular. BMP-3 foi localizada em ambas as células na área da raiz, mas não em odontoblastos diferenciados e secretores presentes na coroa dentária (Nakashima *et al.*, 1998).

Os membros da família FGF actuam em diferentes momentos da odontogénese, desde o início do desenvolvimento dentário até à formação da última cúspide (Zhang *et al.*, 2005). Os FGF regulam a expressão de diversos genes e induzem a proliferação do mesênquima (Nakashima & Reddi, 2003).

De entre os três membros da família Hgs presentes nos vertebrados, Shh (*Sonic Hedgehog*) é o único que é expresso nos dentes, sendo expresso durante o desenvolvimento inicial do gérmen dentário. Com o objectivo de investigar a função da proteína Shh, pesquisadores bloquearam a sua sinalização através de anticorpos neutralizantes e observaram que Shh possui duas funções no início da odontogénese. A primeira é durante a

fase de botão dentário, ao estimular a proliferação epitelial, e a segunda é o aumento da sobrevivência da célula epitelial durante a fase de capuz (Cobourne *et al.*, 2001).

A maioria dos genes Wnt é expressa pelo epitélio dentário. Sugere-se que o Wnt7b interage na sinalização Shh para estabelecer os limites entre a ectoderme oral e dentária, posicionando assim os locais de formação das estruturas dentárias (Zhang *et al.*, 2005). Sabe-se que os TNF são cruciais na formação das cúspides dos molares (Zhang *et al.*, 2005).

2.3 Recriar a Odontogênese

Todas as células intervenientes na odontogênese têm origem no ecto-mesênquima, à exceção das células progenitoras dos ameloblastos que têm origem exclusiva na ectoderme (Tomar *et al.*, 2010; Ulmer *et al.*, 2010).

O desenvolvimento dentário é o resultado cumulativo de toda uma complexa rede de sinais entre os factores de crescimento. A sinalização inicia-se no epitélio dentário induzindo a expressão de genes no mesênquima subjacente. Estabelece-se uma sinalização recíproca entre estes dois tecidos que resulta na formação de um dente com um tamanho e forma específicos dependendo da posição que irão ocupar nos maxilares. (Figura nº 2)

Como a maioria dos estudos *in vivo* descritos neste trabalho foram realizados utilizando células do epitélio e do mesênquima dentários de modelos animais, principalmente ratos, optou-se pela descrição resumida da odontogênese no rato comparando-a em seguida à do ser humano. No rato o desenvolvimento dentário inicia-se a partir do 10º dia de vida intra-uterina com a sinalização estabelecida entre o epitélio dentário e o mesênquima derivado da crista neural (Figura nº 3). Ao 11º dia as células do epitélio proliferam e este torna-se mais espesso, invaginando para o mesênquima, formando a lâmina dentária (Figura nº 3A). Por volta do 12º ou 13º dia, à medida que a proliferação

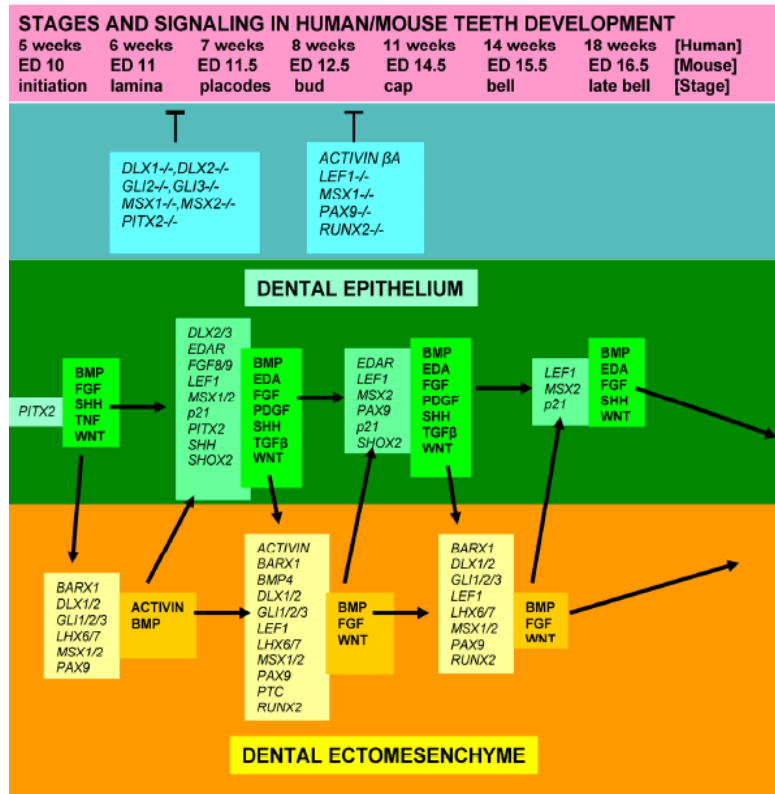


Figura nº 2 - Diferentes fases do desenvolvimento dentário, alguns factores genéticos que afectam os fenótipos e algumas moléculas sinalizadoras e factores de crescimento expressos pelo epitélio e mesênquima dentários. Adaptado de Koussoulakou *et al.*, (2009).

epitelial continua, as células começam a formar um botão dentário, à volta do qual se vão condensando as células do mesênquima (Figura nº 3; Figura nº 4B e 4C). Ao 14º dia atinge-se a fase de capuz ou barrete em que o epitélio começa a dobrar-se e a envolver o mesênquima. É nesta fase que se inicia a morfogénese da coroa regulada por um centro sinalizador epitelial, o nó de esmalte; é ele que controla o padrão das cúspides dentárias (Figura nº 3; Figura nº 4D). A partir do 15º dia inicia-se a fase de sino ou campânula em que os ameloblastos se diferenciam do epitélio para formar o esmalte; os odontoblastos diferenciam-se a partir do mesênquima, para originar a dentina e a polpa dentária; os osteoblastos também se diferenciam a partir do mesênquima para formar o osso alveolar que constituirá os alvéolos dentários (Figura nº 3).

