

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Células Estaminais: um potencial terapêutico em Medicina  
Dentária**

**Tiago de Oliveira Magalhães Gamboa**

MESTRADO INTEGRADO

2011

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA



**Células Estaminais: um potencial terapêutico em Medicina  
Dentária**

**Tiago de Oliveira Magalhães Gamboa**

**Dissertação orientada pelo Doutor André Tsou Chen**

MESTRADO INTEGRADO

2011

*“Nunca te esqueças que a inveja é o defeito principal dos portugueses. Por isso toma cuidado sempre que fizeres as coisas bem feitas. Muitos dos que estarão à tua volta não pretendem valorizar-se para serem melhores do que tu, mas querem apenas que tu nunca tenhas as condições que te permitam parecer melhor do que eles!”*

Francisco Salgado Zenha

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrotas, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito, nem sofrem muito, porém vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitórias nem derrotas.”*

Theodore Roosevelt

*“Aos meus inimigos, que tanto me ajudaram na minha carreira.”*

Camilo José Cela

## AGRADECIMENTOS

Primeiro e antes do mais, gostaria de expressar a minha enorme gratidão aos meus pais Álvaro Magalhães e Ana Paula Gamboa, que partilharam comigo todos os momentos da minha vida académica e me ajudaram com o seu encorajamento e inesgotável apoio durante todo este percurso. Meus Queridos Pais, obrigado por me darem a liberdade de vos amar.

À minha querida Mãe, o meu grande pilar e porto de abrigo, que tem uma vida tão cheia e, no entanto, eu sei que há sempre, sempre, lugar para mim. Que sempre me deu tudo, até mesmo o impossível. Que me educou de forma exemplar. Que me protege. Que me ajuda. Que faz sacrifícios. Que me ama. Única. A mais bonita. A melhor. Obrigado deste filho que te ama do fundo do coração.

Ao meu querido Pai, também ele um pilar da minha vida, que me incutiu desde cedo o valor do esforço, da vitória e do sacrifício. Que me dá tudo. O melhor na sua arte. O meu ídolo. A pessoa que me ensinou a enfrentar os desafios de olhos bem abertos. Que me protege. Que me ama. Único. O melhor. Do filho que te ama.

Gostaria igualmente de expressar todo o meu reconhecimento a toda a equipa médica da Clínica da Universidade de Navarra que me permitiu estar aqui hoje cheio de força e garra para vencer na vida, em especial ao Dr. José Manuel Aramendía Beitia e a toda a sua admirável equipa do departamento de Oncologia.

Agradeço também muito especialmente às Irmãs, professoras e funcionárias do Externato São José que me viram crescer e contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço também a todos os meus amigos, os verdadeiros, aqueles que me fazem sorrir, que tornam a minha vida mais rica e que nunca se esquecem de mim.

Dirijo igualmente a minha enorme gratidão à minha namorada Ana Catarina Magalhães pela enorme paciência e dedicação que tem por mim. Agradeço do fundo do coração a sua disponibilidade e ajuda nos momentos difíceis que enfrentei na faculdade. Tudo aquilo que vivemos até hoje, não teria sido possível se não gostássemos um do outro.

# ÍNDICE

<b>I Introdução</b>	1
<b>II Células Estaminais</b>	2
1- Perspectiva histórica	2
2- Definição	3
3- Classificação	3
4- Células Estaminais Embrionárias	4
5- Células Estaminais Adultas	4
6- Divisão das ASC de acordo com a origem embriológica	5
<b>III Células Estaminais Mesenquimais</b>	6
1- SHED	6
2- DPSC	6
3- SCAP	7
4- DFSC	7
5- PDLSC	8
6- BMSC	9
7- ADSC	10
<b>IV Células Estaminais Epiteliais</b>	10
<b>V Marcadores das Células Estaminais</b>	11
<b>VI Desenvolvimento do Dente e Tecidos de Suporte</b>	11
<b>VII Bioengenharia das Células Estaminais</b>	15
1- Factores de Crescimento	16
2- Matriz	17
3- Aplicações em Medicina Dentária	18
<b>VIII Substituição Dentária Biológica</b>	21
<b>IX Discussão e Conclusões</b>	25
<b>X Bibliografia</b>	31
<b>XI Anexos</b>	38

## Resumo

As células estaminais (SC) são células com capacidade de se auto-renovarem indefinidamente num estado indiferenciado e de se diferenciarem num ou mais tipos de células especializadas.

Estas apresentam um enorme potencial como fonte de células ou de tecidos para terapias regenerativas, terapias génicas, descoberta de novos fármacos, e identificação dos mecanismos de aparecimento e desenvolvimento de doenças.

A perda dentária por doença periodontal, lesões de cárie, trauma, ou uma variedade de desordens genéticas compromete a saúde oral. Actualmente existem diversas opções terapêuticas para a substituição de dentes ausentes, como por exemplo as próteses e os implantes dentários, todavia com riscos associados e sujeitos a falhas.

Recentemente, a bioengenharia dos tecidos dentários tem despertado mais e mais atenção. Existe um grande interesse no desenvolvimento de técnicas para a manipulação de SC, com o intuito de se instituírem tratamentos restauradores de tecidos e órgãos. É de grande importância para o Médico Dentista o conhecimento do seu comportamento biológico e técnicas de obtenção.

É objectivo deste trabalho apresentar os diversos tipos de SC importantes em Medicina Dentária com as suas características específicas, destacando algumas das suas aplicações para desenvolver novas terapias, com o intuito de restaurar a integridade estrutural dos tecidos dentários.

**Palavras-chave:** células estaminais, células estaminais dentárias, odontogénese, regeneração e dentes.

## **Abstract**

Stem Cells (SC) are cells with the capacity to self-renew indefinitely in an undifferentiated state and differentiate themselves in one or more specialized cell types.

They have a great potential as a source of cells or tissues for regenerative therapies, gene therapies, drug discovery, and identification of mechanisms of emergence and development of diseases.

Tooth loss due to periodontal disease, dental caries, trauma, or a variety of genetic disorders compromises human oral health. Currently there are several treatment options for the replacement of missing teeth, such as dentures and dental implants, but with associated risks and failures.

Recently, tooth tissue engineering has attracted more and more attention. There is a great interest in the development of techniques for the manipulation of SC, with the aim to establish restorative treatments of tissues and organs. It is very important to the Dentist the knowledge of their biological behavior and obtaining techniques.

The goal of this work is to present the various types of SCs important in Dentistry with their specific features, highlighting some of their applications to develop new therapies in order to restore the structural integrity of dental tissues.

**Keywords:** stem cells, dental stem cells, odontogenesis, regeneration and teeth.

## I – INTRODUÇÃO

A Medicina tem sofrido uma grande evolução nas últimas décadas. Desde as civilizações primitivas, com maior ou menor fundamentação teórica, o Homem procurou maneiras de resolver os seus problemas e prolongar a longevidade do seu bem-estar. Ao longo da história realizaram-se inestimáveis descobertas para o progresso da Humanidade – foi fundamental a contribuição de Hipócrates na medida em que tornou a Medicina moderna uma actividade dos Homens e não dos Deuses. O modo como passou a ser exercida reflecte o grau de desenvolvimento científico, tecnológico e cultural de um povo. Apesar dos avanços científicos na prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas doenças devastadoras, tais como a doença cardíaca, a diabetes, o cancro e doenças do sistema nervoso, tais patologias continuam a privar as pessoas de saúde, independência e bem-estar.

A Biologia através das suas investigações levou à descoberta das células estaminais (SC). O progresso da investigação no domínio das SC mostrou o seu enorme potencial como fonte de células ou de tecidos para terapias regenerativas, terapias génicas, descoberta de novos fármacos e identificação dos mecanismos de aparecimento e desenvolvimento de doenças. O desafio para os Médicos Dentistas na era das manipulações das SC e biotecnologia encontra-se iminente. As SC poderão ser utilizadas na formação de esmalte, dentina e/ou polpa dentária e tecidos de suporte, corrigindo assim defeitos resultantes de lesões de cárie, doença periodontal, traumas, anomalias congénitas, entre outros.

Este trabalho tem como objectivo abordar as SC e a sua aplicabilidade em Medicina Dentária, sendo de grande importância para o Médico Dentista o conhecimento do seu comportamento biológico e técnicas de obtenção. As recentes investigações irão certamente transformar a prática clínica diária numa magnitude muito maior do que a era da amálgama ou dos implantes dentários. Ligas metálicas, resinas compostas e até implantes deixarão de ser soluções permanentes. Em contraste, a manipulação das SC provenientes dos tecidos orais dará origem a novos tecidos que são compatíveis com os do próprio paciente. O seu fácil acesso e o facto de não serem órgãos vitais constituem um atractivo. É possível que, num futuro próximo, a biotecnologia seja útil na terapia endodôntica e periodontal, apesar de, actualmente, a ciência se encontrar distante de desenvolver órgãos dentários completos a partir de SC, devido aos mecanismos complexos da formação dentária.

## II - CÉLULAS ESTAMINAIS

### *1 – Perspectiva histórica*

Há mais de 40 anos que são usadas células estaminais adultas em Medicina, nomeadamente células estaminais hematopoiéticas (EH) e mais recentemente SC isoladas a partir do sangue do cordão umbilical, em doenças como a leucemia e anemia aplástica ou em linfomas <sup>(Bragança et al, 2010)</sup>.

Os cientistas descobriram maneiras de obter SC a partir de embriões de ratinhos há mais de 20 anos atrás. O estudo detalhado das SC do rato levou à descoberta, em 1998, da forma de isolar SC de embriões humanos e cultivar essas células em laboratório. Os embriões usados nesses estudos foram criados para fins de infertilidade por meio de procedimentos de fertilização *in vitro*, e quando deixaram de ser necessários para esse efeito, foram doados para pesquisa com o consentimento informado do doador <sup>(Stem Cells Basics, 2009)</sup>.

A comunidade médica e científica prevê que num futuro próximo, será possível utilizar SC no tratamento de cancro, diabetes, doença de Parkinson, doenças auto-imunes, insuficiência cardíaca, traumas musculares e até em perturbações neurológicas, entre muitas outras patologias <sup>(Bragança et al, 2010)</sup>.

Nesse sentido, com o objectivo de desenvolver tais tratamentos, os cientistas estudam intensamente as propriedades fundamentais das SC, que incluem: determinar com precisão como essas células se mantêm num estado indiferenciado, a sua capacidade de auto renovação por muitos anos e identificar quais os sinais electroquímicos que fazem com que se tornem células especializadas <sup>(Stem Cells Basics, 2009)</sup>.

Nos últimos anos, as SC têm sido amplamente utilizadas em muitas áreas médicas para a reparação e/ou regeneração dos tecidos e órgãos, por exemplo, ossos, ligamentos e coração. O objectivo da Medicina Regenerativa é recriar passo-a-passo *in vitro* todos os mecanismos e processos que a natureza utiliza durante a iniciação e morfogénese de um determinado órgão <sup>(Bluteau et al, 2008)</sup>.

Os tecidos dentários por norma apresentam um potencial de regeneração limitado. Contudo, os recentes avanços na pesquisa de SC e na Bioengenharia são uma nova perspectiva para a regeneração dos tecidos dentários na prática clínica futura <sup>(Nedel et al, 2009)</sup>.

## 2 – Definição

As SC podem ser definidas como células que se auto-replicam e são capazes de se diferenciar em pelo menos dois tipos diferentes de células. Ambas as condições devem estar presentes para que uma célula seja considerada uma SC (Mao, 2008). Estas células podem sofrer uma divisão simétrica, permitindo o aumento do seu número, ou assimétrica, em que não há alteração do número de células e se caracteriza pelo aparecimento de células com diferentes propriedades (Bluteau et al, 2008; Bragança et al, 2010) (figura 1).

## 3 – Classificação

Relativamente à classificação, as SC podem ser classificadas pela sua origem e potencial de diferenciação (figura 2). Quanto à sua origem, podem ser (Can, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Suchánek et al, 2010).

- Embrionárias (ES), referem-se às células indiferenciadas originadas da massa celular interna do blastocisto do embrião antes da implantação no útero. Estas são notáveis por apresentarem duas propriedades fundamentais: o potencial de auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem em todos os tipos de células do organismo adulto, excepto a placenta. Mas existem desvantagens, como a sua instabilidade genética, a obrigatoriedade do seu transplante para hospedeiros imunocomprometidos, o risco de formação de teratocarcinomas e de contaminação, além de questões éticas. (Soares et al, 2007; Mao, 2008; Nedel et al, 2009)

- Adultas ou Somáticas (ASC), localizadas em vários tecidos do organismo adulto que se mantêm num estado indiferenciado, ou não especializado, com capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem para originar todos os tipos de células especializadas do tecido onde estão presentes (Bragança et al, 2010). A viabilidade da sua utilização na regeneração e reconstrução de tecidos tem suscitado grande interesse na comunidade científica, dado o aumento de leis em diversos países que proíbem o uso de ES (Soares et al, 2007).

Recentemente foi descrita a criação de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSC) a partir de células somáticas humanas ou de rato através da expressão forçada de factores de transcrição definidos como essenciais para a

manutenção do estado de pluripotência das SC. A criação destas células provocou uma explosão de curiosidade científica e de interesse industrial, uma vez que as iPSC são semelhantes às SC e, portanto, potencialmente poderiam substituir SC para aplicações clínicas, contornando as preocupações éticas sobre o uso de embriões. Além disso, iPSC apresentam a vantagem de serem células derivadas de doentes, evitando a rejeição pelo sistema imunológico em aplicações da terapia celular. (Bragança et al, 2010; Oda et al, 2010)

Quanto ao seu potencial de desenvolvimento, podem ser (Can, 2008; Bragança et al, 2010),

- Totipotentes, células capazes de dar origem a todas as células diferenciadas do organismo adulto, incluindo a parte fetal da placenta, o cordão umbilical e as membranas extra-embrionárias;
- Pluripotentes, células capazes de se diferenciarem em todos os tecidos do organismo humano, excluindo a placenta e anexos embrionários;
- Multipotentes, células capazes dar origem a um número limitado de tipos de células;
- Unipotentes, células capazes de se diferenciarem num único tecido.

#### 4 – Células Estaminais Embrionárias

As ES têm uma origem embrionária e são isoladas a partir da massa interna de blastócistos pré-implantados. A maioria foi isolada a partir de blastócitos excedentários dos processos de fertilização *in vitro* e que acabam por ser doados para fins de pesquisa científica com o consentimento informado dos doadores. Actualmente, no que diz respeito às ES têm sido utilizadas pelo menos seis fontes embrionárias para dar origem a linhas de células estaminais pluripotentes (figuras 3 e 4). Todas as abordagens envolvem o isolamento de células viáveis durante uma fase inicial de desenvolvimento, seguido do crescimento destas células em meio de cultura apropriado (Battey et al, 2006).

#### 5 – Células Estaminais Adultas

As ASC estão presentes nos órgãos e tecidos fetais e adultos, e assim correspondem a um grupo heterogéneo composto por células de diferentes fontes, desde as isoladas a partir do sangue do cordão umbilical e da placenta até às provenientes de tecidos maduros. A sua identificação efectua-se através de vários critérios histológicos,

morfológicos e bioquímicos. Em condições fisiológicas normais, existem nos vários tecidos em pequenos nichos celulares, sendo por isso de difícil isolamento. Os nichos formam microambientes fornecendo sinais extrínsecos (tal como moléculas sinalizadoras, interações entre as SC com a matriz extracelular e células vizinhas) que em conjunto com os factores intrínsecos das SC determinam o seu comportamento e destino que é influenciado por condições externas, como por exemplo a temperatura, o pH, os factores de crescimento, a glicose, o oxigénio, as hormonas, entre outros.

As SC são morfologicamente idênticas ou muito semelhantes às células dos tecidos onde se encontram, o que torna o seu isolamento microscópico impossível. Para contornar este problema, são utilizados marcadores bioquímicos próprios das SC, como por exemplo receptores membranares e moléculas fluorescentes que aderem a esses receptores e emitem energia luminosa permitindo a sua visualização, através de duas técnicas principais: triagem de células activada por fluorescência (FACS) e microscopia de fluorescência. Para além das técnicas acima referidas, muitas outras técnicas de Biologia Molecular são utilizadas no processo de identificação de ASC, como por exemplo a reacção em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), análises northern e western ou a utilização de genes repórteres <sup>(Bragança et al, 2010)</sup>.

#### *6 – Divisão das ASC de acordo com a origem embriológica*

Dado que a formação dentária resulta de interacções epiteliais e mesenquimais <sup>(Ohazama et al, 2004; Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008)</sup>, devem ser consideradas duas populações de ASC, as SC epiteliais (EpSC), que originam os ameloblastos e o aparelho de esmalte, e as SC mesenquimais (MSC), que originam os odontoblastos, cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal (PDL) <sup>(Bluteau et al, 2008; Morszeck et al, 2009)</sup>.

Nos dentes, foram sugeridos dois nichos celulares diferentes de SC: a alça cervical (cervical loop) dos incisivos dos roedores para EpSC (figura 5), e o nicho perivascular da polpa dentária adulta para MSC <sup>(Harada et al, 1999; Shi & Gronthos, 2003; Bluteau et al, 2008)</sup>. Além da polpa dentária, outras populações de MSC têm sido isoladas de tecidos dentários humanos, como o PDL e o folículo dentário, contudo muito pouco se sabe sobre a existência de um nicho nestes tecidos <sup>(Morszeck et al, 2005; Seo et al, 2005)</sup>.

### III – CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS (MSC)

As MSC descritas primeiramente por Friedenstein et al., são células adultas multipotentes com a capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens do tecido conjuntivo, incluindo condrócitos, miócitos, células adiposas, células do tecido conectivo e osteoblastos, podendo ser isoladas de diversas fontes (Bittencourt et al, 2006; Portinho et al, 2006; Yen & Sharpe, 2008).

Apresentam propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, através da secreção de factores solúveis (IL-6, TGF-beta 1, factor de crescimento hepatócito, sintase induzível de óxido nítrico e prostaglandinas, por exemplo), e podem ser transplantadas nos doentes de maneira autóloga (Bittencourt et al, 2006; Yen & Sharpe, 2008).