No ser humano a odontogénese inicia-se por volta da 5ª semana de vida intra-uterina com a indução do mesênquima pelo epitélio dentário (Figura nº 3) e processa-se de modo semelhante ao do rato: lâmina dentária (6ª semana) (Figura nº 4E), botão dentário (7ª

à 10^a semana) (Figura n° 4F e 4G), capuz dentário (11^a semana) (Figura n° 4H), sino dentário (14^a à 28^a semana) (Figura n° 3). Contudo entre a 8^a e 10^a semana, o botão dentário correspondente ao futuro dente decíduo tende a invaginar ainda mais no mesênquima dentário formando um gérmen dentário num estágio tardio de botão dentário. Enquanto isso, começa a desenvolver-se um divertículo a partir do epitélio mais superficial do botão dentário que acaba por se tornar um segundo botão dentário correspondente ao futuro dente permanente. Esse segundo botão dentário mais tarde permanecerá no estágio de sino até retomar o seu desenvolvimento na altura em que o dente decíduo será substituído (Figura n° 4G). A erupção dentária ocorre no período pós-natal e envolve a coordenação entre o desenvolvimento radicular e a reabsorção óssea (Zhang *et al.*, 2005; Nakao *et al.*, 2008; Volponi *et al.*, 2010; Ulmer *et al.*, 2010).

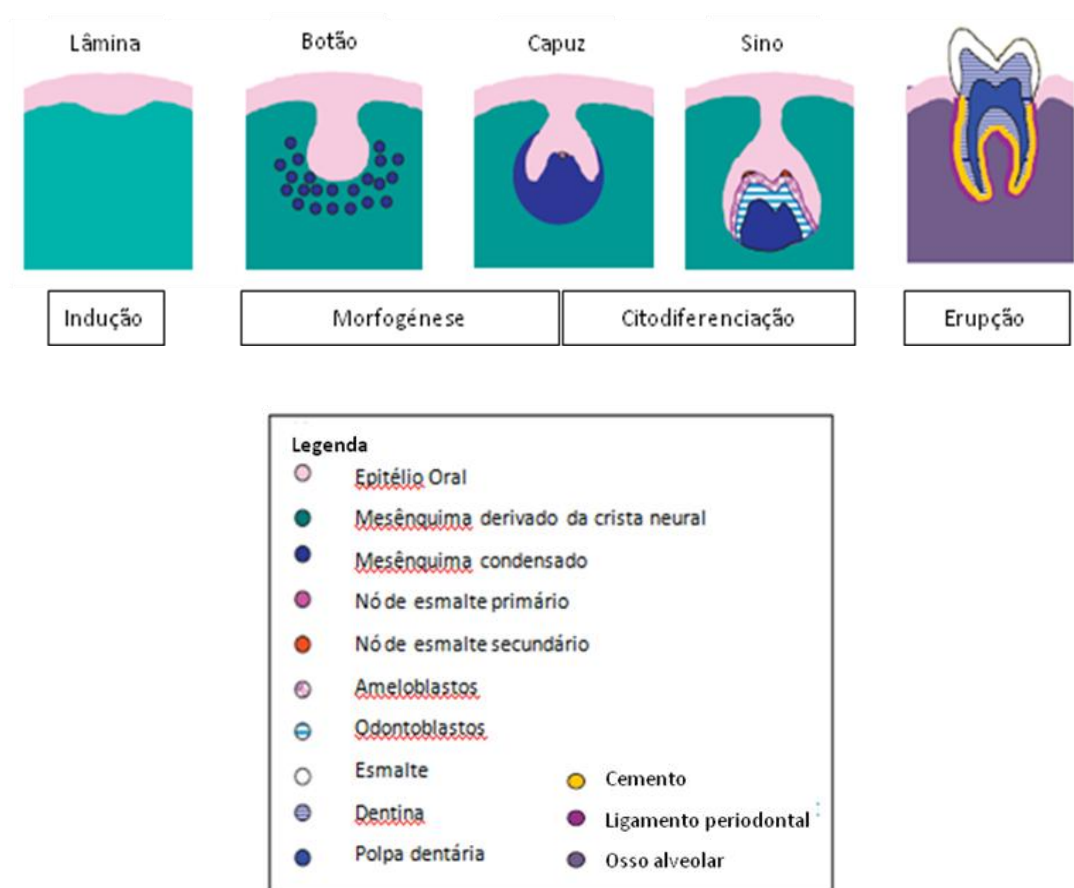


Figura n° 3 – Representação esquemática do desenvolvimento dentário de um estudo de Volponi *et al.*, (2010).

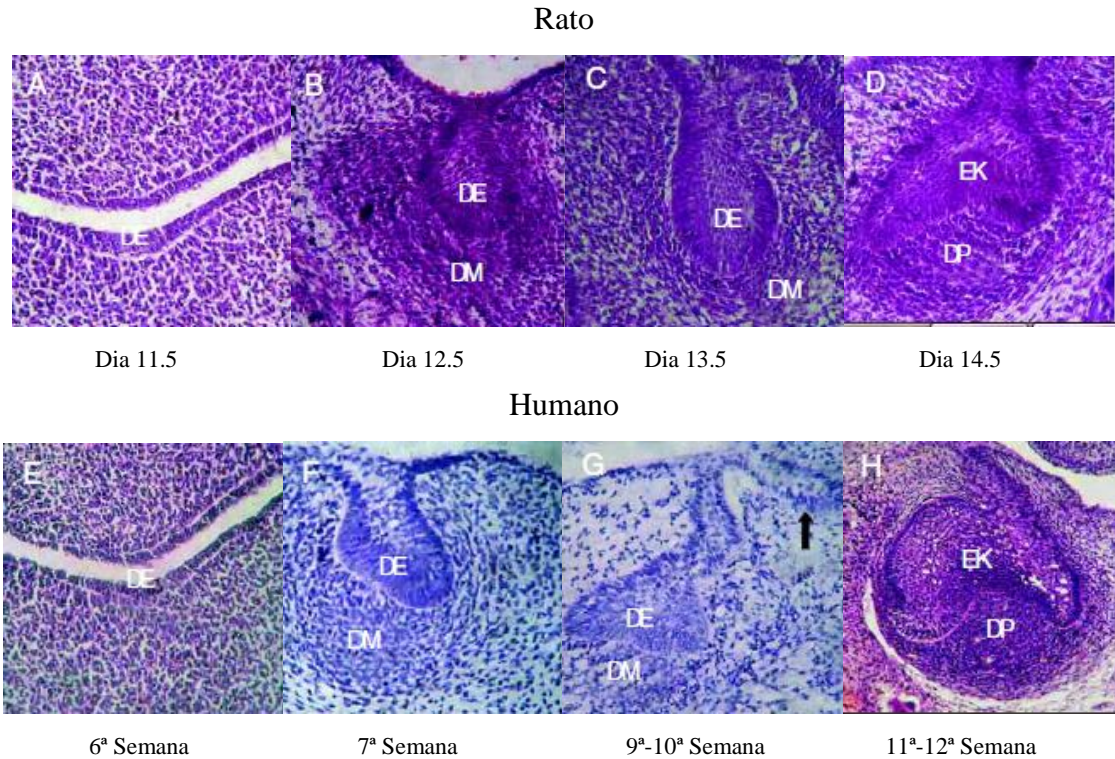


Figura nº 4 – Estádios iniciais do desenvolvimento dentário em embriões do rato e humano (A) Gérmen dentário de um molar de rato no estágio de lâmina. (B) Estádio inicial de botão dentário. (C) Estádio tardio de botão dentário. (D) Estádio de capuz dentário. (E) Gérmen dentário de um molar humano no estágio de lâmina dentária. (F) Estádio inicial de botão dentário. (G) Estádio tardio de botão dentário com presença de um segundo botão dentário (seta preta). (H) Estádio de capuz dentário. Abreviaturas: DE, epitélio dentário; DM, mesênquima dentário; DP, papila dentária; EK, nó de esmalte. Adaptado de Zhang *et al.*, (2005).

2.3.1 Estudos clínicos utilizando células de origem dentária para regeneração de um dente

Existem dois métodos: um envolve implantações *in vivo* de estruturas dentárias indiferenciadas criadas *in vitro* a partir de células progenitoras dentárias (re-agregação celular) (Figura nº 5a), enquanto o outro consiste em expandir *in vitro* populações dessas mesmas células que depois são associadas a matrizes e implantadas *in vivo* (Figura nº 5b).

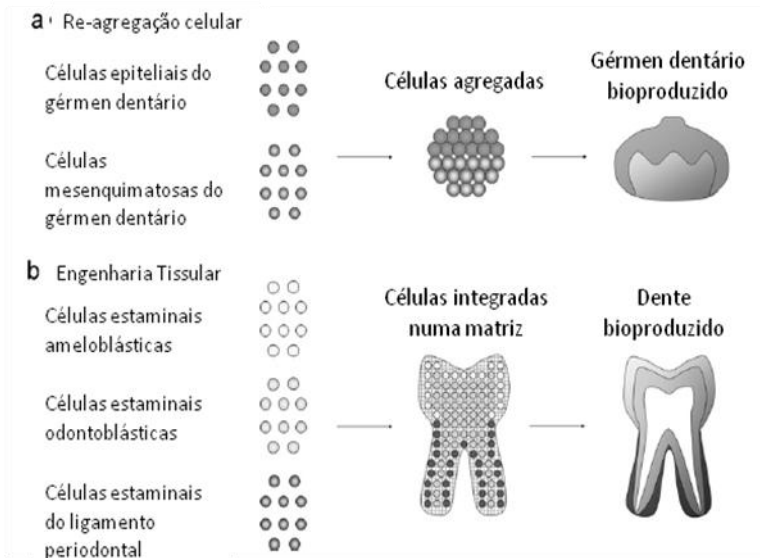


Figura nº 5 – Métodos para produzir um dente a partir de células dissociadas, (a) re-agregação celular, (b) engenharia tissular. Adaptado de um estudo de Nakao *et al.*, (2008).

Young *et al.*, (2002) utilizaram células dissociadas do botão dentário de porcos jovens em conjunto com matrizes de PGA/PLLA, as quais foram implantadas no omento de ratos imunodeficientes durante 20, 25 e 30 semanas. Apesar dos implantes extraídos conterem coroas dentárias anatomicamente bem desenvolvidas apresentando tecidos organizados como o esmalte, dentina e polpa, assemelhando-se em muito com dentes naturais, também continham tecido dentário desorganizado e além disso os novos tecidos não adoptaram o tamanho e a forma da matriz. Apesar desta lacuna, os resultados deste estudo confirmaram a habilidade de populações heterogêneas de células epiteliais e mesenquimatosas dissociadas de gérmen dentários em reagregarem-se dentro da matriz, interagindo e recapitulando a odontogênese. Um estudo do mesmo grupo em 2004, utilizando a mesma metodologia, obteve resultados semelhantes mas utilizando células do botão dentário de ratos (Duailibi *et al.*, 2004).

Hu *et al.*, (2006) através de métodos e resultados semelhantes, mostraram que além da capacidade de reagregação de células epiteliais e mesenquimatosas, o mesênquima da fase de capuz poderá ser o responsável pela indução da histogênese do epitélio dentário mesmo nas situações em que ambos os tecidos estejam dissociados.

Um estudo de Isogawa *et al.*, (2004) propôs-se a avaliar a formação dentária a partir de tecido dentário mesenquimatoso humano combinado com epitélio dentário de rato. Isto

porque a quantidade de tecido epitelial dentário humano que pode ser obtido a partir da enucleação de germens dentários de terceiros molares de crianças entre os 6-12 anos é muito reduzida devido a limitações técnicas, em comparação com o tecido mesenquimatoso. Estes componentes foram então transplantados subcutaneamente em ratos imunodeficientes durante algumas semanas, tendo-se observado formação de estruturas dentárias.