Os principais progenitores mesenquimatosos, derivados dos dentes e medula óssea, importantes na Medicina Dentária são (Yen & Sharpe, 2008; Ulmer et al, 2010):

#### *1 – SHED (SC de dentes decíduos exfoliados humanos)*

Miura et al. demonstrou que é possível o isolamento de SHED da polpa remanescente de incisivos decíduos exfoliados. As SHED são altamente proliferativas e clonogénicas, capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, tais como adipócitos, células nervosas e odontoblastos. Apresentam uma grande capacidade osteoindutora *in vivo* e expressam marcadores neurais específicos (Miura et al, 2003; Suchánek et al, 2010; Ulmer et al, 2010). Contudo, são incapazes de reconstituir um complexo dentina-polpa (Yen & Sharpe, 2008). Os incisivos e os caninos decíduos parecem ser a melhor fonte para a sua recolha (Biogenetics, 2006; PRWeb, 2010).

Os dentes decíduos são uma fonte importante de SC para reparar estruturas dentárias, induzir a formação óssea e, possivelmente, no tratamento de lesões neurológicas e doenças degenerativas (Miura et al, 2003).

#### *2 – DPSC (SC da polpa dentária adulta)*

Isoladas por Gronthos et al., representam um grupo de células adultas, localizadas essencialmente na zona rica em células da polpa dentária, com grande capacidade de auto-renovação e diferenciação em várias linhagens celulares, por exemplo, adipócitos, osteoblastos e neurónios (Peng et al, 2009; Gronthos et al, 2000; Yan et al, 2011).

São multipotentes, com potencial de regeneração óssea e estão envolvidas na formação de odontoblastos e dentina reparadora *in vivo*. Além de expressarem marcadores das MSC Stro-1 e CD146, expressam também marcadores de perícito 3G5, neurais e do músculo liso e endotelial <sup>(Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008)</sup>. As DPSC podem sobreviver por longos períodos de tempo, passando por mais de 80 passagens, sem sinais evidentes de senescência. Surpreendentemente, após várias passagens, as DPSC ainda exibem plasticidade e capacidade para formação de pequenos nódulos calcificados e fragmentos ósseos *in vitro* <sup>(Aquino et al, 2009)</sup> (figura 6).

Estudos desenvolvidos por Braut et al., indicam que SC da polpa dentária de incisivos de ratinhos são capazes de se diferenciar em odontoblastos, osteoblastos e condrócitos, e são capazes de originar uma matriz funcional quando transplantadas para cápsulas renais.

O isolamento de DPSC, à semelhança de outras SC, é difícil uma vez que os nichos contêm populações heterogêneas e marcadores de SC específicos ausentes. As DPSC podem ser criopreservadas, mantendo a sua capacidade de diferenciação e multipotência após criopreservação.

A capacidade proliferativa e inibitória da alorreactividade das células T, fazem das DPSC excelentes candidatos ao transplante de órgãos, reconstrução dos tecidos e para fins terapêuticos <sup>(Yen & Sharpe, 2008; Aquino et al, 2009)</sup>.

### 3 – SCAP (SC da papila apical)

Isoladas do ápex de raízes em desenvolvimento, estas células têm a capacidade de se diferenciar em odontoblastos, adipócitos, osteoblastos, condroblastos e neurónios. São mais proliferativas do que as DPSC e as PDLSC (SC do PDL), tornando-se assim mais adequadas à regeneração celular e, preferencialmente, à formação de raízes. São facilmente isoladas a partir de terceiros molares <sup>(Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Morsczeck et al, 2009; Ulmer et al, 2010)</sup>.

### 4 – DFSC (SC do folículo dentário)

As DFSC foram isoladas a partir de folículos dentários do germe dentário em desenvolvimento de terceiros molares. Diferenciam-se em osteoblastos, cementoblastos, fibroblastos, adipócitos, condrócitos e neurónios e expressam marcadores Notch1,

STRO-1 e nestina. As DFSC quando transplantadas em ratinhos são capazes de formar um tipo de PDL após 4 semanas (Peng et al, 2009; Morszeck et al, 2010; Ulmer et al, 2010).

A diferenciação e função das DFSC são controladas por uma rede de moléculas regulatórias, incluindo factores de crescimento e citoquinas. Estudos referem que EMD (proteínas derivadas da matriz do esmalte), BMP-2/-7, Col-I e dNCP (proteína não colagénica da matriz extracelular dentária) extraídas da dentina estimulam as DFSC a diferenciarem-se em cementoblastos.

A heterogeneidade das DFSC pode desempenhar um papel importante na regeneração dos tecidos (Morszeck et al, 2005; Peng et al, 2009).

### 5 – PDLSC (SC do ligamento periodontal)

O PDL é um tecido conjuntivo especializado que se origina a partir das células da crista neural do folículo dentário. As PDLSC obtidas a partir do PDL são células multipotentes com características semelhantes às BMSC (SC do estroma da medula óssea) e DPSC, capazes de se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos, células da crista neural, odontoblastos, condrócitos, adipócitos e fibroblastos (Seo et al, 2004; Morszeck et al, 2009; Peng et al, 2009; Ulmer et al, 2010). Expressam marcadores STRO-1 e CD146/MUC18 (Seo et al, 2005; Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008) e podem ser recolhidas a partir de raízes de dentes extraídos (Morszeck et al, 2009; Ulmer et al, 2010). Expressam também marcadores osteogénicos, como a fosfatase alcalina e a sialoproteína óssea, e respondem a factores ósseos indutores como a hormona da paratiróide, IGF-1, BMP-2 e TGF  $\beta$ 1 (Seo et al, 2004).

Num estudo recente em suínos, PDLSC foram utilizadas para tratar lesões periodontais (Ulmer, 2010). Combinadas com SCAP provenientes de sisos inclusos e uma matriz de hidroxiapatite/tricálciofosfato (HA/TCP), foram transplantadas para os alvéolos de suínos em idade juvenil, dando origem a uma raíz e a um complexo periodontal capaz de suportar uma coroa em cerâmica, cumprindo assim a função de um dente natural. (Yen & Sharpe, 2008; Morszeck et al, 2009; Ulmer et al, 2010).

A criopreservação das PDLSC mantém as características das SC e a capacidade regeneração tecidual *in vivo*, sugerindo um grande potencial para a regeneração de tecidos periodontais (Seo et al, 2005).

## 6 – BMSC (SC do estroma da medula óssea)

Os tecidos dentários também podem ser regenerados a partir de ASC multipotentes que não sejam de origem dentária, como o epitélio oral embrionário que consegue estimular uma resposta odontogénica no mesênquima. A medula óssea não é apenas uma fonte de EH, MSC multipotentes também podem ser isoladas e são capazes de proliferar bem em cultura <sup>(Ulmer et al, 2010)</sup>.

As BMSC provêm de populações de células na medula óssea e diferenciam-se em várias linhagens mesenquimais, tais como, osteoblastos, condrócitos, mioblastos, adipócitos e células semelhantes a neurónios, entre outras. A regeneração óssea tem sido o ponto crítico da investigação das BMSC <sup>(Peng et al, 2009; Ulmer et al, 2010)</sup>. São capazes de originar *in vivo* cimento, PDL e osso alveolar após implantação em zonas de defeitos periodontais. Partilham as mesmas características que as DPSC; ambas têm a capacidade de formar estruturas do tipo ósseo e dentário, contudo as BMSC apresentam um potencial odontogénico menor. Deste modo, a medula óssea é uma fonte alternativa de MSC para o tratamento de doenças periodontais <sup>(Bluteau et al, 2008; Peng et al, 2009)</sup>.

As BMSC podem ser reprogramadas para dar origem a células semelhantes a ameloblastos. A recombinação de BMSC com células orais epiteliais de embriões de ratinhos expressam genes odontogénicos, tais como, *Pax9*, *Msx1*, *Lhx7*, *DMP1* e *DSPP*. Alguns autores referem que a capacidade de diferenciação das BMSC diminui significativamente com a idade dos dadores.

As BMSC podem ser induzidas em células mesenquimais e epiteliais, oferecendo uma nova possibilidade na Bioengenharia relacionada com a Medicina Dentária <sup>(Yen & Sharpe, 2008; Peng et al, 2009; Ulmer et al, 2010)</sup>.

Em termos terapêuticos, as BMSC têm sido utilizadas nos casos de elevação do seio maxilar, sendo colhidas numa forma minimamente invasiva da crista íliaca e inseridas no seio maxilar. Desta forma, deixa de ser necessário a remoção cirúrgica do osso autólogo antes dos procedimentos de implantes.

As BMSC também podem ser isoladas partir da medula óssea da mandíbula, embora em menor quantidade, mas apresentam um potencial osteogénico elevado <sup>(Ulmer et al, 2010)</sup>.

## 7 – ADSC (SC derivadas do tecido adiposo)

As ADSC contêm um grupo de MSC pluripotentes com capacidade de diferenciação em várias linhagens, incluindo a osteogênese, a condrogênese e a adipogênese. O tecido adiposo é facilmente obtido numa forma menos invasiva e em quantidades maiores do que as células da medula óssea, o que faz com que as ADSC sejam uma fonte de SC muito atractiva.

Em 2005, foi proposto a hipótese de as ADSC se diferenciarem em linhagens odontogénicas e utilizadas para fins de regeneração dentária em idosos com ausências dentárias.

Expressam genes relacionados com a mineralização: Cbfa1, Osx, BSP, OCN e DMP1, e marcadores odontogénicos: Msx1, Msx2, Lhx7 e Pax9, relacionados com a diferenciação em células semelhantes a odontoblastos. Expressam também marcadores osteogénicos, incluindo a fosfatase alcalina, colagénio tipo I, osteopontina e osteocalcina. Associadas a uma matriz de colagénio, têm a capacidade de formar tecido ósseo *in vivo* após 8 semanas, quando transplantadas em ratinhos, sendo uma importante ferramenta terapêutica na regeneração óssea (Peng et al, 2009).

## IV – CÉLULAS ESTAMINAIS EPITELIAIS (EpSC)

O esmalte dentário é formado a partir dos ameloblastos derivados de EpSC, que são as únicas células de origem ectodérmica que desempenham um papel na odontogênese. Após a erupção dentária, as EpSC desaparecem, deixando de haver células disponíveis para serem utilizadas na terapia celular (Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Ulmer et al, 2010). Consequentemente, EpSC que poderiam ser estimuladas *in vivo* para formar o esmalte, não estão presentes nos dentes humanos. A Bioengenharia parece ser a única possibilidade para recriar uma superfície de esmalte (Bluteau et al, 2008).

Podem ser obtidas a partir de terceiros molares de animais ainda em desenvolvimento, sendo enzimaticamente dissociadas do epitélio e associadas *in vitro* a MSC do mesmo dente para dar origem a estruturas dentárias (Bluteau et al, 2008; Ulmer et al, 2010).

Ao contrário do homem, os incisivos dos roedores crescem durante toda a vida, graças às ABC (apical bud cells), uma fonte de células no epitélio apical, conhecida como a alça cervical nos ratinhos, outra fonte de EpSC, que é responsável pela produção

contínua de esmalte. Este nicho celular é regulado por uma complexa rede integrada de moléculas, tais como BMP, activina, folistatina, FGF-3 e FGF-4, permitindo a sua manutenção e funcionalidade. Foi demonstrado que as ABC em conjunto com as DPSC desenvolvem estruturas semelhantes a molares; a forma mais natural da coroa resulta quando as células se encontram na proporção de 1:1 (Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Ulmer et al, 2010).

Esta fonte de EpSC não pode ser utilizada no tratamento, uma vez que exigiria a introdução de células de roedores no homem. A utilização de EpSC que não sejam de origem dentária, só será possível com a transferência de genes criando um potencial odontogénico, sendo um objectivo a atingir na próxima década (Bluteau et al, 2008).

## **V – MARCADORES DAS SC**

Os marcadores para as SC são de extrema importância, pois estas células residem em diferentes locais dentro do tecido. Os marcadores permitem identificar, isolar e caracterizar as SC. STRO-1 é o marcador das MSC mais conhecido e a sua expressão diminui gradualmente durante a expansão em cultura, limitando o seu uso no isolamento ou identificação nas passagens iniciais. Marcadores de células diferenciadas também podem ser utilizados para caracterizar as SC, como por exemplo a osteocalcina que é um marcador das DPSC. Actualmente são utilizados os seguintes marcadores microvasculares, para localização de tais células: STRO-1, Factor Von Willebrand e CD146. Pesquisadores cultivaram SC da medula óssea e da polpa, provenientes de terceiros molares impactados, e analisaram a expressão genética dessas células, através do método cDNA *Microarray*. Foi demonstrado um padrão genético altamente semelhante entre esses dois tipos celulares, com excepção de alguns genes, incluindo o IGF-2 e colagéneo tipo XVII $\alpha$ 1, no entanto ainda é desconhecida a expressão dessa diferença (Soares et al, 2007; Ulmer et al, 2010).

## **VI – DESENVOLVIMENTO DO DENTE E TECIDOS DE SUPORTE**

Para os Biólogos, o modelo da odontogénese oferece um paradigma útil para o estudo e aplicação das SC (Yen & Sharpe, 2008) (figuras 7 e 8).

O desenvolvimento dentário é controlado por interações recíprocas epitélio-mesênquima, nas quais vários mediadores moleculares estão envolvidos (Bluteau et al, 2008; Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009) (tabela 1). A maioria destas moléculas sinalizadoras são membros da família do TGF, FGF, BMP, Hedgehog, EDA, Nocth e WNT (Soares et al, 2007; Koussoulakou et al, 2009). Há também uma grande expressão ectomesenquimal dos genes PAX9 e MSX1 desde a fase de iniciação do desenvolvimento dentário (Koussoulakou et al, 2009) (figura 9). Assim, mais de 90 genes têm sido identificados a partir do epitélio oral, epitélio dentário e mesênquima dentário com um papel redundante na odontogênese (Nanci, 2008). O epitélio do primeiro arco é essencial para a iniciação do desenvolvimento dentário. No entanto, com o tempo, o potencial odontogénico passa a ser assumido pelo ectomesênquima, sendo responsável pela morfogênese epitelial e histodiferenciação (Bluteau et al, 2008; Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Estas interações ocorrem não só durante o desenvolvimento normal, mas também em experiências com tecidos de diferentes espécies (Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Por exemplo, quando o epitélio do primeiro arco do camundongo é combinado com a crista neural, craniana ou caudal, na câmara anterior do olho, ocorre formação de um dente (Nanci, 2008) (figura 10).

Os dentes começam a formar-se no final da 5ª semana de gestação a partir de uma banda de epitélio espessado que recobre a cavidade oral primitiva ou estomodeu (Nanci, 2008; Koussoulakou et al, 2009; Ulmer et al, 2010). Cada banda epitelial, denominada banda epitelial primária, rapidamente dá origem a duas subdivisões: a lâmina dentária, que se forma primeiro, e a lâmina vestibular, que se forma logo depois e é posicionada logo em frente da lâmina dentária (Nanci, 2008). Na região anterior da lâmina dentária, as células da crista neural vão migrar da ectoderme por estímulos odontogénicos que vêm da mesoderme subjacente, condensando em 10 zonas em cada maxilar (10 dentes de leite em cada maxilar). Estas zonas de condensação vão continuar ligadas à ectoderme pela lâmina dentária, constituindo a fase de botão.

A transição de botão para capuz marca o começo das diferenças morfológicas entre germes dentários que dão origem a diferentes tipos de dentes. As alterações morfológicas têm início na fase de capuz e são coordenadas pelos nós de esmalte, através de vias de sinalização temporárias do epitélio, e reguladas pela expressão de genes homeobox (Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Nesta fase, já é possível identificar os elementos que formam o dente e os seus tecidos de suporte (Nanci, 2008). O crescimento externo do epitélio, que superficialmente parece um capuz a rodear uma

esfera de ectomesênquima condensado, é referido como órgão dentário, mas na verdade deveria ser chamado órgão de esmalte, porque é considerado o precursor dos ameloblastos e dará origem ao esmalte dentário. A esfera de células ectomesenquimais condensadas, denominada papila dentária, formará a dentina e a polpa. O ectomesênquima condensado, que limita a papila dentária e encapsula o órgão de esmalte – o folículo ou saco dentário – dá origem aos tecidos de suporte do dente através dos cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos. O órgão de esmalte, a papila dentária e o folículo dentário constituem juntos o órgão dentário ou germe dentário (Bluteau et al, 2008; Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009).

O crescimento do germe dentário leva à próxima fase de desenvolvimento dentário, a fase de sino, assim denominado porque o órgão de esmalte se torna parecido com um sino conforme o epitélio, na sua superfície interna, aprofunda o capuz. Durante esta fase, a coroa dentária assume a sua forma final (morfodiferenciação) e as células que irão produzir os tecidos duros da coroa (ameloblastos e odontoblastos) adquirem o seu fenótipo distintivo (histodiferenciação). As zonas de condensação ectodérmica organizam-se, quebrando o contacto com a superfície e diferenciam-se em 4 zonas: epitélio adamantínico externo, epitélio adamantínico interno, células do retículo estrelado e estrato intermédio (Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Os epitélios interno e externo do esmalte são contínuos e a região onde se encontram é conhecida como a alça cervical; neste ponto as células continuam a dividir-se até que a coroa atinja o seu tamanho total e, após a formação da coroa, origina o componente epitelial para a formação da raiz – a bainha epitelial de Hertwig (Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008). As células do retículo estrelado têm a função de nutrir os ameloblastos, pois estes afastam-se da zona vascularizada. Há dois eventos importantes que ocorrem durante esta fase: a lâmina dentária desintegra-se, separando o dente em desenvolvimento do epitélio oral, e o epitélio interno do esmalte dobra-se, tornando possível reconhecer a forma da futura coroa do dente (Nanci, 2008; Koussoulakou et al, 2009). A fragmentação da lâmina dentária resulta na formação de agrupamentos de células epiteliais – pérolas epiteliais – que normalmente se degeneram, mas algumas podem persistir e formar pequenos quistos de erupção, odontomas, dentes supranumerários e atrasos na erupção (Nanci, 2008).