Um dos poucos estudos que conseguiu reproduzir uma raiz dentária funcional foi um estudo de Sonoyama *et al.*, (2006) que utilizaram SCAPs e PDLSCs extraídas de terceiros molares humanos e expandidas *in vitro*. As SCAPs foram integradas numa matriz de HA/TCP que foi revestida com *Gelfoam* que continha PDLSCs. Foram implantadas num alvéolo pós-extraccional de um modelo animal (porco) onde previamente se removeu reminiscências do ligamento periodontal original. Suturou-se e aguardou-se 3 meses. Observou-se através da técnica de tomografia computadorizada que se tinha formado uma estrutura mineralizada e espaço do ligamento periodontal. Após 3 meses, reabriu-se cirurgicamente o local do implante, colocou-se e cimentou-se uma coroa de cerâmica pré-fabricada no canal pré-formado dentro do bloco de HA/TCP que posteriormente foi submetida a cargas funcionais durante 4 semanas. A análise radiológica e histológica confirmou a regeneração de uma raiz dentária com fibras do ligamento periodontal ancoradas no cimento formado, capaz de suportar forças compressivas. Este estudo mostrou uma alternativa viável para a reabilitação de espaços edêntulos através da combinação de células autólogas com coroas dentárias artificiais.

Um estudo de Kuo *et al.*, (2007) utilizou células do botão dentário de porcos expandidas *in vitro* e transferidas para uma matriz de GCHT e transplantadas para o alvéolo original. Após 36 semanas, verificou-se a formação de estruturas dentárias que incluíam um complexo pulpo-dentinário bem organizado, cimento e ligamento periodontal, sendo que estas duas estruturas são as mais difíceis de reproduzir. Não houve formação de esmalte, pois os tecidos calcificados tinham sido removidos aquando da preparação das células do botão dentário. De salientar que o tamanho do tecido regenerado correspondia em grande parte ao tamanho da matriz.

Honda *et al.*, (2007) mostraram que o processo de re-agregação celular era feito de uma forma mais eficaz, originando estruturas dentárias mais organizadas quando a cultura

de células era realizada de forma sequencial, ao invés de misturar as células epiteliais com as mesenquimatosas.

Recentemente, verificou-se que células dentárias integradas numa matriz e expandidas num sistema de co-cultura parecem permitir um melhor controlo do tamanho e forma do dente regenerado. Estudos observaram que células mesenquimatosas dentárias associadas a uma matriz de PGA e células epiteliais dentárias associadas a esponjas de gel de colagénio permitem que haja um contacto directo entre estes dois tipos celulares e desta forma originar estruturas dentárias bem organizadas (Honda *et al.*, 2006; Komine *et al.*, 2007; Abukawa *et al.*, 2009)

Ikeda *et al.*, (2009) mostraram através do método da re-agregação celular que após transplantarem um gérmen dentário produzido *in vitro*, no osso alveolar de um rato adulto, este foi capaz de originar um dente com a estrutura correcta que erupcionou e entrou em oclusão. O dente apresentava tecido mineralizado capaz de suportar forças mastigatórias, possuía também inervação permitindo-lhe responder a estímulos como o stress mecânico e dor em conjunto com os outros tecidos orais e maxilofaciais. Este estudo veio realçar o potencial deste futuro tipo de terapia na medicina regenerativa.

2.4 Desafios actuais na regeneração dentária

Como já foi descrito anteriormente, existe actualmente um recurso a várias fontes celulares para serem aplicadas na área da bioengenharia dos tecidos dentários mesenquimatosos, nomeadamente as DPSCs, SHEDs, SCAPs, PDLSCs e DFPSCs. Ao contrário destas, as células estaminais epiteliais dentárias humanas apresentam limitações por duas razões:

- Primeiro são células que sofrem apoptose logo após a formação do esmalte estar completa, não estando presentes no dente após a sua erupção. A única fonte disponível deste tipo de células são os terceiros molares inclusos que podem ser obtidos de crianças ou adultos jovens;
- Segundo, é mais complicado realizar expansão em cultura deste tipo de células do que as células mesenquimatosas dentárias (Yen *et al.*, 2010).

Assim, terão de se investigar fontes alternativas de células dentárias ectodérmicas. Embora não se encontre no âmbito deste trabalho falar sobre outras possíveis fontes de células estaminais dentárias, fica apenas a ressalva de que um dos actuais desafios passa por isso mesmo, por se encontrarem populações de células estaminais dentárias que possam substituir o recurso às células embrionárias do epitélio e mesênquima dentários. Essa procura é fomentada pelo facto de se conseguirem criar células epiteliais dentárias a partir de tecidos de outra origem e pelo facto do ectomesênquima proveniente de outros tecidos se tornar competente para a odontogénese quando este é induzido pelo epitélio dentário (Yen *et al.*, 2010). Outro desafio passa por encontrar essas populações de células não-dentárias, sendo que as BMSCs parecem ser capazes de responder a sinais indutivos do epitélio dentário, criando estruturas dentárias organizadas (Ohazama *et al.*, 2004). Um estudo de Hu *et al.*, (2006) demonstrou que as BMSCs podem originar células semelhantes a ameloblastos, sendo uma potencial fonte de células para a produção de esmalte.

Também se têm desenvolvido esforços no sentido de se estabelecer linhagens de células estaminais dentárias transgénicas que poderiam ser usadas para originar estruturas dentárias *in vivo*, sendo que uma das maiores vantagens desta abordagem passa por se poder facilmente criar células, caracterizá-las, e controlá-las sem a necessidade de recorrer repetidamente a uma fonte primária das mesmas (Yen *et al.*, 2010).

Recentemente, vários tipos de células mesenquimatosas dentárias de animais (ratos) como as DPSCs, SHEDs e SCAPs têm sido reprogramadas com sucesso em células pluripotentes induzidas (iPS), o que parece ser uma aposta promissora para a medicina regenerativa, visto representarem uma fonte de células autólogas. Estas células expressam marcadores genéticos característicos das células estaminais embrionárias e mantêm o potencial de se diferenciarem em tecidos derivados dos três folhetos germinativos. Contudo, efectuar este processo em células humanas, assim como usar estas células para regenerar um dente completo apresenta complicações e incertezas, permanecendo um desafio (Okita *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010).

Sabe-se que os gérmens dentários bioproduzidos podem ser implantados e desenvolverem-se nos maxilares. Existem estudos recentes que suportam a viabilidade desta abordagem, demonstrando que a implantação de gérmens dentários quer em diastemas naturais de roedores, quer em alvéolos pós-extraccionais ou cicatrizados de

maxilares de ratos e cães pode resultar na maturação do gérmen. A dúvida é se os maxilares de humanos exibem a mesma capacidade. Outros problemas que se colocam é identificar a fase de desenvolvimento dentário ideal para se realizar a implantação, otimizar os procedimentos pelos quais se implanta o gérmen e além disso garantir que há erupção dentária. É actualmente aceite que o folículo dentário tem um papel fundamental na erupção dentária e por isso mesmo será um factor a incluir para que a mesma ocorra (Yen *et al.*, 2010).

De realçar também a necessidade de otimizar o design das matrizes e o método de libertação de factores de crescimento de forma a maximizar uma adequada interacção entre o epitélio e o mesênquima dentários para se obter uma adequada formação dentária, já que alguns estudos apesar de demonstrarem a capacidade de formação das diversas estruturas dentárias, estas não apresentavam uma correcta morfologia ou organização (Abukawa *et al.*, 2009).

A regeneração dentária completa requer a formação de uma coroa como também de uma raiz funcionais. Até à data, a produção de uma raiz dentária com tecidos periodontais funcionais associados à mesma tem-se revelado um desafio, com apenas alguns casos de sucesso (Sonoyama *et al.*, 2006), o que torna necessária uma maior investigação nesse sentido.

Possíveis respostas imunitárias face aos gérmens dentários humanos ainda não são conhecidas, por isso este importante aspecto requer investigação antes de se iniciarem ensaios clínicos. Idealmente, neste tipo de terapia deverão ser usadas células autólogas, evitando deste modo a rejeição do implante do gérmen (Yen *et al.*, 2006).

Existe outro aspecto a ter em consideração que é o facto da odontogénese nos humanos ser um processo muito mais lento do que nos ratos. É aproximadamente 8x mais lento e o desenvolvimento pós-natal dura alguns anos. Portanto, todo o processo de crescimento, implantação e erupção de dentes bioproduzidos de ratos poderá levar apenas algumas semanas, o que no caso dos humanos poderá levar meses ou até anos. São necessárias investigações para acelerar o desenvolvimento dentário em humanos (Volponi *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

As células estaminais de origem dentária apresentam vantagens como o seu fácil acesso, uma elevada proliferação, viabilidade e facilidade em serem induzidas a diferenciarem-se em diferentes linhagens celulares.

A aplicação de células mesenquimatosas dentárias na engenharia de tecidos dentários ainda se encontra numa fase inicial, visto as fontes destas células estarem limitadas a alturas específicas do desenvolvimento dentário humano. Por exemplo, as DFPCs e SCAPs apenas estão disponíveis durante a erupção dos terceiros molares na adolescência, enquanto as SHEDs/DPSCs ou as PDLSCs podem ser colhidas a partir de dentes decíduos exfoliados, ou dentes extraídos por razões ortodônticas. Felizmente, as células mesenquimatosas dentárias podem ser criopreservadas (Oh *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010) e mais tarde clinicamente aplicadas.

Ainda existem muitos desafios no âmbito da medicina regenerativa que precisam ser explorados e ultrapassados, incluindo a necessidade de se estabelecer métodos fiáveis para controlar a forma, tamanho e cor dos dentes regenerados, para criar locais adequados de implantação maxilar que permitam o desenvolvimento dos dentes e métodos para controlar a erupção dos mesmos.

Com base na rápida expansão do conhecimento sobre embriologia, biologia molecular e do desenvolvimento, biologia da célula estaminal e bioengenharia, é tentador esperar que este tipo de terapia esteja disponível para seres humanos num futuro próximo, o que traria grandes benefícios a nível da qualidade de vida.

BIBLIOGRAFIA

ABUKAWA, H., ZHANG, W., YOUNG, C., ASRICAN, R., VACANTI, J., KABAN, L., TROULIS, M., YELICK, P. Reconstructing Mandibular Defects Using Autologous Tissue-Engineered Tooth and Bone Constructs. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009; 67: 335–47.

ALVES, L., LINS, R., BARBOZA, C. Identificação de células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal e perspectivas na regeneração periodontal: Revisão de literatura. *Odontol. Clín.-Cient.*, 2010; 9 (1): 7–12.

BAKOPOULOU, A., LEYHAUSEN, G., VOLK, K., TSIFTSOGLU, A., GAREFIS, P., KOIDIS, P., GEURTSSEN, W. 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*, 2011; 1–13.

BALASUNDARAM, G., SATO, M., WEBSTER, T. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials*, 2006; 27: 2798–805.

BIANCO, P., KUZNETSOV, S., RIMINUCCI, M., FISHER, L., SPIEGEL, A., ROBEY, P. Reproduction of human fibrous dysplasia of bone in immunocompromised mice by transplanted mosaics of normal and Galpha-mutated skeletal progenitor cells. *J Clin Invest*, 1998 Apr; 101(8): 1737-44.

BLUTEAU, G., LUDER, H., BARI, C., MITSIADIS, T. Stem cells for tooth engineering. *European Cells and Materials*, 2008; 16: 1-9.

BONAB, M., ALIMOGHADDAM, K., TALEBIAN F., GHAFFARI, S., GHAVAMZADEH, A., NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology*, 2006; 7 (14): 1-7.

BOSSHARDT, D., SCHROEDER, H. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*, 1996; 245: 267-92.

BYDLOWSKI, S., DEBES, A., MASELLI, L., JANZ, F. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2009; 31 (1): 25-35.

CAPLAN, A. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 1991; 9: 641-50.

CASAGRANDE, L., DEMARCO, F., ZHANG, Z., ARAUJO, F., SHI, S., NÖR, J. Dentin-derived BMP-2 Odontoblast Differentiation. *J Dent Res*, 2010; 89 (6): 603-8.

CHAI, Y., JIANG, X., ITO, Y., BRINGAS, P., HAN, J., ROWITCH, D., SORIANO, P., McMAHON, A., SUCOV, H. Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 2000; 127: 1671-9.