O próximo passo no desenvolvimento dentário é a diferenciação final dos ameloblastos e odontoblastos e a formação dos dois principais tecidos duros do dente: a dentina e o esmalte, num processo denominado histodiferenciação. As células ectomesenquimais da papila dentária aumentam rapidamente de tamanho, migram para

o epitélio interno, e aí diferenciam-se em odontoblastos. Estes, condicionados por estímulos adequados (TGF- $\beta$ 1, BMP-2, IGF), começam a secretar a pré-dentina (produção centrípeta) e a primeira camada é mineralizada em dentina (Bluteau et al, 2008; Nanci, 2008; Koussoulakou et al, 2009). A pré-dentina, por sua vez, vai estimular a produção de esmalte pelos ameloblastos com a sua porção apical voltada para a papila (produção centrífuga). Conforme a matriz orgânica é depositada, os odontoblastos movimentam-se em direcção ao centro da papila, deixando para trás uma extensão citoplasmática, ao redor da qual a dentina é formada. As células que formam o esmalte, os ameloblastos, movem-se em sentido oposto à dentina, deixando para trás um aumento contínuo da espessura do esmalte (Koussoulakou et al, 2009).

Relativamente à formação radicular, esta inicia-se rapidamente quando se forma a bainha epitelial de Hertwig (Yen & Sharpe, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Esta bainha cresce ao redor da polpa dentária, entre a papila e o folículo dentário, até envolvê-la totalmente, excepto na sua porção basal. À medida que as células epiteliais da bainha se expandem progressivamente, inicia-se a diferenciação dos odontoblastos a partir das células ectomesenquimais da periferia da polpa, adjacentes à bainha radicular, dando origem a dentina radicular. Alguns autores referem que as células da bainha também se podem diferenciar em cementoblastos (Nanci, 2008; Koussoulakou et al, 2009).

Com o início da formação radicular, a coroa do dente cresce no sentido oposto à base do osso da cripta, e as células da bainha degeneram, para formar grupos de células epiteliais, separadas do tecido conjuntivo circundante por uma lâmina basal, conhecidas como *restos epiteliais de Malassez*. Após a fragmentação da bainha, células ectomesenquimais do folículo dentário penetram entre as fenestrações epiteliais, tornam-se justapostas à dentina radicular recém-formada e diferenciam-se em cementoblastos, que originam o cimento. As células do PDL e os feixes de fibras também se diferenciam a partir do folículo dentário através dos fibroblastos. O PDL, como um amortecedor de forças, é considerado o principal impulsionador para o processo de erupção dentária. Algumas evidências recentes indicam que o osso, no qual os feixes de fibras do ligamento são ancorados, é igualmente formado pelas células que se diferenciam a partir do folículo dentário através dos osteoblastos (Yen & Sharpe, 2008).

O desenvolvimento do dente permanente faz-se a partir de um botão embrionário que se liga ao epitélio oral pela lâmina dentária, por cima do botão do dente decíduo. O desenvolvimento deste ocorre da mesma forma (Nanci, 2008). O resumo da formação dentária está representado na figura 11.

A formação radicular do dente é o aspecto menos estudado do desenvolvimento dentário em termos de expressão de genes e sinalização molecular, mas sabe-se que os factores FGF10 e NFI-C são essenciais para a sua formação (Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008).

## VII – BIOENGENHARIA DAS SC

Anomalias congénitas, doenças dentárias adquiridas e tumores odontogénicos afectam milhões de pessoas, o que faz da patologia oral o segundo problema clínico mais frequente (Koussoulakou et al, 2009). A perda dentária e dos tecidos periodontais pode resultar no movimento dos dentes remanescentes, dificuldade na mastigação, fonação, desequilíbrio na musculatura e comprometimento da estética dentária e do sorriso, comprometendo a auto-estima (Soares et al, 2007; Bluteau et al, 2008). No mundo ocidental, estima-se que 85% dos adultos, tenham algum tratamento dentário. Sete por cento perdeu um ou mais dentes pelos 17 anos. Após os 50 anos, uma média de 12 dentes estão a ponto de serem perdidos (Nanci, 2008). Actualmente existem diversas opções terapêuticas para a substituição dos dentes ausentes, como por exemplo as próteses e os implantes dentários, todavia com riscos associados e sujeitos a falhas (Soares et al, 2007; Bluteau et al, 2008; Koussoulakou et al, 2009).

Com os avanços nos conhecimentos das SC e conceitos emergentes da Bioengenharia, a substituição dentária biológica poderá ser uma alternativa para a substituição dos dentes perdidos (Yen & Sharpe, 2008). O desenvolvimento de técnicas para a manipulação de SC, com o intuito de se instituírem tratamentos restauradores de tecidos e órgãos, é um dos grandes objectivos.

Para a Bioengenharia é essencial uma tríade composta por SC, uma matriz extracelular e factores de crescimento como estímulo para a diferenciação celular (Soares et al, 2007) (figura 12). O objectivo é cultivar as SC com agentes indutores odontogénicos através de interacções epiteliais-mesenquimais, programando-as com ajuda de uma matriz extracelular, para se diferenciarem nas várias linhagens dentárias (Bluteau et al, 2008; Yen & Sharpe, 2008).

## *1 – Factores de Crescimento*

Para todos os eventos do desenvolvimento, uma complexa cascata de expressões de genes ocorre para direccionar as células para o correcto local e trajecto apropriado de diferenciação. Estes genes codificam factores de transcrição que regulam a síntese de várias proteínas sinalizadoras (factores de crescimento). Estas proteínas secretadas extracelularmente são agentes indutores, que regulam as interacções entre as camadas de tecido odontogénico e interferem na multiplicação celular, morte celular e histodiferenciação (Nanci, 2008; Koussoulakou et al, 2009). Compreendem principalmente cinco famílias proteicas: BMP, FGF, proteínas Hedgehog, WNT e TNF. A família BMP faz parte da super-família TGF- $\beta$ , composta por 25 factores moleculares. As BMP podem ser divididas em 4 sub-famílias distintas: a primeira BMP-2 e 4; a segunda BMP-3 e BMP-3B, esta última também conhecida como fator de crescimento/diferenciação 10 (GDF-10); a terceira BMP 5, 6, 7 e 8 e a quarta GDF 5, 6 e 7, também conhecidas por proteínas morfogenéticas 1, 2 e 3 derivadas da cartilagem.

Num estudo realizado, através do método de hibridização e posterior análise com PCR, observou-se a expressão de BMP-2, BMP-4, BMP-7, BMP-8, GDF-5 e GDF-6 nas polpas dentárias de incisivos de ratinhos. Os autores afirmam que estes factores são críticos no desenvolvimento dentário e reparação pulpar (Soares et al, 2007).

As BMP também são expressas no epitélio estrelado do órgão de esmalte durante a fase de capuz e estão associadas à diferenciação dos ameloblastos e odontoblastos. No início da morfogénese dentária, BMP-2, BMP-4, BMP-7 agem como importantes sinalizadores epiteliais que regulam a diferenciação do mesênquima derivado da crista neural numa linhagem odontogénica, mas também determinam o número e a posição das cúspides dos dentes (Soares et al, 2007; Nanci, 2008) (figura 13).

Iohara et al. cultivou e tratou com BMP-2 células da polpa dentária de porcos e, posteriormente, transplantou-as para dentes sem polpa de cães. A expressão do RNAm de sialofosfoproteínas da dentina (Dspp) e de metaloproteinases-20 da matriz, (MMP-20) confirmou a diferenciação odontoblástica e a formação de dentina (Iohara et al, 2004).

Os membros da família FGF regulam a expressão de diversos genes e induzem a proliferação do mesênquima, desde o início do desenvolvimento dentário até à formação da última cúspide (Soares et al, 2007; Nanci, 2008).

Relativamente aos membros da família Hedgehog, Shh é o único ligante Hh expresso nos dentes e possui duas funções no início da odontogénese: estimula a

proliferação epitelial na fase do botão e aumenta a sobrevivência da célula epitelial na fase de capuz.

A maioria dos genes Wnt é expressa pelo epitélio dentário, sendo que o Wnt7b interage na sinalização Shh para o estabelecimento dos limites entre a ectoderme oral e dentária, posicionando os locais de formação das estruturas dentárias. Os TNF são cruciais na formação das cúspides dos molares <sup>(Soares et al, 2007)</sup> (ver anexo 1).

## 2 – Matriz

A matriz extracelular é composta por materiais sintéticos ou naturais e terá que ser biocompatível, não irritante e resistente. É essencial, pois fornece o suporte necessário para o transporte de nutrientes, oxigênio e resíduos metabólicos. Os componentes da matriz funcionam ativando a morfogênese das células implantadas, enquanto esta é gradualmente degradada e substituída pelo tecido regenerado <sup>(Soares et al, 2007)</sup>.

Diferentes materiais de transporte têm sido analisados pela sua capacidade de permitir e facilitar o transplante e a diferenciação das células, nomeadamente esponjas de colagénio, HA/TCP, fosfato de cálcio, polímeros de fibrina cerâmica, alginato, matrizes de gelatina PCL e outros polímeros <sup>(Ulmer et al, 2010)</sup>. Para a formação de tecido dentário têm sido utilizadas as matrizes PGA e PLGA, ambas semelhantes no suporte de crescimento dos tecidos dentários altamente organizados. Um sistema de matriz tridimensional, a partir do colagéneo tipo I, também pode ser utilizado. Num estudo realizado por Deng et al., cujo objectivo era avaliar a resposta das SC provenientes do primeiro arco branquial de ratinhos ao estímulo por TGF- $\beta$ 1 e dNCP através da expressão de proteínas características dos odontoblastos, apenas no grupo tratado somente com o TGF- $\beta$ 1 não houve formação de tecido semelhante ao complexo pulpo-dentinário. Isto sugere que as proteínas derivadas da matriz desempenham uma função essencial na diferenciação odontoblástica. Fibroblastos isolados a partir da polpa dentária foram cultivados numa matriz composta por fibras de ácido poliglicólico e, após 60 dias, exibiram celularidade semelhante à encontrada na polpa humana normal, indicando que esta matriz apresenta boas propriedades para a sua utilização em Bioengenharia <sup>(Soares et al, 2007)</sup>. A matriz extracelular deve prover adequados parâmetros fisiológicos para permitir a cultura das células quer *in vitro* quer *in vivo* <sup>(Ulmer et al, 2010)</sup>.

### 3 – Aplicações das SC em Medicina Dentária

A investigação de SC em Medicina Dentária representa um potencial terapêutico na regeneração dos vários tecidos, tais como, o tecido ósseo, o periodonto, ou num futuro próximo, a formação de dentes <sup>(Ulmer et al, 2010)</sup>. Tem sido proposta a utilização de SC nas mais diversas áreas da Medicina Dentária, como sejam a Dentisteria, a Endodontia, a Periodontologia, e toda a área da reabilitação oral relacionada com a substituição de dentes ausentes e formação óssea <sup>(Soares et al, 2007)</sup>.

Num estudo *in vitro* realizado por Alhadlaq e Mao, foram isoladas MSC da medula óssea de ratinhos e induzidas para se diferenciarem em células condrogénicas e osteogénicas mediante um estímulo com TGF- $\beta$ . As MSC foram encapsuladas em duas camadas de matriz composta por hidrogel de polietilenoglicol e moldadas em forma de côndilo de humanos. Posteriormente estes moldes foram implantados em dorsos de ratinhos imunodeficientes. Observou-se a formação de uma estrutura condilar após 8 semanas de implantação <sup>(Alhadlaq & Mao, 2003)</sup> (figura 14).

Abukawa et al. isolaram MSC provenientes de porcos, cultivaram estas células numa matriz de ácido poli-dl-láctico-coglicólico e incubaram por 10 dias num meio de cultura com suplemento osteogénico. As amostras foram depois transplantadas para defeitos ósseos mandibulares induzidos cirurgicamente e após 6 semanas realizou-se a análise histológica, clínica e radiográfica. Os defeitos ósseos foram preenchidos com um tecido denso, semelhante ao osso, apresentando osteoblastos, osteócitos, vasos sanguíneos e osso trabeculado <sup>(Abukawa et al, 2009)</sup>.

Park et al. obtiveram três tipos de tecidos dentários derivados de ASC a partir de molares imaturos extraídos de cães Beagle. Mais tarde, transplantaram PDLSC, DPSC e DFSC para zonas de defeito periapical. As amostras foram avaliadas clínica e histologicamente e as PDLSC revelaram melhor capacidade de regeneração do PDL, osso e cimento, bem como do nervo periférico e vasos sanguíneos <sup>(Park et al, 2010)</sup>. Laino et al. demonstraram a presença de ASC no LPO com propriedades clonogénicas e alta taxa proliferativa. Estimularam estas células *in vivo* a diferenciarem-se em cementoblastos e após 4 semanas observou-se acumulação cálcica. Ao serem transplantadas para ratos imunocomprometidos as células formaram uma estrutura semelhante ao cimento/LPO <sup>(Soares et al, 2007)</sup>.

Gronthos et al. isolaram DPSC a partir de terceiros molares impactados. Estas células revelaram a capacidade de formar depósitos cálcicos *in vitro* num meio de

cultura composto por L-ascorbato-2-fosfato, glicocorticóide e fosfato inorgânico. As células foram depois transplantadas em ratinhos imunocomprometidos e exibiram a capacidade de formar uma estrutura semelhante ao complexo pulpo-dentinário, constituído por uma matriz de colagénio tipo I altamente organizada, perpendicular à camada odontoblástica, e tecido fibroso contendo vasos sanguíneos, análogo à polpa encontrada em dentes humanos normais <sup>(Gronthos et al, 2000)</sup> (figura 15). Liu et al. cultivaram as mesmas células num meio indutor de mineralização semelhante e observou-se a formação de hidroxiapatite com pequenas quantidades de carbonatos, característicos das apatites biológicas. Recentemente foi identificada a matriz extracelular fosfoglicoproteica não-colagénica (MEPE) no tecido dentário, sendo que o péptido dentonina deriva da sua sequência genética. Também avaliaram a acção deste péptido sobre as DPSC e observaram um aumento na taxa proliferativa das DPSC, sendo possível a sua utilização na regeneração pulpar em resposta a danos como traumas e lesões de cárie. Ainda assim, são necessárias mais investigações para a aplicação *in vivo* desta terapia <sup>(Liu et al, 2004)</sup>.

Ohazama et al. testaram a capacidade do epitélio dentário em estimular SC embriogénicas e mesenquimais, provenientes dos tecidos neural e medula óssea, a expressarem genes odontogénicos, no sentido de substituírem o mesênquima dentário. Observaram a expressão de Dspp, gene que é expresso pelos odontoblastos, o que indica que apesar de não haver formação dentária, há o estímulo para a diferenciação celular <sup>(Ohazama et al, 2004)</sup>.

Batouli et al. demonstraram que as DPSC têm a capacidade de formar um complexo do tipo pulpo-dentinário quando transplantadas em ratinhos imunocomprometidos. Após 16 semanas, o tecido pulpar era constituído por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e odontoblastos associados a dentina recém-formada, indicando a possibilidade de utilizar essas células para reparar estruturas dentárias danificadas <sup>(Batouli et al, 2003)</sup>.

Kramer et al. realizaram um estudo *in vitro* para determinar o potencial das MSC e células progenitoras do PDL na formação de diferentes tipos de tecidos, assim como a possibilidade no tratamento de doenças orais. Demonstraram que é possível a formação de um tipo de PDL a partir destas células, quando se encontram em contacto com quaisquer factores do PDL ou com mesmo com o próprio tecido <sup>(Kramer et al, 2004)</sup>. Saito et al. sugeriram a utilização de BMP-2 como promotor para a diferenciação de células progenitoras do folículo dentário em cementoblastos e odontoblastos, no sentido de

restabelecer a integridade do PDL (Saito et al, 2005). Marei et al. implantaram uma matriz porosa com SC da medula óssea nos alvéolos dentários de coelhos, após extração do incisivo central inferior, verificando-se a preservação das paredes ósseas alveolares, o que representa mais um passo para a regeneração periodontal (Marei et al, 2005).

Cordeiro et al. preparam matrizes biodegradáveis dentro de canais radiculares de dentes humanos cortados em fatias. De seguida, acrescentaram à matriz SHED isoladas, ou associadas a células endoteliais, e subsequentemente implantaram a estrutura no tecido subcutâneo de ratinhos imunocomprometidos. Verificaram que o tecido formado apresentava arquitectura, celularidade e expressão de genes semelhantes aos de uma polpa dentária fisiológica com vasos sanguíneos funcionais (Cordeiro et al, 2008) (figura 16).

Laino et al. cultivaram DPSC obtidas a partir de polpas saudáveis de indivíduos entre os 30-45 anos de idade e, por intermédio de citometria de fluxo, seleccionaram uma população de células produtoras de osso  $c\text{-kit}^+/CD34^+/CD45^-$  (SBP/DPSC). Em meio de cultura, as SBP/DPSC diferenciaram-se em precursores de osteoblastos ( $CD44^+/RUNX-2^+$ ), capazes de se auto-renovarem, e posteriormente em osteoblastos, produzindo *in vitro* tecido ósseo fibroso autólogo (LAB), que é marcadamente positivo para vários anticorpos ósseos e uma fonte ideal de osteoblastos e tecido mineralizado na regeneração óssea. Ao ser transplantado *in vivo* em ratinhos imunocomprometidos, sem a necessidade de uma matriz, originou osso lamelar contendo osteócitos (figura 17). Este tecido recém-formado pode ser útil em várias patologias que exijam o crescimento de tecido ósseo e reparação. As células diferenciadas e o LAB podem ser conservados a  $-80^\circ\text{C}$  e armazenados por longo tempo, sem perderem as suas características (Laino et al, 2005).

Seo et al. obtiveram PDL a partir de terceiros molares extraídos cirurgicamente e utilizaram o tecido para isolar PDLSC. Em meio de cultura apropriado, as PDLSC diferenciaram-se em células do tipo cementoblasto, adipócitos e células formadoras de colagénio. De seguida foram transplantadas *in vivo* em ratinhos imunocomprometidos para avaliar a capacidade de regeneração e reparação dos tecidos periodontais e revelaram a capacidade de originar estruturas do tipo cimento e PDL, contribuindo para a reparação do tecido periodontal (Seo et al, 2004) (figura 18).

Aquino et al. demonstraram clinicamente em pacientes que necessitavam de extrair os terceiros molares, que as DPSC juntamente com uma matriz de colagénio formam um biocomplexo estrutural eficiente na regeneração óssea. Estes pacientes apresentavam uma reabsorção óssea bilateral do rebordo alveolar distal ao segundo

molar, secundária à impactação do terceiro molar na lâmina cortical alveolar, produzindo um defeito ósseo de pelo menos 1,5 cm de altura. Esta condição clínica não permitia a regeneração óssea espontânea após a extração do terceiro molar e, eventualmente, levaria à perda também do segundo molar adjacente. Três meses após o enxerto autólogo de DPSC, o osso alveolar dos pacientes apresentava uma regeneração óssea vertical ideal e a completa reintegração dos tecidos periodontais à volta dos segundos molares, avaliada clinicamente à sondagem e através de radiografias. As observações histológicas demonstraram claramente a completa regeneração do osso no local da lesão <sup>(Aquino et al, 2009)</sup> (figuras 19, 20, 21, 22 e 23).

## VIII – SUBSTITUIÇÃO DENTÁRIA BIOLÓGICA

Actualmente, duas maneiras principais estão a ser investigadas para formar um “biodente”: uma reprodução do desenvolvimento de um dente embrionário na boca ou a criação de uma matriz (estrutura) na forma de um dente que possa ser germinada com células capazes de formar tecidos dentários (figura 24) <sup>(Nanci, 2008; Yen & Sharpe, 2008)</sup>. Contudo, o melhor dente de substituição teria de ser feito a partir do tecido do próprio doente e cultivado no próprio local do dente <sup>(Kolya & Castanho, 2007)</sup>. Nesse sentido, têm sido desenvolvidas experiências em ratinhos, utilizando primórdios da lâmina dentária ao invés de populações de SC isoladas para dar origem a um órgão dentário completo <sup>(Dualibi et al, 2004; Ohazama et al, 2004)</sup>. Isto demonstra uma dificuldade na manipulação de todos os factores envolvidos no desenvolvimento de um órgão dentário. Além desta problemática é evidente a necessidade da inserção e funcionalidade do órgão formado, de maneira a que se possa integrar no sistema estomatognático <sup>(Soares et al, 2007)</sup>.

Glasstone demonstrou *in vitro* que o estágio inicial embrionário do dente primordial pode ser dividido em dois e que cada metade pode originar um dente completo de tamanho normal. Isto revela que o estágio inicial embrionário exibe um inerente nível de plasticidade e capacidade regenerativa <sup>(Glasstone, 1952)</sup>. Esta capacidade regenerativa foi demonstrada por Young et al., que usaram estruturas na forma de diferentes dentes e fizeram-nas germinar com células dissociadas a partir do estágio inicial do germe do terceiro molar de porcos e ratos. Estas estruturas na forma de dentes foram criadas utilizando polímeros biodegradáveis, sendo envolvidas em omento, um material rico em vasos sanguíneos para suprir os tecidos dentários em desenvolvimento

com nutrientes e oxigénio. Após 20 a 30 semanas de implantação *in vivo* usando botões dentários de suínos, as estruturas germinadas cresceram nos ratinhos hospedeiros e análises histológicas revelaram a formação de minúsculas coroas dentárias (1 a 2 mm). Estas estruturas formadas apresentavam uma bainha epitelial de Hertwig, odontoblastos, cementoblastos, uma câmara pulpar bem definida, dentina e um órgão morfológicamente correcto contendo esmalte completamente formado (Young et al, 2002) (figura 25). Pesquisadores observaram que células dentárias no estágio de botão, obtidas de ratinhos recém-nascidos, cultivadas *in vitro* durante 6 dias e transplantadas para dorsos de ratinhos imunocomprometidos, apresentaram bons resultados na formação de coroas dentárias, com características semelhantes às que encontramos nos dentes formados naturalmente. No entanto, o germe molar de rato só se desenvolveu após 12 semanas de implantação *in vivo* (Dualibi et al, 2004). Uma explicação provável para este acontecimento é que um número reduzido de células epiteliais dentárias e mesenquimais dissociadas se recombinaram na estrutura e iniciaram a formação dentária num processo sugerido por Glasstone (Glasstone, 1952). Uma das desvantagens é que os dentes produzidos apresentavam dimensões reduzidas e não se ajustavam quer em forma quer em tamanho à matriz biodegradável. A adaptação deste método para produzir estruturas dentárias com dimensões normais está ainda a ser investigada, mas um dado relevante desta tentativa é que o osso não é formado durante o processo. A formação de um “biodente” deve envolver a formação de tecido ósseo novo no qual o dente se possa inserir e desenvolver as suas raízes. Todavia, a formação óssea usando esta tentativa pode vir a ser conquistada (Zhang et al, 2009).

Outra perspectiva que está a ser investigada é a reprodução do desenvolvimento dentário tal como ocorre dentro do embrião na boca adulta. Ohazama et al. demonstraram que a transferência de um primórdio embrionário na mandíbula de um rato adulto, resultava no desenvolvimento completo de um dente unido ao osso pelos seus tecidos moles, com uma orientação correcta e tamanho adequado para o rato. Esta tentativa baseia-se na ideia de que, quando órgãos complexos são produzidos em embriões, os mesmos trajectos podem ser usados para produzi-los *in vitro*. As BMSC, contendo MSC, podem ser cultivadas e agregadas para formar massas semi-sólidas. Os agregados são combinados com epitélio oral embrionário e são cultivados. A iniciação do desenvolvimento dentário é avaliada histologicamente, e os genes são expressos nas MSC que são indicativas de odontogénese inicial. Tendo estabelecido que as MSC podem responder a sinais epiteliais e começar a formação dentária, a capacidade destas

de formar dentes é testada pela sua transferência para cápsulas renais de ratos adultos por 10 dias (figura 26). Sob estas condições, transplantes a partir de BMSC podem originar coroas dentárias completas do tamanho aproximado ao do molar do rato e contendo todos os mesmos tipos celulares de um dente normal. Verificou-se que após 26 dias do transplante houve formação de um dente ectópico, histologicamente normal, apresentando dentina, esmalte e um tecido do tipo PDL (Ohazama et al, 2004) (figura 27). Outros meios auxiliares, utilizando imagens 3D, têm mostrado que os dentes formados apresentam não só uma morfologia normal, mas também podem entrar em erupção na cavidade oral e dar origem a raízes funcionais (figura 28) (Yen & Sharpe, 2008).

Várias pesquisas estão em andamento para testar outras fontes de SC e encontrar uma fonte celular para substituir o epitélio oral embrionário com o objectivo de produzir um “biodente” totalmente a partir de cultura de células. Estas duas tentativas diferentes oferecem uma nova possibilidade real de a substituição dentária biológica se tornar uma realidade num futuro não muito distante. Apesar de todos estes avanços, existem ainda muitos mistérios sobre a sinalização celular que direcciona a morfogénese dos dentes e necessitam de ser desvendados (Kolya & Castanho, 2007).

Em 2009, um dente funcional com todos os seus componentes, incluindo o esmalte dentário, foi regenerado num animal pela primeira vez (Ulmer et al, 2010). Ikeda et al. transplantaram com a orientação correcta um germe dentário de um molar para a região do primeiro molar superior do osso alveolar em ratos adultos com 8 semanas de idade. O dente formado, que entrou em erupção e oclusão, apresentava uma correcta estrutura dentária, a dureza necessária dos tecidos mineralizados para a mastigação e resposta a estímulos nocivos, tais como o stress mecânico e a dor, em cooperação com os restantes tecidos orais e maxilo-faciais.

Neste modelo animal, o primeiro molar superior foi extraído e o alvéolo pós-extraccional cicatrizou em 3 semanas. A exposição da ponta da cúspide do dente formado para a cavidade oral ocorreu  $36.7 \pm 5.5$  dias após o transplante. A dimensão vertical da coroa dentária foi aumentando progressivamente e o dente formado atingiu o plano oclusal com o molar inferior oponente  $49.2 \pm 5.5$  dias após o transplante. Durante o processo de erupção e oclusão, o osso alveolar do alvéolo pós-extraccional cicatrizou gradualmente nas áreas em redor do dente formado e o mesmo apresentava espaço do PDL suficiente entre si e o osso alveolar. O dente formado também originou uma correcta estrutura constituída por esmalte dentário, ameloblastos, dentina, odontoblastos, polpa dentária, osso alveolar, cimento, PDL e vasos sanguíneos. Não

obstante, no que diz respeito à dimensão, o dente formado era menor do que os outros dentes normais. Até ao momento, não se consegue regular a largura da coroa dentária, a posição das cúspides e a padronização do dente relativamente às estruturas linguais/ vestibulares e anteriores/posteriores, através das técnicas celulares de manipulação *in vitro*. O dente regenerado alcançou uma oclusão normal em harmonia com os dentes oponentes e os contactos cuspídeos existentes mantiveram a dimensão vertical entre as arcadas opostas. Após a obtenção da oclusão, não houve aumento excessivo no tamanho dos dentes ou perfuração do seio maxilar pela erupção do mesmo (figura 29).

O potencial mastigatório de um dente regenerado por estes mecanismos é essencial para atingir uma adequada função dentária. Através do teste Knoop, que é um dos tipos de ensaios de dureza habitualmente utilizados para medir a resistência mecânica, especialmente em materiais muito frágeis ou folhas finas, verificou-se que o dente formado apresentava valores de dureza dentro dos valores normais (figura 30).

A análise histológica do PDL sugeriu que o dente formado tinha a capacidade de responder a estímulos mecânicos. Após a aplicação de forças ortodônticas durante 17 dias, o dente formado respondeu da mesma maneira que um dente normal. Histologicamente ocorreram alterações morfológicas ao nível do PDL após 6 dias de tratamento, observando-se na superfície do osso alveolar osteoblastos com a sua forma cubóide e núcleos arredondados, e osteoclastos como células gigantes multinucleadas, nas zonas de tensão e compressão respectivamente (figura 31).

A percepção de estímulos nocivos, como sejam o stress mecânico e a dor, são importantes para a protecção e função dentárias. Os investigadores avaliaram o potencial perceptivo dos neurónios do dente formado através de estímulos ortodônticos e pulpares. Fibras nervosas anti-neurofilamento foram detectadas na polpa dentária, nos túbulos dentinários e no PDL do dente formado, assim como são detectadas nos dentes normais. O neuropéptido Y (NPY), que é sintetizado nos nervos simpáticos, e o péptido relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), que é sintetizado pelos nervos sensoriais e está envolvido na dor sensorial dentária, também foram detectados nos neurónios quer da polpa dentária quer do PDL do dente formado. A expressão do neuropéptido galanina, que está envolvido na transmissão da dor, aumentou em resposta a um estímulo doloroso e persistente dos terminais nervosos do PDL do dente formado, tal como acontece nos dentes normais. Estes dados indicam que as fibras nervosas que enervam a polpa e o PDL do dente formado têm um potencial perceptivo para estímulos

nociceptivos e podem transmitir esses eventos para o sistema nervoso central. Deste modo, os investigadores demonstraram que é possível originar um dente funcional com potencial mastigatório e com capacidade de resposta a estímulos mecânicos e sensoriais (Ikeda et al, 2009). Análogo ao modelo animal, o objectivo futuro passa por regenerar dentes funcionais autólogos em humanos (Ulmer et al, 2010).

Recentemente, DPSC, SHED e SCAP foram reprogramadas com sucesso em iPSC, que são uma grande promessa para a Medicina Regenerativa (Yan et al, 2011). Estas células expressam marcadores genéticos que caracterizam as ES e mantêm a capacidade de se diferenciar nas três camadas germinativas primárias (endoderme, mesoderme e ectoderme) *in vitro* e *in vivo* (Oda et al, 2010; Yan et al, 2011). Em condições adequadas, as iPSC podem originar EpSC pela expressão de marcadores da linhagem dos ameloblastos (ameloblastina e amelogenina) devido às suas propriedades pluripotentes. A figura 32 representa uma possível estratégia viável para a formação de um “biodente” utilizando iPSC, na qual todas as células dentárias são autólogas, contudo trata-se de um desafio ainda cheio de incertezas (Yan et al, 2011).

## IX – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As SC constituem uma das áreas mais fascinantes da Biologia Moderna. A elaboração das grandes manchetes que descrevem as futuras terapias destinadas a salvar vidas tem início nos laboratórios de pesquisas biomédicas. Nos dias de hoje, uma surpreendente soma de recursos materiais e humanos é destinada ao estudo das SC e do seu potencial na regeneração de tecidos ou de órgãos irremediavelmente lesados por doenças ou congenitamente mal formados. Só recentemente, mais precisamente na transição para o terceiro milénio, a ciência despertou a atenção para a extraordinária importância das SC para a espécie humana. O potencial das SC no tratamento de doenças incuráveis pelos métodos actualmente disponíveis na Medicina e na Cirurgia, apenas começa a ser conhecido. O mundo científico está cada vez mais voltado para os resultados das pesquisas, na esperança de solucionar os problemas mais obscuros que determinadas doenças apresentam. Por outro lado, a manipulação das SC estimula uma série de discussões que, invariavelmente, incluem considerações de ordem económica, ética, moral, religiosa, política e legal. São vários os grupos organizados da sociedade que discutem em profundidade os aspectos relacionados com a utilização das SC com

finalidade curativa. Tratando-se de um tema actual e em pleno desenvolvimento, é compreensível que ainda não haja um consenso sobre o que deve ou não ser permitido ou proibido. As pesquisas realizadas com SC, pela sua capacidade de originar novas células, permitiram explorar uma via terapêutica alternativa, baseada na recomposição de tecidos ou órgãos danificados por trauma ou por qualquer outro tipo de lesão, seja de natureza química, física, metabólica, infecciosa ou funcional. A reconstrução anatómica (histológica) e funcional de determinados órgãos já é uma realidade e constitui uma grande promessa (Souza et al, 2005).

O uso de ES é eticamente controverso. As preocupações éticas e as dificuldades técnicas laboratoriais tornam a aplicação de ES difícil no momento. ASC, derivadas de tecidos dentários ou não-dentários, não apresentam problemas éticos, não obstante há algumas limitações no que diz respeito ao seu potencial de diferenciação (Morszeck et al, 2009).

Os recentes progressos da Bioengenharia e pesquisa de SC em Medicina Dentária, constituem uma alternativa aos materiais actuais e às terapias habitualmente utilizadas para tratar a perda de tecido dentário, reconstrução de defeitos ósseos e dentoalveolares e, eventualmente, substituir um dente no seu todo. Porém, esta terapia não é de todo uma via obrigatória, mas sim mais uma opção de tratamento, que deve ser tida em consideração num futuro próximo (Nedel et al, 2009).

Existe um grande avanço na pesquisa de SC provenientes dos tecidos orais. O seu fácil acesso e o facto de não serem órgãos vitais constituem um atractivo para testes de praticidade e viabilidade de técnicas da Bioengenharia. É possível que, num futuro próximo, se apliquem os seus benefícios na prática clínica diária, apesar de, actualmente, a ciência se encontrar distante de desenvolver órgãos dentários completos a partir de SC, devido aos mecanismos complexos da formação dentária (Soares et al, 2007).

As estratégias futuras concentrar-se-ão, sem dúvida, no mecanismo de diferenciação das SC, optimização de matrizes extracelulares e no estudo e exploração do microambiente odontogénico necessário para a diferenciação odontoblástica (Yan et al, 2011).

A formação de um “biodente” com a função mastigatória e tecidos de suporte necessários a partir de SC pode ser muito mais difícil do que o esperado. Devem ser desenvolvidas técnicas essenciais para reproduzir os mecanismos altamente especializados das SC que constituem um “biodente”. As SC possuem um enorme potencial de regeneração, mas a sua aplicação na prática clínica diária é problemática e

limitada. Várias questões que envolvem a formação de um “biodente” devem ser resolvidas, como sejam a identificação e a manutenção da capacidade “stemness” das SC, a morfogénese dentária, a determinação do tipo dentário, a cascata de sinalização odontogénica, a disponibilidade do epitélio odontogénico, o controlo do crescimento e erupção dos “biodentes”, a revascularização da polpa, a formação de estruturas nervosas e a questão da rejeição imunológica. Embora ainda existam muitos obstáculos técnicos a superar, os conhecimentos actuais sobre as SC e o seu papel na formação dentária, proporcionam uma base inequívoca para a exploração do seu potencial terapêutico (Thesleff & Tummers, 2009; Bluteau et al, 2008; Yan et al, 2011). Dado que estas células são altamente proliferativas, é de grande importância para o Médico Dentista o conhecimento do seu comportamento biológico e técnicas de obtenção (Soares et al, 2007).

Os resultados dos estudos recentes indicam claramente que o controlo da morfogénese e histodiferenciação é um desafio que exige uma profunda compreensão dos eventos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento, reparação e regeneração dos dentes (Bluteau et al, 2008).

A identificação de vários tipos de EpSC e MSC e o conhecimento das moléculas envolvidas no destino das SC é uma conquista significativa. Os ensaios *in vitro* e *in vivo* que têm vindo a ser realizados têm apresentado resultados promissores, como é o caso da formação de um dente completo, com todas as estruturas dentárias, incluindo as células e deposição de matriz extracelular. No entanto, muitas dogmáticas continuam por esclarecer antes de considerar o uso clínico destas tecnologias (Bluteau et al, 2008). A aplicação clínica em seres humanos das EpSC, que podem ser extraídas de ratos adultos, é limitada devido ao risco de rejeição imunológica (Bluteau et al, 2008; Ulmer et al, 2010). Além disso, isolar SC autólogas requer uma fonte de células de fácil acesso, sem a necessidade de uma cirurgia. Pode ser possível substituir MSC por SC de outra origem, mas o mesmo não acontece com as EpSC, sendo necessário determinar uma fonte viável destas células. Ainda não foi possível encontrar uma fonte de EpSC capaz de regenerar o esmalte no período pós-erupção. Actualmente a única fonte viável é o germe dentário das crianças (Koussoulakou et al, 2009; Ulmer et al, 2010). Uma abordagem promissora para a regeneração dentária em experiências animais seria a obtenção de EpSC a partir dos terceiros molares de animais recém-nascidos e no período juvenil. Duma forma idêntica em crianças, deverá ser teoricamente possível isolar estas células dos germes dentários dos terceiros molares. Neste momento, os botões dentários dos terceiros molares ainda não são radiograficamente visíveis, porquanto a mineralização ainda não ocorreu. A

tentativa de obter cirurgicamente estas células de crianças não é, no entanto, eticamente defensável. Por conseguinte, assim como no futuro, a questão continua sem resposta quanto à fonte de EpSC para a formação do esmalte. Uma alternativa passaria pela utilização de coroas convencionais suportadas por um dente rudimentar produzido a partir de SC (Ulmer et al, 2010).