CHANG, C., LIU, H., LIN, C., CHOU, C., LIN, F. Gelatin–chondroitin–hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2003; 24: 4853-8.

CHO, M., GARANT, P. Development and general structure of the periodontum. *Periodontol*, 2000; 24: 9-27.

COBOURNE, M., HARDCASTLE, Z., SHARPEL, P. Sonic hedgehog Regulates Epithelial Proliferation and Cell Survival in the Developing Tooth Germ. *J Dent Res*, 2001; 80 (11): 1974-9.

COOPER, L. The current and future treatment of edentulism. *J Prosthodont*, 2009; 18: 116-22.

COPPI, P., BARTSCH, G., SIDDIQUI, M., XU, T., SANTOS, C., PERIN, L., MOSTOSLAVSKY, G., SERRE, A., SNYDER, E., YOO, J., FURTH, M., SOKER, S., ATALA, A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 2007; 25 (1): 100-6.

COURA, G., GARCEZ, R., AGUIAR, C., SILVA, M., MAGINI, R., TRENTIN, A. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodont Res*, 2008; 43: 531-6.

CURTIS, A., WILKINSON, C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem Soc Symp*, 1999; 65: 15–26.

DALBY, M., GADEGAARD, N., TARE, R., ANDAR, A., RIEHLE, M., HERZYK, P. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater*, 2007; 6: 997-1003.

DENG, M., SHI, J., SMITH, J., JIN, Y. Effects of transforming growth factor beta1 (TGFbeta-1) and dentin non-collagenous proteins (DNCP) on human embryonic ectomesenchymal cells in a three-dimensional culture system. *Arch Oral Biol*, 2005; 50 (11): 937-45.

DIEKWISCH, T. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol*, 2001; 45: 695-706.

DUAILIBI, M., DUAILIBI, S., YOUNG, C., BARTLETT, J., VACANTI, J., YELICK, P. Bioengineered Teeth from Cultured Rat Tooth Bud Cells. *J Dent Res*, 2004; 83 (7): 523-8.

ESTRELA, C., ALENCAR, A., KITTEN, G., VENCIO, E., GAVA, E. Mesenchymal Stem Cells in the Dental Tissues: Perspectives for Tissue Regeneration. *Braz Dent J*, 2011; 22 (2): 91-8.

GOVINDASAMY, V., ABDULLAH, A., RONALD, V., MUSA, S., AZIZ, Z., ZAIN, R., TOEY, S., BHONDE, R., KASIM, N. Inherent Differential Propensity of Dental Pulp Stem Cells Derived from Human Deciduous and Permanent Teeth. *JOE*, 2010; 36 (9): 1504-15.

GRONTHOS, S., MROZIK, K., SHI, S., BARTOLD, P. Ovine Periodontal Ligament Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. *Calcified Tissue International*, 2006; 79: 310-7.

HOLM-PEDERSEN, P., SCHULTZ-LARSEN, K., CHRISTIANSEN, N., AVLUND, K. Tooth loss and subsequent disability and mortality in old age. *Am Geriatr Soc*, 2008; 56: 429-35.

HONDA, M., IMAIZUMI, M., SUZUKI, H., OHSHIMA, S., TSUCHIYA, S., SATOMURA, K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 111(6): 700-8.

HORWITZ, E., PROCKOP, D., FITZPATRICK, L., KOO, W., GORDON, P., NEEL, M., SUSSMAN, M., ORCHARD, P., MARX, J., PYERITZ, R., BRENNER, M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*, 1999 Mar; 5(3): 309-13.

HU, B., NADIRI, A., KUCHLER, S., PERRIN, F., PETERS, H., LESOT, H. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. *Tissue Eng*, 2006; 12: 2069-75.

HU, B., UNDA, F., KUCHLER, S., JIMENEZ, L., WANG, X., HAÏKEL, Y., WANG, S., LESOT, H. Bone Marrow Cells Can Give Rise to Ameloblast-like Cells. *J Dent Res*, 2006; 85 (5): 416-21.

HUANG, G., GRONTHOS, S., SHI, S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*, 2009; 88 (9): 792-06.

HUANG, G., SONOYAMA, W., LIU, H., WANG, S., SHI, S. The Hidden Treasure in Apical Papilla: The Potential Role in Pulp/Dentin Regeneration and BioRoot Engineering. *JOE*, 2008; 34 (6): 645-51.

HUANG, Y., YANG, J., WANG, C., LEE, S. Dental Stem Cells and Tooth Banking for Regenerative Medicine. *J Exp Clin Med*, 2010; 2 (3): 111-7.

IKEDA, E., HIROSE, M., KOTOBUKI, N., SHIMAOKA, H., TADOKORO, M., MAEDA, M., HAYASHI, Y., KIRITA, T., OHGUSHI, H. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 342: 1257-62.

IKEDA, E., MORITA, R., NAKAO, K., ISHIDA, K., NAKAMURA, T., YAMAMOTO, T., OGAWA, M., MIZUNO, M., KASUGAI, S., TSUJI, T. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS*, 2009; 106 (32): 13475-80.

IOHARA, K., NAKASHIMA, M., ITO, M., ISHIKAWA, M., NAKASIMA, A., AKAMINE, A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J Dent Res*, 2004; 83 (8): 590-5.

IOHARA, K., NAKASHIMA, M., ITO, M., ISHIKAWA, M., NAKASIMA, A., AKAMINE, A. Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *J Dent Res*, 2004; 83 (8): 590-5.

ISOGAWA, N., TERASHIMA, T., NAKANO, Y., KINDAICHI, J. TAKAGI, Y., TAKANO, Y. The induction of enamel and dentin complexes by subcutaneous implantation of reconstructed human and murine tooth germ elements. *Arch Histol Cytol*, 2004; 67 (1): 65-77.

KANAWABE, N., MURAKAMI, K., YAMAMOTO, T. The presence of ABDG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006; 344: 1278-83.

KÉMOUN, P, DALICIEUX, S., RUE, J., FARGES, J., GENNERO, I., AURIOL, F., MESANGE, F., GADELORGE, M., ARZATE, H., NARAYANAN, S., BRUNEL, G., SALLES, J. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*, 2007; 329: 283-94.