A incapacidade em gerar um dente com morfologia normal sugere que a posição das células epiteliais e mesenquimais na matriz é um passo crítico e é fundamental para que as interações entre elas possam ocorrer (Honda et al, 2007). Os mecanismos moleculares das SC não estão totalmente compreendidos (Morszeck et al, 2010) e são necessários mais estudos sobre a função das matrizes e das células precursoras (Sumita et al, 2006).

Para conseguir este objectivo no futuro, o Médico Dentista necessita de: (1) células dentárias próprias de cada paciente, preferencialmente SC isoladas dos tecidos dentários correspondentes que são dotados de potencial odontogénico. Essas células, especialmente as de origem mesenquimal, já estão identificadas em tecidos humanos. Actualmente, a única fonte disponível de EpSC é a alça cervical do epitélio apical dos ratinhos. EpSC de origem humana podem ser obtidas a partir dos dentes de crianças pequenas (terceiros molares) e de outras fontes de mamíferos (ex: porco). Por outro lado, as BMSC têm sido reprogramadas com sucesso para dar origem a células produtoras de esmalte oferecendo uma nova possibilidade; (2) técnicas de cultura que permitam uma rápida expansão, de forma a que se obtenham quantidades de células necessárias num microambiente favorável e que permitam interacções celulares, conduzindo à diferenciação celular duma forma intencional. Esta exigência pode vir a ser um passo limitante de todo o processo, particularmente para as células epiteliais, que crescem lentamente em meio de cultura; (3) uma matriz extracelular adequada que permita o crescimento tridimensional das estruturas dentárias quer *in vitro* quer *in vivo*, com uma composição mais ou menos semelhante aos órgãos que pretendemos reconstruir, juntamente com os factores de crescimento (ex: FGF, BMP, PDGF, etc) que facilite o transplante e a diferenciação das SC. As características da matriz extracelular, tais como a porosidade, a taxa de degradação, a superfície química, entre outros parâmetros, têm de ser cuidadosamente analisadas e controladas aquando da utilização das SC; (4) a possibilidade de implantar o germe do “biodente” num alvéolo preparado, sob condições que permitam o desenvolvimento do sistema radicular, PDL e osteointegração – um objectivo já alcançado. Todos estes requisitos acima mencionados já foram realizados experimentalmente, embora não tenham sido aplicados

cl clinicamente. A angiogénese também é crucial na aplicação bem sucedida das SC nos tecidos, pois fornece às células o oxigénio e os nutrientes necessários. Todavia, permanece ainda a necessidade de desenvolvimento e caracterização de um meio de indução da angiogénese. Controlar o tamanho e a forma do “biodente” é difícil e o tempo necessário para gerar o dente é longo. Teoricamente, uma opção ideal seria a regeneração fisiológica, em que a réplica do dente é produzida *in situ*: SC locais ou células do tecido residentes no local, após remoção do dente, serem induzidas a diferenciarem-se reproduzindo o processo primário da odontogénese. Na prática este cenário não é realista para um futuro previsível, uma vez que os tecidos humanos orais que são deixados para trás após a remoção de um dente, não possuem fontes de células ou estruturas que são comparáveis a outras espécies que não sejam mamíferos, que retêm a capacidade de substituir dentes perdidos (Bluteau et al, 2008; Koussoulakou et al, 2009; Nedel et al, 2009;)

Toda a trajetória a partir das SC para a formação de um dente funcional parece viável, mas note-se que até agora têm sido utilizados germes dentários embrionários como fonte de células. No entanto, em princípio, técnicas semelhantes poderiam ser aplicadas com linhagens de células reprogramadas do progenitor. O que é necessário são procedimentos para a programação de iPS ou outras células com o mesmo destino do epitélio e mesênquima dentários. Embora haja vários candidatos envolvidos na complexa cascata de expressão de genes, os principais genes responsáveis pela identidade do dente permanece indeterminada. A principal tarefa para a investigação futura, portanto, é a identificação das combinações específicas de factores capazes de reprogramar células não dentárias no epitélio e mesênquima dentários (Thesleff & Tummers, 2009)

O desafio passa por descobrir novas fontes de EpSC e MSC que possam ser reprogramadas para um potencial odontogénico e associadas entre si para formar um dente totalmente funcional. Uma alternativa poderia ser a utilização de células geneticamente modificadas expressando genes específicos (ex: transgenes, siRNA) ou com um gene especificamente eliminado (ex: knock-in, knock-out). Idealmente, esta abordagem deveria fornecer uma fonte não limitada de células e introduzir nova informação genética para reprogramar uma célula de origem não dentária para adquirir propriedades odontogénicas. Apesar desta técnica nos fornecer uma fonte ilimitada de células epiteliais e de mostrar o potencial de células geneticamente modificadas que podem ser utilizadas, há ainda muitas questões que necessitam de ser esclarecidas. Qual

o gene que deverá ser utilizado para desencadear um programa odontogénico? Será apenas um gene suficiente para reprogramar uma célula numa célula específica dentária?

A terapia utilizando as SC acarreta algumas limitações, como sejam o tempo dispendido, gastos elevados, produção difícil e também a incompatibilidade com o tratamento que exige a reabilitação de várias perdas dentárias. É evidente que o conhecimento científico não é suficiente, é também um dos grandes objectivos encontrar um compromisso entre os benefícios para o paciente, os gastos, as exigências elevadas das SC e os seus recursos, as entidades reguladoras, as companhias de seguro e a indústria farmacêutica <sup>(Bluteau et al, 2008)</sup>.

Apesar da magnificência das recentes descobertas no campo da Bioengenharia dos tecidos, há mais perguntas do que respostas. O entusiasmo que acompanha as descobertas científicas que aumentam as possibilidades de um "dente personalizado produzido sob encomenda", utilizando SC ou criar um primórdio de dente *in vitro* para o transplante, a fim de substituir um dente perdido, deve ser moderado, pois existem muitos estudos que devem ser realizados para responder a questões que permanecem. A utilização de SC como potencial terapêutico nas mais diversas áreas é sem dúvida promissora e continuará a ser um dos maiores desafios para a Medicina Dentária nos próximos anos.

Os progressos que o Homem tem feito ao longo dos tempos têm sido notáveis. O sonho, na verdadeira acepção da palavra, entendido como uma actividade mental não dirigida, que se manifesta durante o sono, pelo menos nas suas fases menos profundas, e de que se pode conservar, ao acordar, uma certa lembrança deixou de ser uma quimera.

Desde que se descobriu a célula o impossível deixou de existir. Pode assim o Homem sonhar, acordado, e ver o seu sonho realizado.

## **X – BIBLIOGRAFIA**

Abukawa H, Zhang W, Young CS, Asrican R, Vacanti JP, Kaban LB, et al. Reconstructing mandibular defects using autologous tissue-engineered tooth and bone constructs. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67(2):335-47.

Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res.* 2003 Dec; 82(12):951-6.

Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, et al. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2009; 312B(5):408-15.

Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009; 18:75-83.

Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82(12):976-81.

Batley J, Cole L, Charles A, Goldthwaite C. Alternate Methods for Preparing Pluripotent Stem Cells. *Regenerative Medicine.* Chapter 8. National Institute of Health. 2006.

Biogenetics – Tooth Stem Cells [Em linha]. Piraeus: actual. 2006. [Consult. 3 Jan. 2011]. Disponível na WWW<URL:<http://www.biogenetics.gr/en/ToothStemCells.htm>>.

Bittencourt R, Pereira H, Felisbino S, Murador P, Oliveira A, Deffune E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortop Bras.* 2006; 14(1):22-24.

Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mitsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008; 16:1-9.

Bragança J, Tavares A, Belo JA. *Células estaminais e medicina regenerativa: Um admirável mundo novo. Revista da Sociedade Portuguesa de Bioquímica. 2010; 7: 4-17.*

Can A. A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells. *Turk J Hematol. 2008; 25(2):57-59.*

Chapman A, Frankel M, Garfinkel M. *Stem Cell Research and Applications Monitoring the Frontiers of Biomedical Research. American Association for the Advancement of Science and Institute for Civil Society. 1999.*

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. [J Endod.](#) 2008; 34(8):962-9.

Duailibi MT, Duailibi SE, Young CS, Bartlett JD, Vacanti JP, Yelick PC. Bioengineered Teeth from Cultured Rat Tooth Bud Cells. *J Dent Res. 2004; 83(7):523-8.*

Glasstone S. The development of halved tooth germs; a study in experimental embryology. *J Anat. 1952; 86(1):12-5.*

Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res. 2002; 81(8):531-5.*

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97(25):13625-30.*

Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol. 1999;147(1):105-20.*

Honda MJ, Shinohara Y, Sumita Y, Tonomura A, Kagami H, Ueda M. Shear stress facilitates tissue-engineered odontogenesis. [Bone.](#) 2006 Jul; 39(1):125-33.

Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol.* 2005 Jun;68(2):89-101.

Honda MJ, Tsuchiya S, Sumita Y, Sagara H, Ueda M. The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials.* 2007 Feb; 28(4):680-9.

Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 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.

Kolya C, Castanho F. Células-tronco e a odontologia. *ConScientiae Saúde.* 2007; 6(1):167-171.

Koussoulakou DS, Margaritis LH, Koussoulakos SL. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci.* 2009; 5(3):226-43.

Kramer PR, Nares S, Kramer SF, Grogan D, Kaiser M. Mesenchymal Stem Cells Acquire Characteristics of Cells in the Periodontal Ligament *in vitro*. *Dent Res.* 2004; 83(1):27-34.

Laino G, D'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005; 20(8):1394-402.

Liu H, Li W, Gao C, Kumagai Y, Blacher RW, DenBesten PK. Dentonin, a fragment of MEPE, enhanced dental pulp stem cell proliferation. *J Dent Res.* 2004; 83(6):496-9.

Liu H, Li W, Shi S, Habelitz S, Gao C, Denbesten P. MEPE is downregulated as dental pulp stem cells differentiate. *Arch Oral Biol.* 2005 Nov; 50(11):923-8.

Mao JJ. Stem Cells and the Future of Dental Care. *N Y State Dent J.* 2008; 74(2):20-4.

Marei MK, Nouh SR, Saad MM, Ismail NS. Preservation and regeneration of alveolar bone by tissueengineered implants. *Tissue Eng.* 2005; 11(5-6):751-67.

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(10):5807-12.

Morsczeck C, Frerich B, Driemel O. Dental Stem Cell Patents. *Recent Pat DNA Gene Seq.* 2009; 3(1):39-43.

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24(2):155-65.

Morsczeck C, Schmalz G. Transcriptomes and proteomes of dental follicle cells. *J Dent Res.* 2010; 89(5):445-56.

Nanci A. Ten Cate Histologia Oral: Desenvolvimento, Estrutura e Função, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. P. 79-107.

Nedel F, André DA, Oliveira IO, Cordeiro MM, Casagrande L, Tarquinio SBC, Nor JE, et al. Stem Cells: Therapeutic Potential in Dentistry. *J Contemp Dent Pract.* 2009; (10)4:090-096.

Oda Y, Yoshimura Y, Ohnishi H, Tadokoro M, Katsube Y, Sasao M, et al. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem.* 2010; 285(38):29270-8.

Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res.* 2004; 83(7):518-22.

Park JY, Jeon SH, Choung PH. Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Cell Transplant*. 2010; 20(2):271-85.

Peng L, Ye L, Zhou XD. Mesenchymal stem cells and tooth engineering. *Int J Oral Sci*. 2009; 1(1):6-12.

Portinho C, Collares M, Silva F, Nardi N, Pinto R, Siqueira E, et al. Skull reconstruction with undifferentiated mesenchymal stem cells: experimental study. *Rev. Soc. Bras. Cir. Plást*. 2006; 21(3): 161-5.

PRWeb – Denver Dentist Extracts Teeth Stem Cells for Use in Future Regenerative Medicine [Em linha]. Englewood: Vocus, 2010. [Consult. 3 Jan. 2011]. Disponível na WWW: <http://www.prweb.com/pdfdownload/4451174.pdf>.

Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, et al. Immortalization of Cementoblast Progenitor Cells With Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(1):50.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429):149-55.

Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005; 84(10):907-12.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004; 364(9429):149-55.

Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; 18(4):696-704.

Soares A, Knop L, Jesus A, Araújo T. Células-tronco em Odontologia. R Dental Press Ortodon Ortop Facial. 2007; 12(1):33-40.

Souza M, Elias D. As Células-Tronco e o seu Potencial na Reparação de Órgãos e Tecidos. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro de Estudos Alfa Rio – Perfusion Line – Programa de Educação Continuada; 2005.

Stem Cells Basics – Stem Cell Information [Em linha]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2009, actual. 28 Apr. 2009. [Consult. 3 Jan. 2011]. Disponível na WWW: <<http://stemcells.nih.gov/info/basics/defaultpage>>.

Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokry J, et al. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. Acta Medica (Hradec Kralove). 2010; 53(2):93-9.

Sumita Y, Honda MJ, Ohara T, Tsuchiya S, Sagara H, Kagami H, et al. Performance of collagen sponge as a 3-D scaffold for tooth-tissue engineering. Biomaterials. 2006 Jun;27(17):3238-48.

Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration (January 31, 2009), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook, doi/10.3824/stembook.1.37.1, <http://www.stembook.org>

Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. Stem cells - prospects in dentistry. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 2010; 120(10):860-72.

Yan M, Yu Y, Zhang G, Tang C, Yu J. A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth. Stem Cell Rev. 2011; 7(1):161-71.

Yen AH, Sharpe PT .Stem cells and tooth tissue engineering. Cell Tissue Res. 2008; 331(1):359-72.

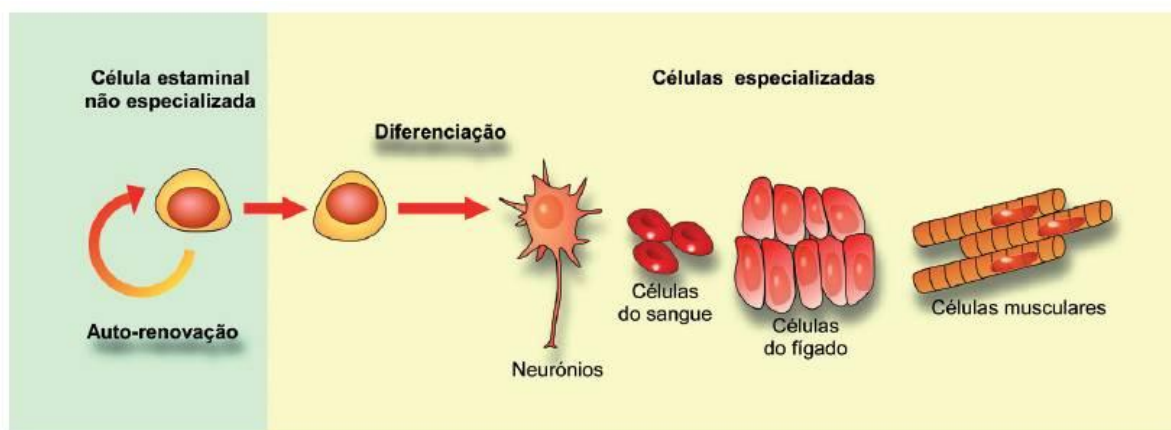
Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue Engineering of Complex Tooth Structures on Biodegradable Polymer Scaffolds. *J Dent Res.* 2002; 81(10):695-700.

Zhang W, Abukawa H, Troulis MJ, Kaban LB, Vacanti JP, Yelick PC. Tissue engineered hybrid tooth-bone constructs. *Methods.* 2009; 47(2):122-8.

## XI ANEXOS

<b>Barx</b>	BarH1 homólogo em vertebrados (TF)
<b>Bmp</b>	Proteína morfogenética óssea (SP)
<b>Dlx</b>	Distaless homólogo em vertebrados (TF)
<b>Fgf</b>	Factor de crescimento de fibroblasto (SP)
<b>Gli</b>	Oncogene homólogo associado ao glioma (proteína zinc-finger) (TF)
<b>Hgf</b>	Factor de crescimento hepático (SP)
<b>Lef</b>	Factor ligante linfóide 1 (TF)
<b>Lhx</b>	Gene com domínio homeobox-Lim (TF)
<b>Msx</b>	Genes semelhantes a Msh em vertebrados (TF)
<b>Otlx</b>	Gene homeobox relacionado a Otx (TF)
<b>Pax</b>	Gene homeótico box pareado (TF)
<b>Pitx</b>	Factor de transcrição nomeado pela sua expressão na hipófise
<b>Ptc</b>	Receptor de pequena área da superfície celular para sonic hedgehog (SHH)
<b>Shh</b>	Sonic hedgehog (SP)
<b>Slit</b>	Proteína slit homóloga à da Drosófila (SP)
<b>Smo</b>	Aplainado PTC co-receptor para SHH
<b>Wnt</b>	Wingless homólogo em vertebrados (SP)

**Tabela 1** – Expressão dos genes durante o desenvolvimento dentário. TF, factor de transcrição; SP, proteína secretada. Adaptado de *Nanci, 2008*



**Fig. 1** – Propriedades das SC. Adaptado de *Bragança et al, 2010*

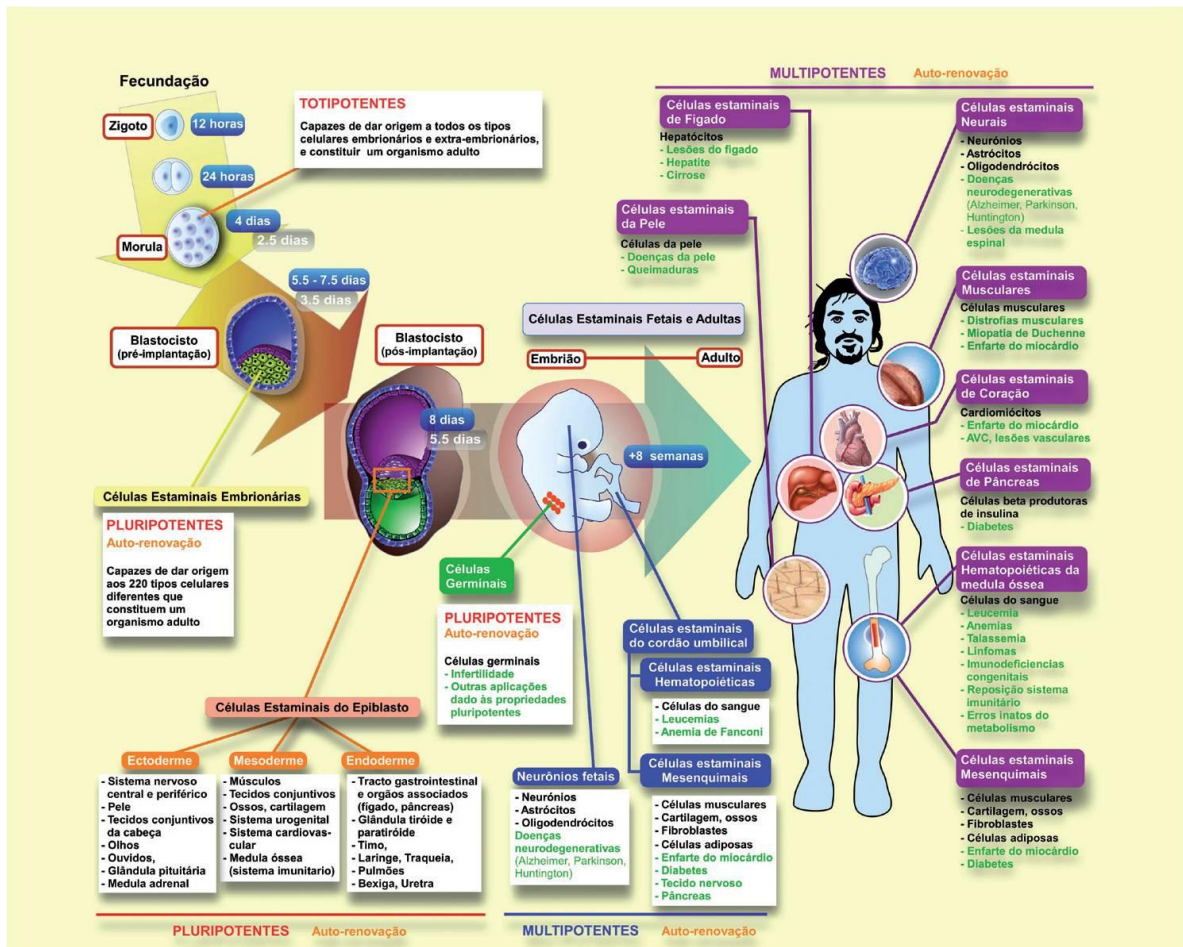
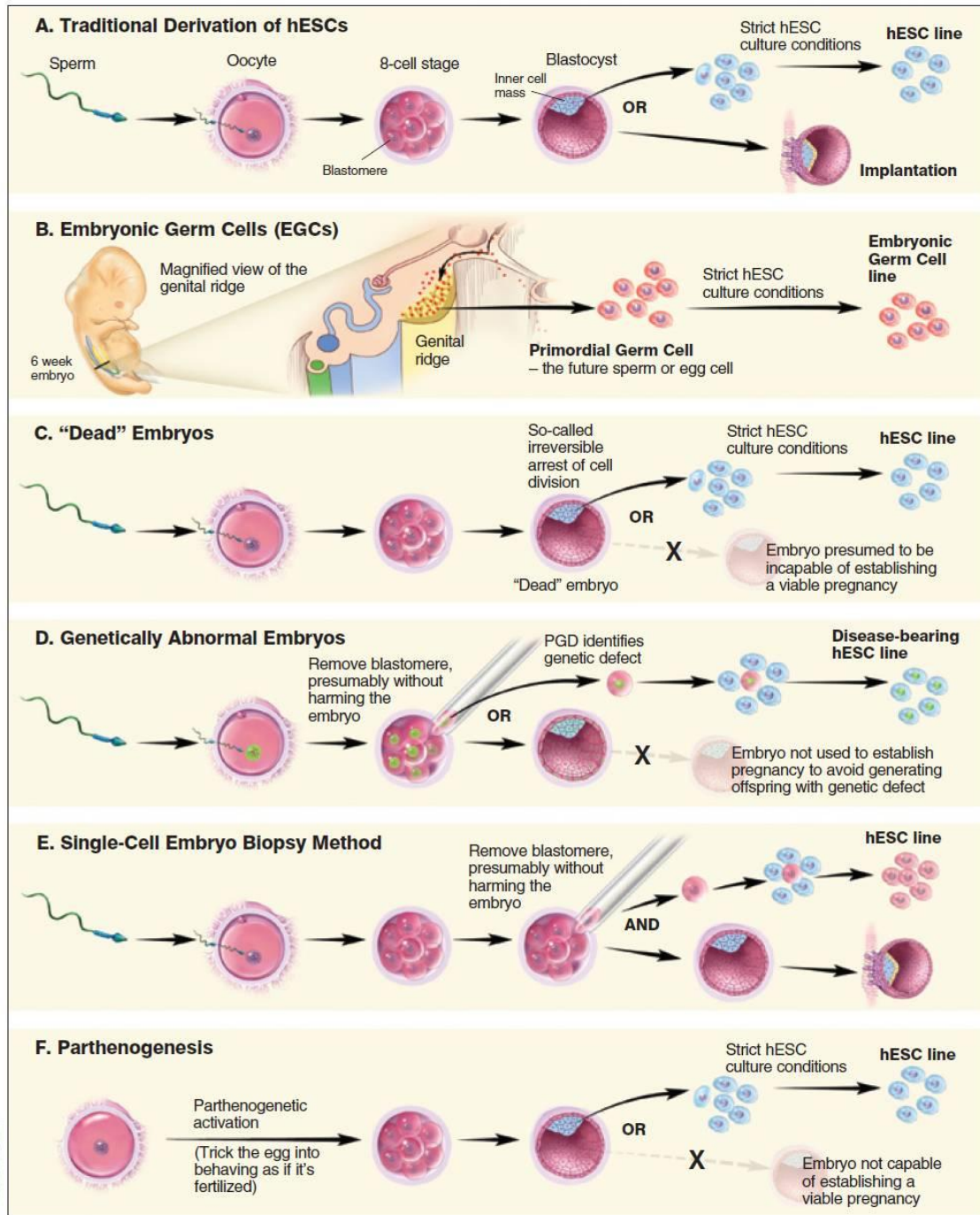
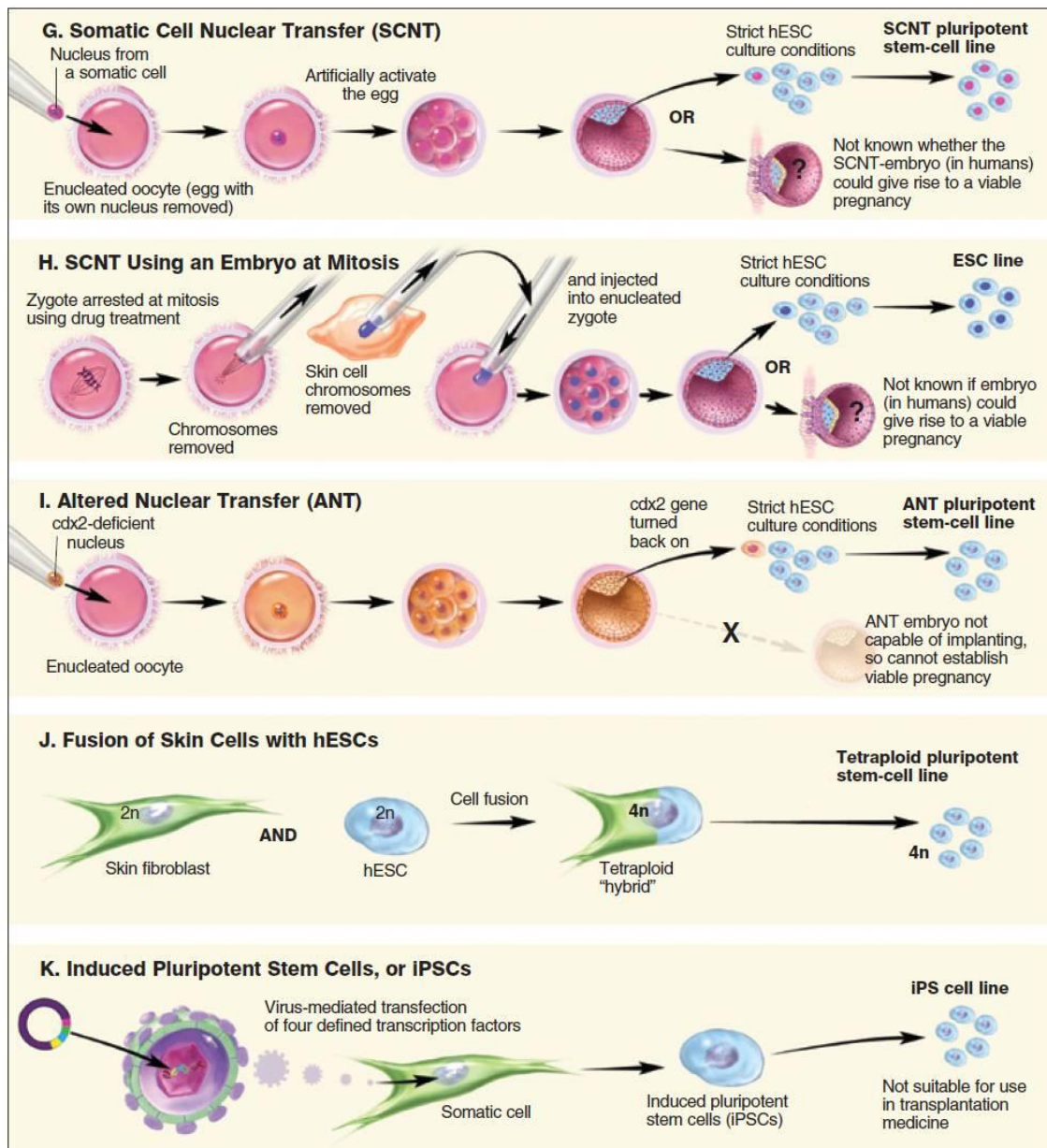


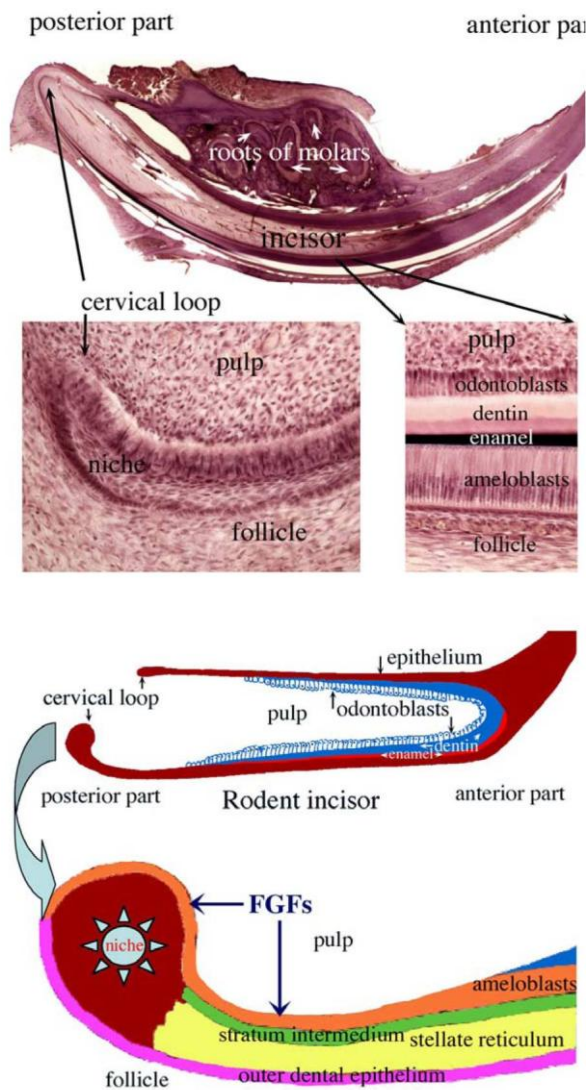
Fig. 2 – Fontes de SC. Adaptado de Bragança et al, 2010



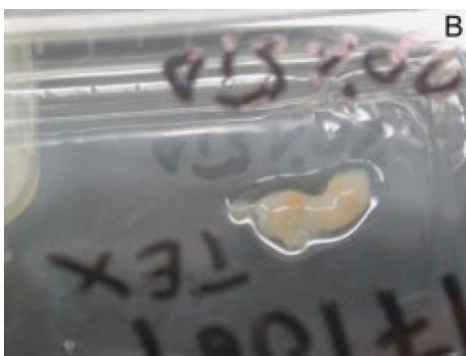
**Fig. 3** – Métodos de obtenção de SC. Adaptado de *Batley et al, 2006*



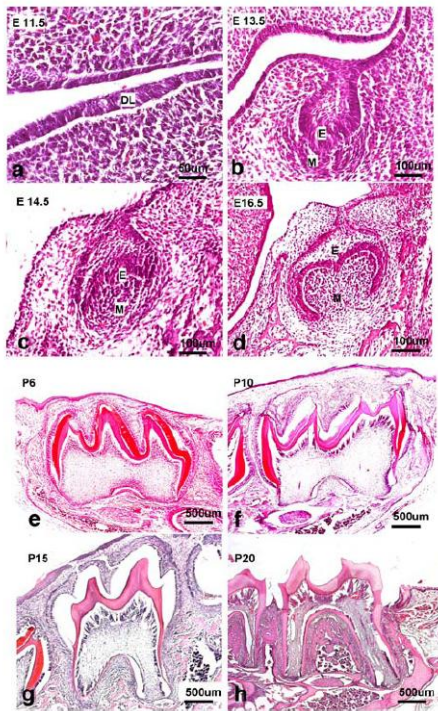
**Fig. 4** – Métodos de obtenção de SC. Adaptado de *Batley et al, 2006*



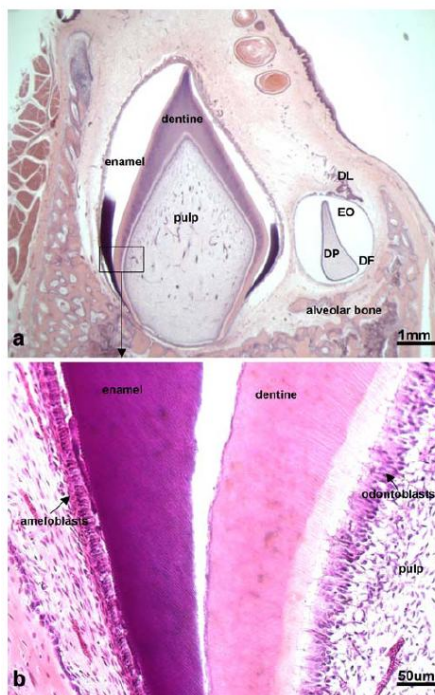
**Fig. 5** – Cortes histológicas e representação esquemática de um incisivo mandibular de um roedor. Adaptado de *Bluteau et al, 2008*



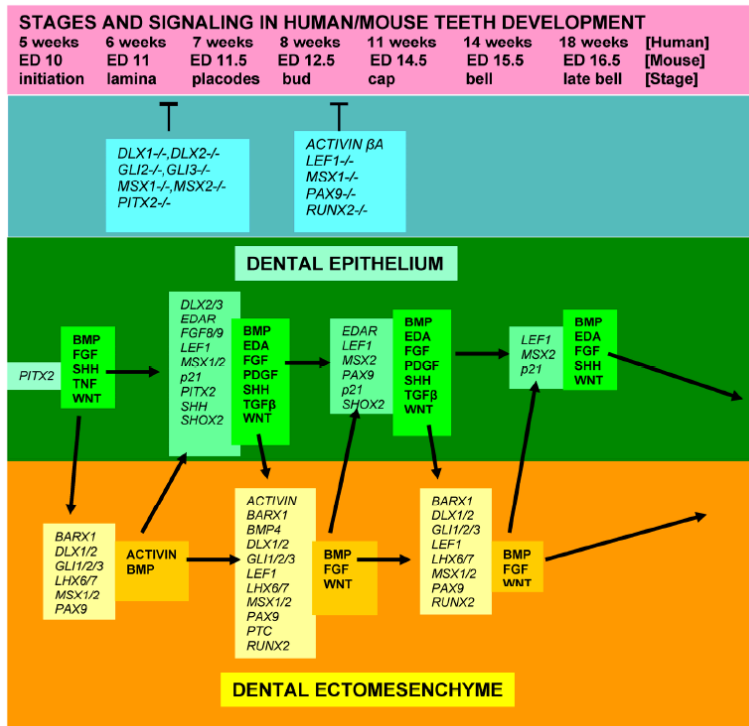
**Fig. 6** – LAB obtido após 60 dias em cultura. Adaptado de *Aquino et al, 2009*