KIKUCHI, H., SUZUKI, K., SAKAI, N., YAMADA, S. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. *Cell Tissue Res*, 2004; 317: 173-85.

KIM, T., JANG, J., KIM, H., KNOWLES, J., KU, Y. Biomimetic approach to dental implants. *Curr Pharma Des*, 2008; 14: 2201-11.

KIRKHAM, J., FIRTH, A., VERNALS, D., BODEN, N., ROBINSON, C., SHORE, R., BROOKES, S., AGGELI, A. Self-assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. *J Dent Res*, 2007; 86 (5): 426-30.

KOHN, J. *In Biomedical Engineering and Design Handbook*. 2nd Edition. Vol. I. New York: McGraw-Hill. 2009; 371-79.

KOHN, D., SHIN, K., HONG, S., JAYASURIYA, A., LEONOVA, E., ROSSELLO, R. Self-assembled mineral scaffolds as model systems for biomineralization and tissue engineering. *Proc 8th International Conference on the Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, Toronto: University of Toronto Press, 2005; 216-9.

KOMINE, A., SUENAGA, M., NAKAO, K., TSUJI, T., TOMOOKA, Y. Tooth regeneration from newly established cell lines from a molar tooth germ epithelium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 355: 758-63.

KOUSSOULAKOU, D., MARGARITIS, L., KOUSSOULAKOS, S. A Curriculum Vitae of Teeth: Evolution, Generation, Regeneration. *International Journal of Biological Sciences*, 2009; 5 (3): 226-43.

KUO, T., HUANG, A., CHANG, H., LIN, F., CHEN, S., CHEN, R., CHOU, C., LIN, H., CHIANG, H., CHEN, M. Regeneration of dentin-pulp complex with cementum and periodontal ligament formation using dental bud cells in gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold in swine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2007; 1062-8.

LEE, J., HUI, J. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*, 2006; 88 (7): 841-51.

LEE, S., CHIANG, P., TSAI, Y., TSAI, S., JENG, J., KAWATA, T., HUANG, H. Effects of Cryopreservation of Intact Teeth on the Isolated Dental Pulp Stem Cells. *JOE*, 2010; 36 (8): 1336-40.

LEON, E., IWASAKI, K., KOMAKI, M., KOJIMA, T., ISHIKAWA, I. Osteogenic effect of interleukin-11 and synergism with ascorbic acid in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 2007; 42: 527-35.

LEONOVA, E., PENNINGTON, K., KREBSBACH, P., KOHN, D. Substrate mineralization stimulates focal adhesion contact redistribution and cell motility of bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res*, 2006; 79: 263-70.

LI, H., BARTOLD, P., ZHANG, C., CLARKSON, R., YOUNG, W., WATERS, M. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor I Induce Bone Morphogenetic Proteins 2 and 4: A Mediator Role in Bone and Tooth Formation? *Endocrinology*, 1998; 139 (9): 3855-62.

LIAO, J., CUI, C., CHEN, S., REN, J., CHEN, L., GAO, Y., LI, H., JIA, N., CHENG, L., XIAO, H., XIAO, L. Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Adult Rat Cells. *Cell Stem Cell*, 2008; 4: 11-5.

LIN, C., DONG, Q., WANG, L., ZHANG, J., WU, L., LIU, B. Dental implants with the periodontum: a new approach for the restoration of missing teeth. *Med Hypotheses*, 2009; 72: 58-61.

LUTOLF, M., HUBBELL, J. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2005; 23: 47-55.

MENDONCA, G., MENDONCA, D., ARAGAO, F., COOPER, L. Advancing dental implant surface technology - From micron-to nanotopography. *Biomaterials*, 2008; 29, 3822-35.

MORSCECK, C., GÖTZ, W., SCHIERHOLZ, J., ZEILHOFER, F., KÜHN, U., MÖHL, C., SIPPEL, C., HOFFMANN, K. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, 2005; 24: 155-65.

MORSCZECK, C., SCHMALZ, G., REICHERT, T., VÖLLNER, F., GALLER, K., DRIEMEL, O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest*, 2008; 12: 113-8.

MORSCZECK, C., SCHMALZ, G., REICHERT, T., VÖLLNER, F., SAUGSPIER, M., BOURONCLE, S., DRIEMEL, O. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Invest*, 2009; 13: 383-91.

MURPHY, C., HAUGH, M., BRIEN, F. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2010; 31: 461-6.

MUSCHLER, G., MIDURA, R. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res*, 2002; 395: 66-80.

MUSCHLER, G., MIDURA, R., et al. Practical Modeling Concept for Connective Tissue Stem Cell and Progenitor Compartment Kinetics. *J Biomed Biotechnol*, 2003; 3: 170-93.

MUSCHLER, G., NAKAMOTO, C., et al. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Surg Am*, 2004; 86-A (7): 1541-58.

NAKAO, K., TAKASHI, T. Dental regenerative therapy: Stem cell transplantation and bioengineered tooth replacement. *Japanese dental Science Review*, 2008; 44: 70-5.

NAKASHIMA, M. Bone morphogenetic proteins in dentin regeneration for potential use in endodontic therapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005; 16: 369-76.

NAKASHIMA, M., REDDI, H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat Biotechnol*, 2003; 21 (9): 1025-32.

NAKASHIMA, M., TOYONO, T., MURAKAMI, T., AKAMINE, A. Transforming growth factor-beta superfamily members expressed in rat incisor pulp. *Arch Oral Biol*, 1998; 43 (9): 745-51.

NELSON, T., BEHFAR, A., YAMADA, S., FERNANDEZ, A., TERZIC, A. Stem Cell Platforms for Regenerative Medicine. *Clin Transl Sci.*, 2009; 2 (3): 222-7.

OH, Y., CHE, Z., HONG, J., LEE, E., LEE, S., KIM, L. Cryopreservation of human teeth for future organization of a tooth bank – A preliminary study. *Cryobiology*, 2005; 51: 322-9.