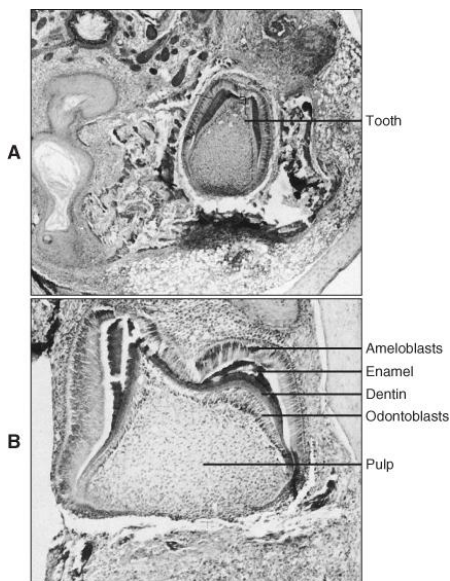
**Fig. 7** – Estágios iniciais da odontogênese de um ratinho. Adaptado de *Yen & Sharpe, 2008*



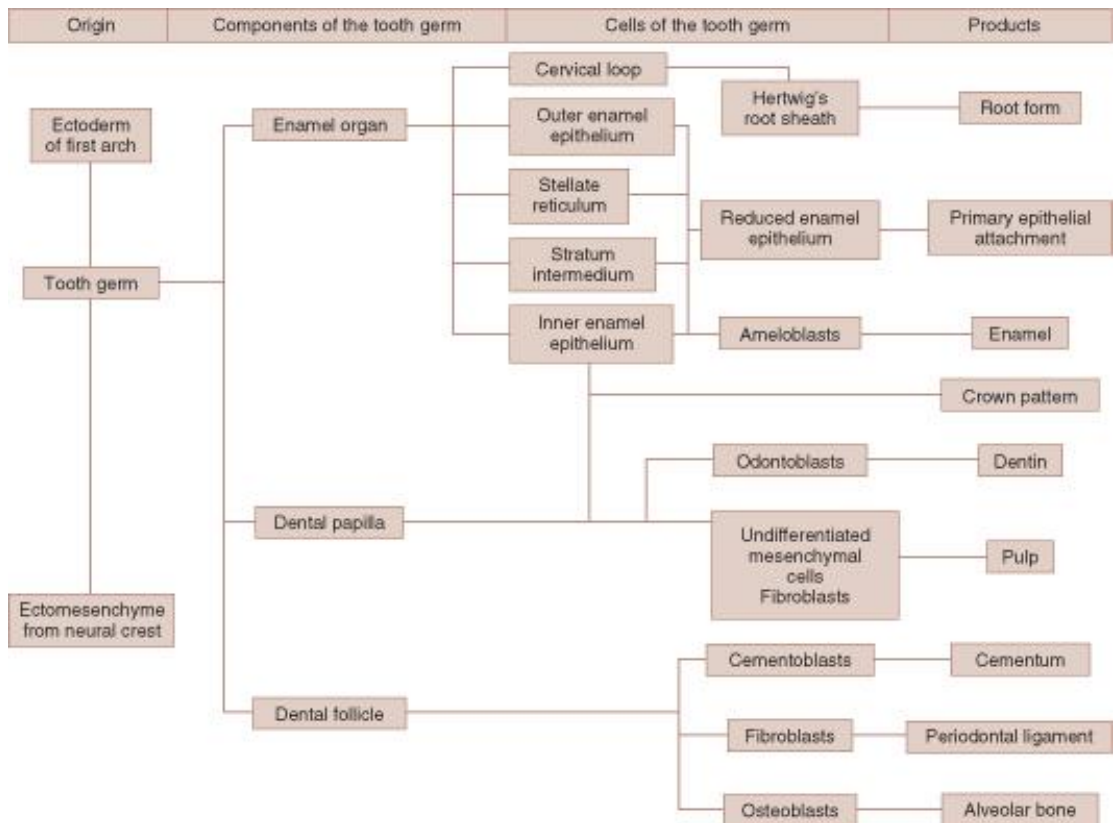
**Fig. 8** – Estruturas dentárias: folículo dentário (DL), órgão de esmalte (OE), papila dentária (DP) e lâmina dentária residual (DL). Adaptado de *Yen & Sharpe, 2008*



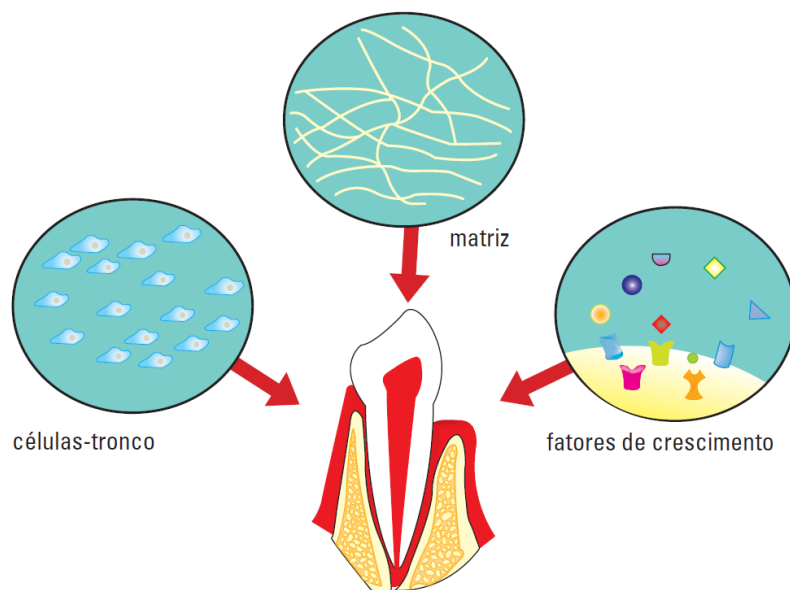
**Fig. 9** – Diagrama que representa as fases da odontogênese, alguns factores genéticos que afectam os fenótipos e as moléculas sinalizadoras e factores de crescimento expressos nos componentes epiteliais e mesenquimais dos dentes em desenvolvimento. Adaptado de *Koussoulakou et al, 2009*



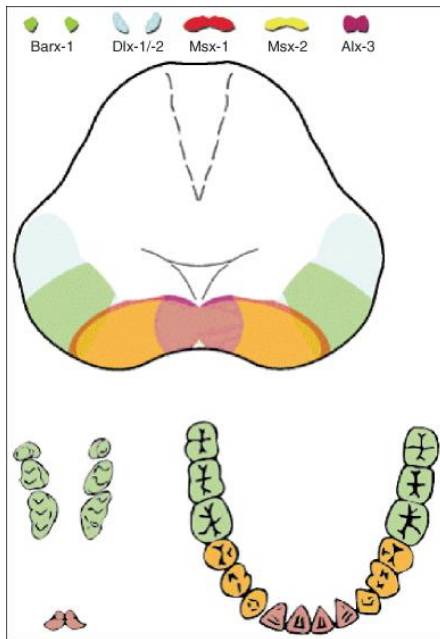
**Fig. 10** – Recombinação intra-ocular de células da crista neural e epitélio dentário. Adaptado de *Nanci, 2008*



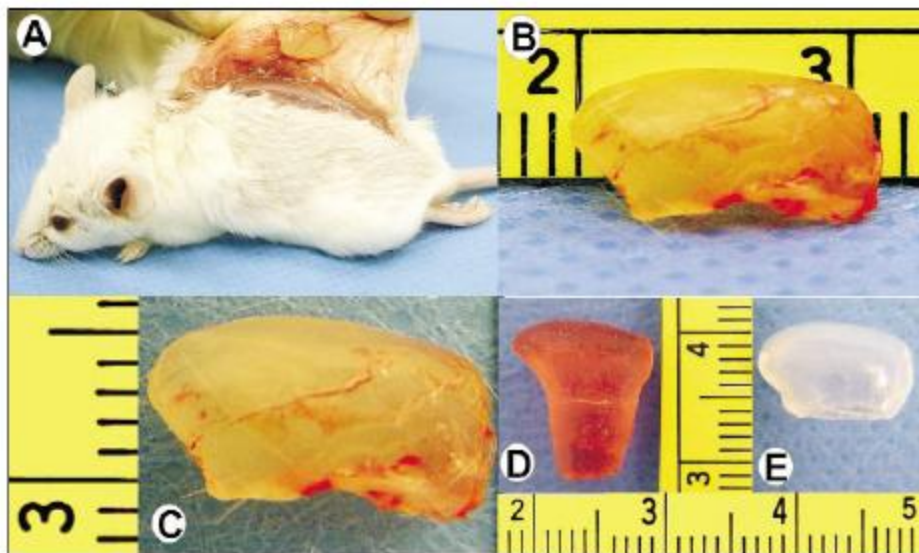
**Fig. 11** – Recombinação intra-ocular de células da crista neural e epitélio dentário. Adaptado de *Nanci, 2008*



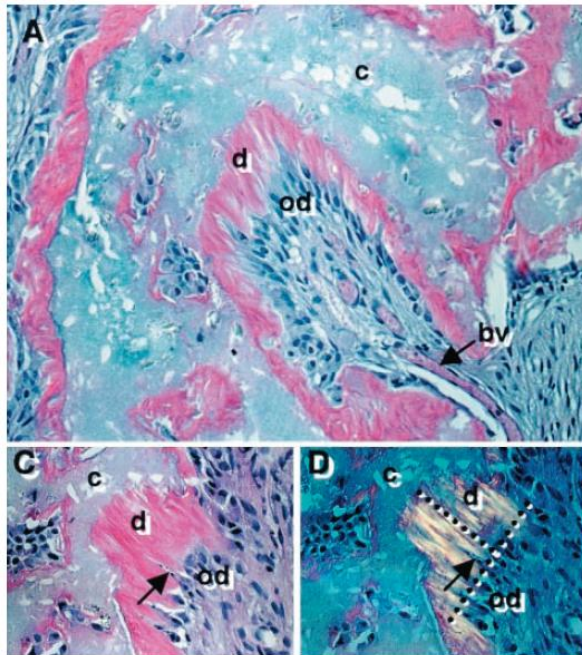
**Fig. 12** – Factores necessários para a Bioengenharia em Medicina Dentária. Adaptado de *Soares et al, 2007*



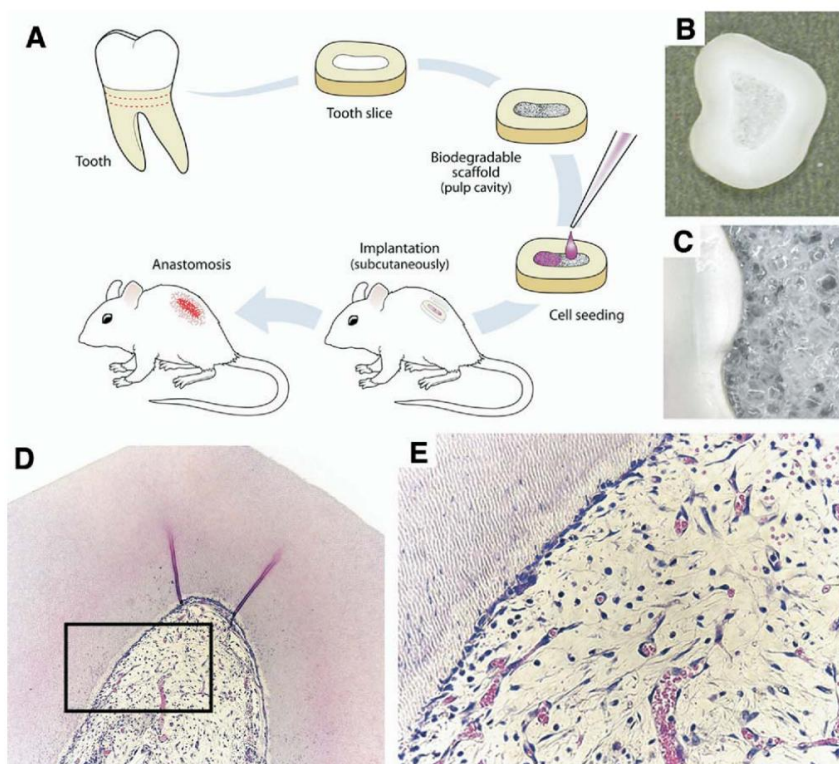
**Fig. 13** – Modelo de código homeobox odontogênico de padrão dentário. FGF8 e BMP4 epitelial expressos durante o começo da iniciação induzem a expressão mesenquimal de vários genes contendo homeobox no mesênquima subjacente, sobrepondo domínios que fornecem a informação espacial necessária para determinar o tipo dentário. Adaptado de *Nanci, 2008*



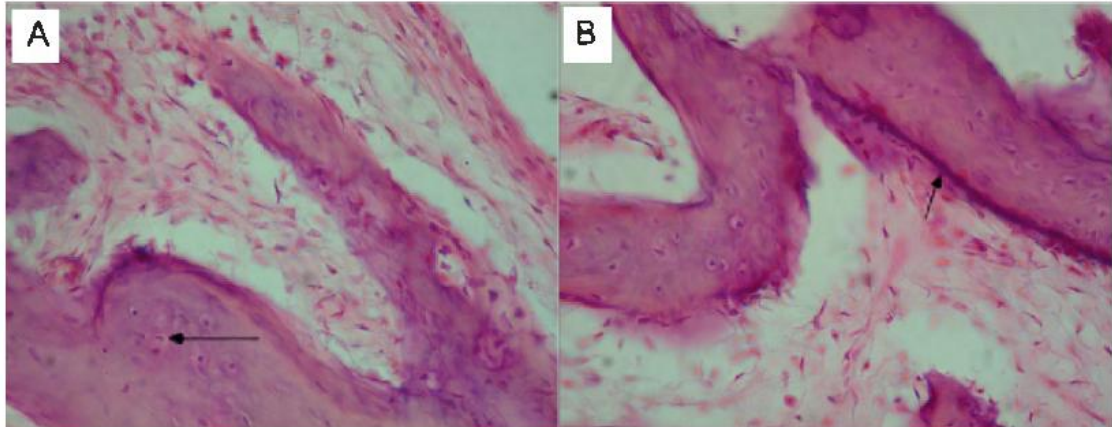
**Fig. 14** – Formação de uma estrutura em forma de côndilo mandibular a partir de MSC de ratinhos. Adaptado de *Alhadlaq & Mao, 2003*



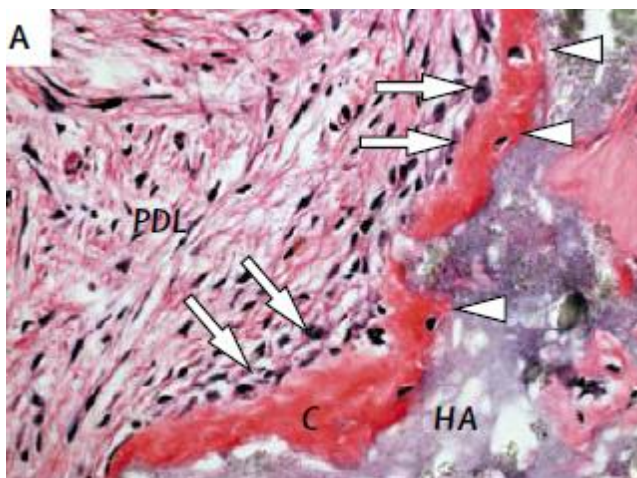
**Fig. 15** – Formação de um complexo pulpo-dentinário a partir de DPSC: matriz de suporte HA/TCP (c), matriz de dentina (d), camada de odontoblastos (od), vasos sanguíneos (bv), processos odontoblásticos (seta). Adaptado de *Gronthos et al, 2000*



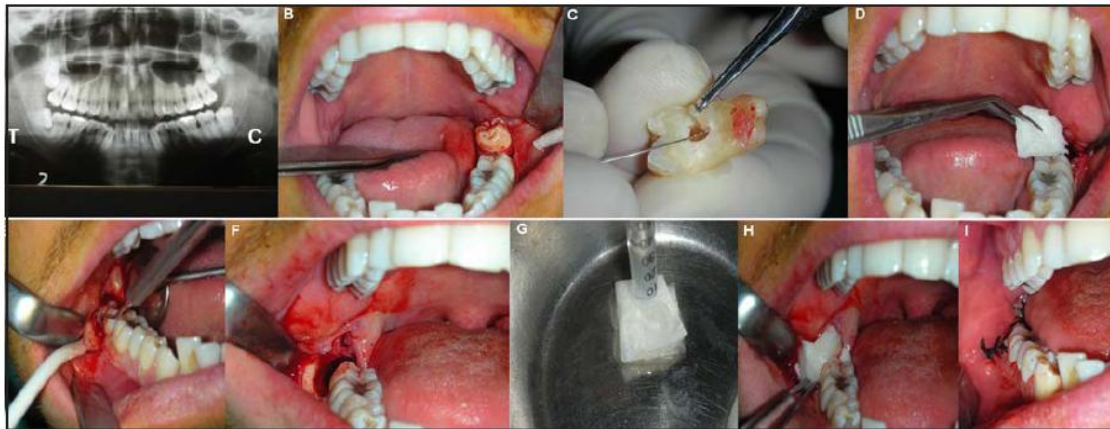
**Fig. 16** – Formação de tecido pulpar a partir de SHED. Adaptado de *Cordeiro et al, 2008*



**Fig. 17**– Formação de osso lamelar após transplante de LAB em ratinhos. (A) Osteócitos (seta) embebidos em osso lamelar, rodeado por tecido conjuntivo laxo. (B) Osso lamelar bem desenvolvido com osteoblastos (seta) em torno do tecido e osteócitos no seu interior. Adaptado de *Laino et al, 2005*



**Fig. 18**– Formação de cimento e PDL a partir de PDLSC: cementoblastos (setas), cimento (C), matriz de hidroxiapatite/tricálciofosfato (HA), cementócitos (triângulos) e PDL. Adaptado de *Seo et al, 2004*