OHAZAMA, A., MODINO, S., MILETICH, I., SHARPE, P. Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth. *J Dent Res*, 2004; 83 (7): 518-22.

OKITA, K., ICHISAKA, T., YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *NATURE*, 2007; 448: 313–17.

PARK, B., HAH, Y., CHOI, M., RYU, Y., LEE, S., KIM, D., KIM, J., BYUN, J. In Vitro Osteogenic Differentiation of Cultured Human Dental Papilla-Derived Cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 2009; 67: 507-14.

PITTENGER, M., MACKAY, A., BECK, S., JAISWAL, R., DOUGLAS, R., MOSCA, J., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999; 284: 143-7.

SHELLER, E., KREBSBACH, P., KOHN, D. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *J Oral Rehabil.*, 2009; 36 (5): 368-89.

SEO, B., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBEY, P., WANG, C., SHI, S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004; 364: 149-55.

SEO, B., MIURA, M., SONOYAMA, W., COPPE, C., STANYON, R., SHI, S. Recovery of Stem Cells from Cryopreserved Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research*, 2005; 84: 907-12.

SHANTI, R., LI, W., NESTI, L., WANG, X., TUAN, R. Adult Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties, Characteristics, and Applications in Maxillofacial Surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 2007; 65: 1640-7.

SLATER, L. Dentigerous cyst versus dental follicle. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2000; 38 (4): 402

SOARES, A., KNOP, L., JESUS, A., ARAÚJO, T. Células-tronco em Odontologia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*, 2007; 12 (1): 33-40.

SONOYAMA, W., LIU, Y., FANG, D., YAMAZA, T., SEO, B., ZHANG, C., LIU, H., GRONTHOS, S., WANG, C., WANG, S., SHI, S. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *Plos One*, 2006; 1 (1): 79, 1-8.

SONOYAMA, W., LIU, Y., YAMAZA, T., TUAN, R., WANG, S., SHI, S., HUANG, G. Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth –A Pilot Study. *J Endod.*, 2008; 34 (2): 166,71.

STANISLAWSKI, L., CARREAU, J., POUCHELET, M., CHEN, Z., GOLDBERG, M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cells emerging early from the explant. *Clin Oral Investig*, 1997 Sep; 1 (3): 131-40.

STEVENS, M., GEORGE, J. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science*, 2005; 310: 1135-8.

SVEEN, O., HAWES, R. Differentiation of new odontoblasts and dentine bridge formation in rat molar teeth after tooth grinding. *Arch Oral Biol*, 1968 Dec; 13(12):1399-409.

TECHAWATTANAWISAL, W., NAKAHAMA, K., KOMAKI, M., ABE, M., TAKAGI, Y., MORITA, I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007; 357: 917-23.

TOMAR, G., SRIVASTAVA, R., GUPTA, N., BARHANPURKAR A., POTE, S., JHAVERI, H., MISHRA, G., WANI, M. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010; 393: 377-83.

ULMER, F., WINKEL, A., KOHORST, P., STIESCH, M. Stem Cells – Prospects in Dentistry. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 2010; 120: 860-72.

VOLPONI, A., PANG, Y., SHARPE, P. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*, 2010; 1-8.

WAKITANI, S., IMOTO, K., et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002; 10 (3): 199-206.

WAKITANI, S., MITSUOKA, T., et al. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two reports. *Cell Transplants*, 2004; 13(5). 595-600.

WAKITANI, S., NAWATA, M., et al.. Repair of articular cartilage defects in the patellofemoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *J Tissue Eng Regen Med*, 2007; 1 (1): 74-9.

WEBSTER, T., ERGUN, C., DOREMUS, R., SIEGEL, R., BIZIOS, R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials*, 2001; 22: 1327-33.

WISE, G., FRAZIER-BOWERS, S., D'SOUZA, R. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002; 13: 323-34.

WOODS, E., PERRY, B., HOCKEMA, J., LARSON, L., ZHOU, D., GOEBEL, W. Optimized Cryopreservation method for human dental pulp stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology*, 2009; 59: 150-7.

XU, W., ZHANG, W., ASRICAN, R., KIM, H., KAPLAN, D., YELICK, P. Accurately shaped tooth bud cell-derived mineralized tissue formation on silk scaffolds. *Tissue Eng Part A*, 2008; 14: 549-57.

YAGYUU, T., IKEDA, E., OHGUSHI, H., TADOKORO, M., HIROSE, M., MAEDA, M., INAGAKE, K., KIRITA, T. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Arch Oral Biol*, 2010; 55: 68-76.

YAMASHIRO, T., TUMMERS, M., THESLEFF, I. Expression of Bone Morphogenetic Proteins and Msx Genes during Root Formation. *J Dent Res*, 2003; 82 (3): 172-6.

YAN, X., QIN, H., QU, C., TUAN, R., SHI, S., HUANG, G. iPS Cells Reprogrammed From Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells Dev.*, 2010; 19 (4): 469-80.

YAO, S., PAN, F., PRPIC, V., WISE, G. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *J Dent Res*, 2008; 87 (8): 767-71.

YEN, A., YELICK, P. Dental Tissue Regeneration – A Mini-Review. *Gerontology*, 2010; 1-10.

YOUNG, C., TERADA, S., VACANTI, J., HONDA, M., BARTLETT, J., YELICK, P. Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. *J Dent Res*, 2002; 81 (10): 695-700.

YU, J., VODYANIK, M., OTTO, K., BOURGET, J., FRANE, J., TIAN, S., NIE, N., JONSDOTTIR, G., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, I., THOMSON, J. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *SCIENCE*, 2007; 318: 1917-20.

ZEICHNER, M., OISHI, K., SU, Z., ZAKARTCHENKO, V., CHEN, L., ARZATE, H., BRINGAS, P. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*, 2003; 228: 651-63.

ZHANG, S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol*, 2003; 21: 1171-8.

ZHANG, W., AHLUWALIA, I., LITERMAN, R., KAPLAN, D., YELICK, P. Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol based silk scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 2011; 97: 414-22.

ZHANG, Y., CHEN, Z., SONG, Y., LIU, C., CHEN, Y.. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Research*, 2005; 15 (5): 301-16.