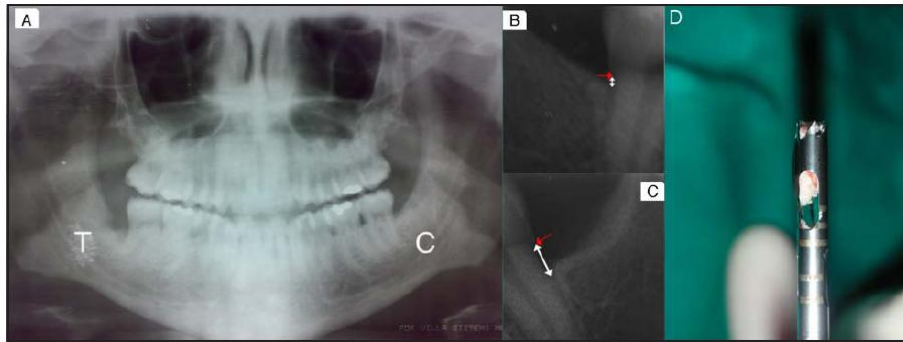
**Fig. 19**– Procedimento cirúrgico. (A) Radiografia pré-operatória (T: zona de teste; C: zona de controlo). (B) Extracção dentária na zona de controlo. (C) Remoção da polpa do dente extraído. (D) Colocação de uma esponja de colagénio sem DPSC no alvéolo e posterior sutura na zona de controlo. (E) e (F) Extracção dentária na zona de teste e avaliação da profundidade do defeito ósseo. (G) Esponja de colagénio com DPSC. (H) Colocação do biocomplexo na zona de teste. (I) Sutura. Adaptado de *Aquino et al, 2009*



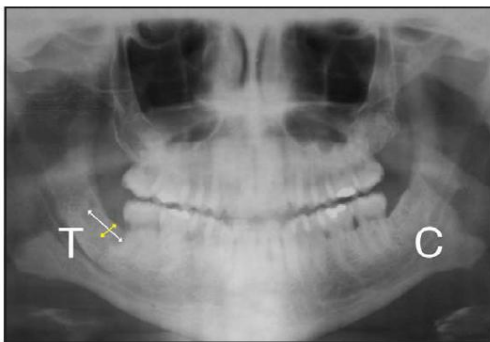
**Fig. 20**– Ortopantomografia e controlo pós-operatório 7 dias após a intervenção cirúrgica. (A) Defeito ósseo vertical (seta amarela) e horizontal (seta branca). (B) Zona de teste. (C) Zona de controlo. Adaptado de *Aquino et al, 2009*



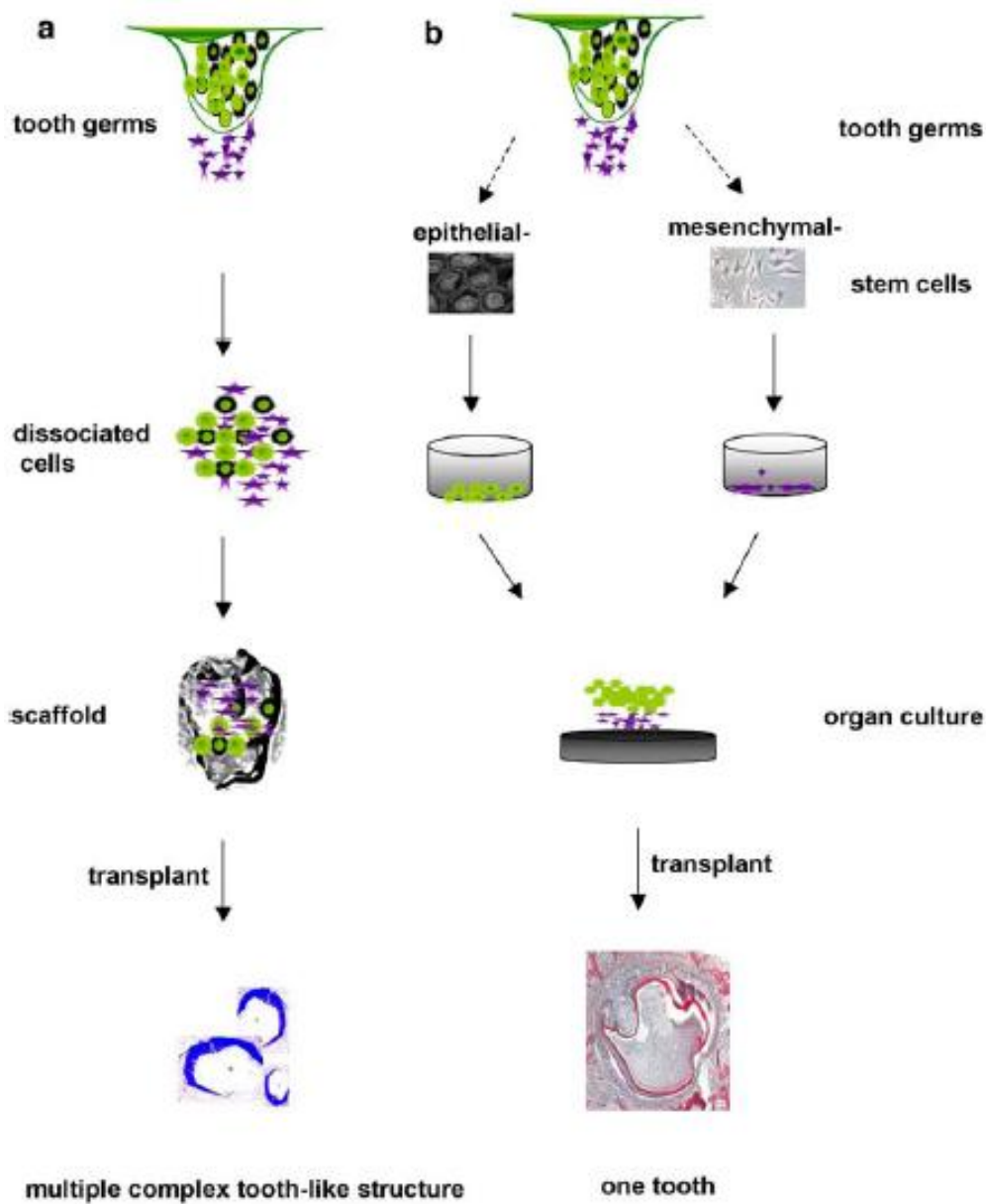
**Fig. 21**– Radiografia controlo 30 dias após o enxerto (T: Zona de teste; C: Zona de controlo). Regeneração óssea significativa na zona T. Adaptado de *Aquino et al, 2009*



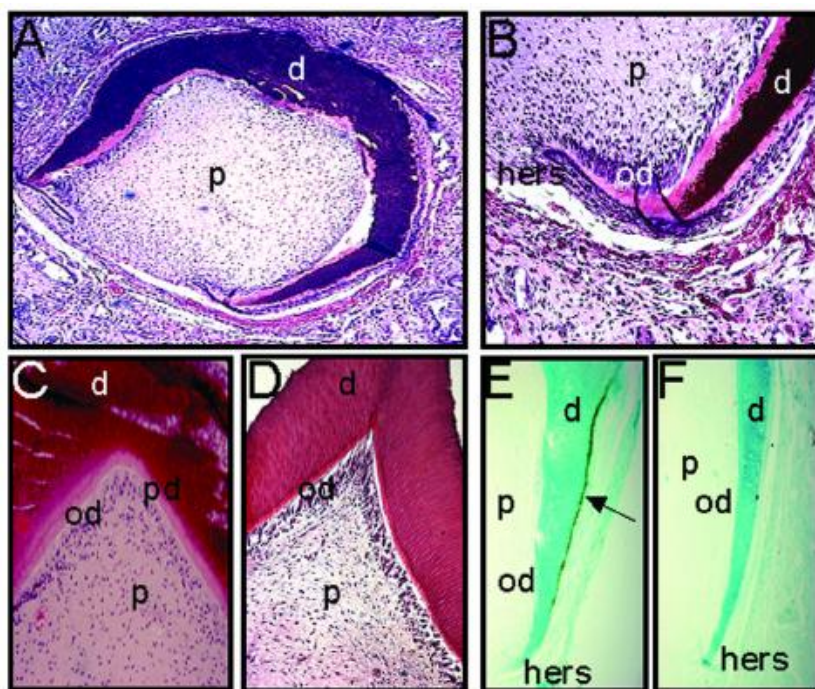
**Fig. 22**– Radiografia controlo 3 meses após o enxerto (T: Zona de teste; C: Zona de controlo). Junção amelocementária (seta vermelha), exposição da raiz do segundo molar (seta branca). (A) Ortopantomografia. (B) Zona T. (C) Zona C. (D) Recolha de amostra óssea. Adaptado de *Aquino et al, 2009*



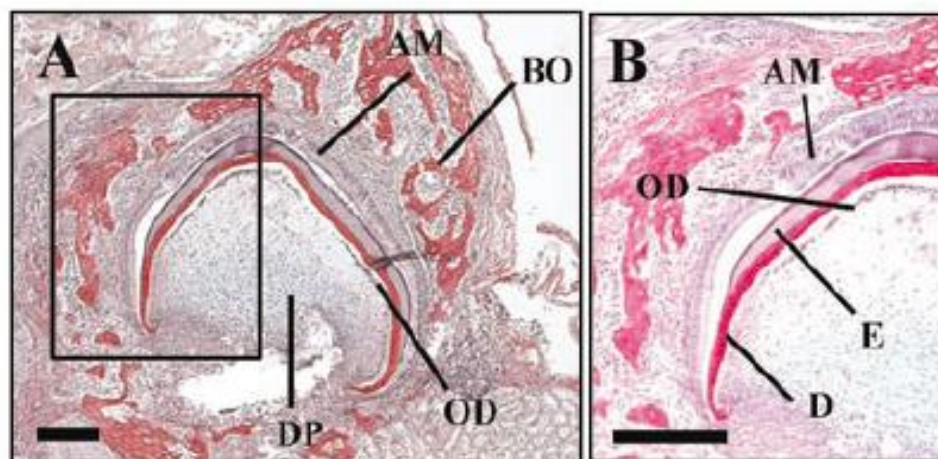
**Fig. 23**– Radiografia controlo 1 ano após o enxerto (T: Zona de teste; C: Zona de controlo). Aumento ósseo vertical (seta amarela) e ântero-posterior (seta branca). Adaptado de *Aquino et al, 2009*



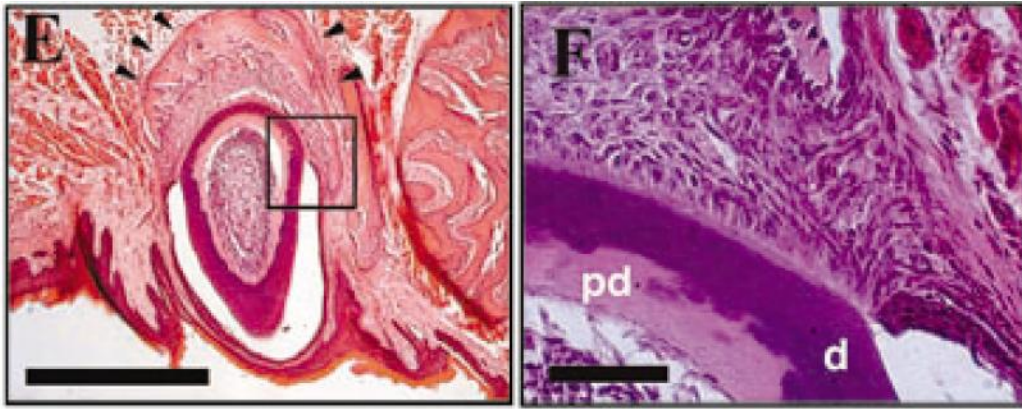
**Fig. 24**– Dois caminhos diferentes de formação de um “biodente”. (A) Germes dentários dissociados crescem numa matriz em forma de dente e originam estruturas dentárias. (B) EpSC e MSC, obtidas a partir de germes dentários ou outras fontes, crescem em cultura e através de interações epiteliais-mesenquimais formam uma estrutura dentária organizada. Adaptado de *Yen & Sharpe, 2008*



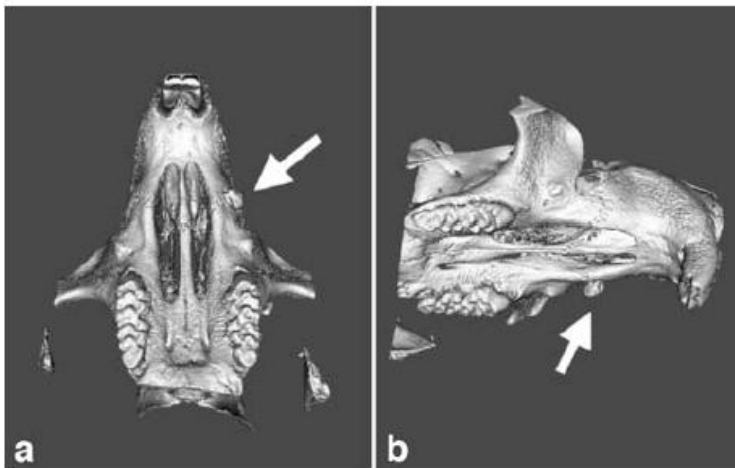
**Fig. 25**– Exame histológico e imunohistoquímico após 20 semanas. Dentina (d), odontoblastos (od), polpa (p), pré-dentina (pd), bainha epitelial de Hertwig (hers). Adaptado de *Young et al, 2002*



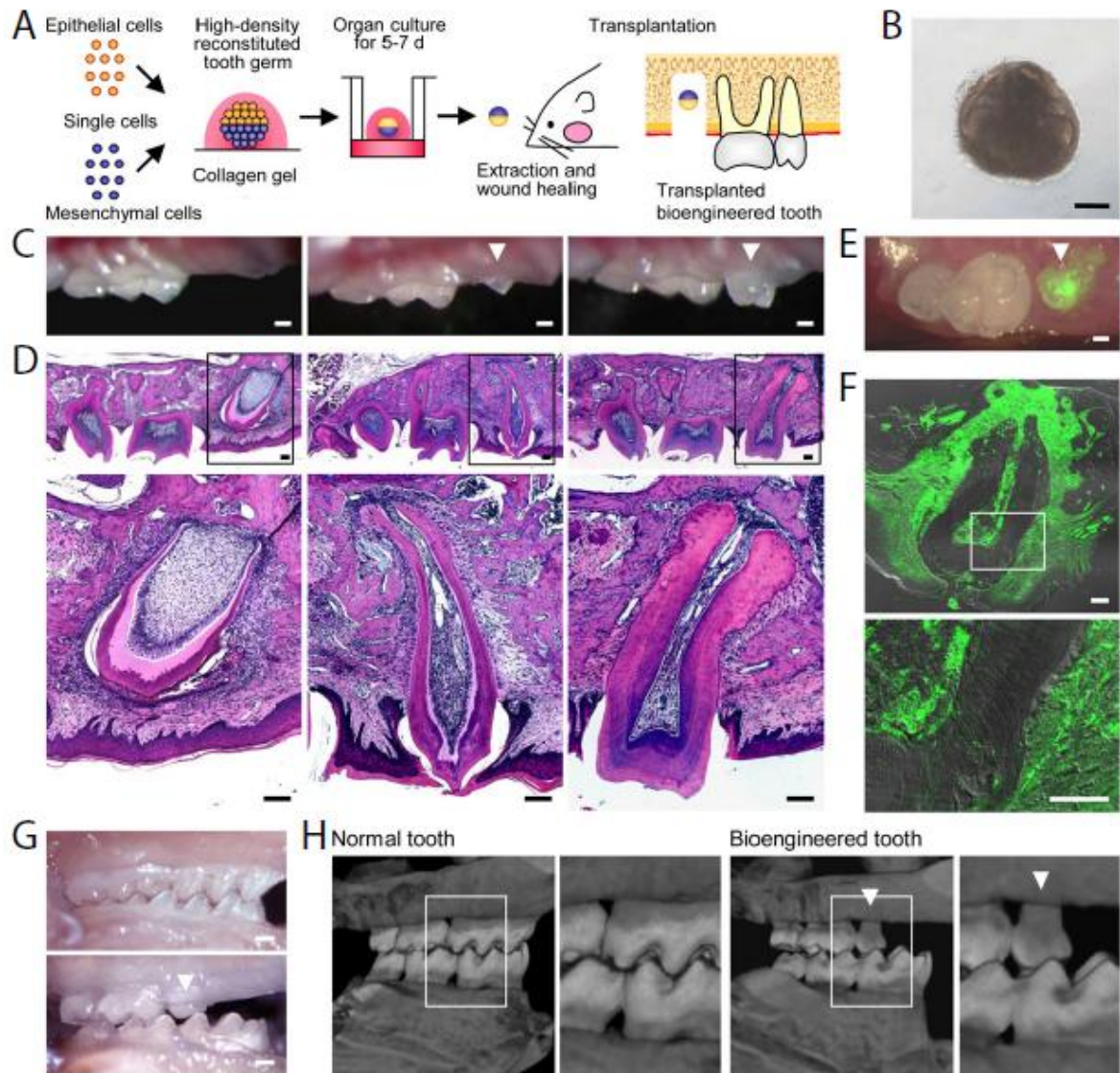
**Fig. 26**– Exame histológico após 12 dias de desenvolvimento na cápsula renal. Osso (BO), ameloblastos (AM), odontoblastos (OD), polpa dentária (DP), esmalte (E) e dentina (D). Adaptado de *Ohazama et al, 2004*



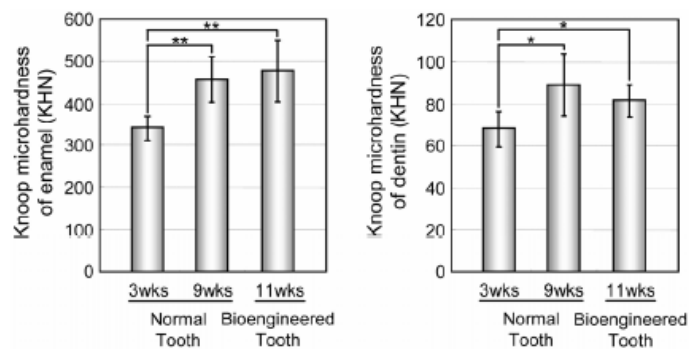
**Fig. 27**– Exame histológico após 26 dias. Formação de um dente histologicamente normal apresentando dentina (d), pré-dentina (pd) e PDL. Adaptado de *Ohazama et al, 2004*



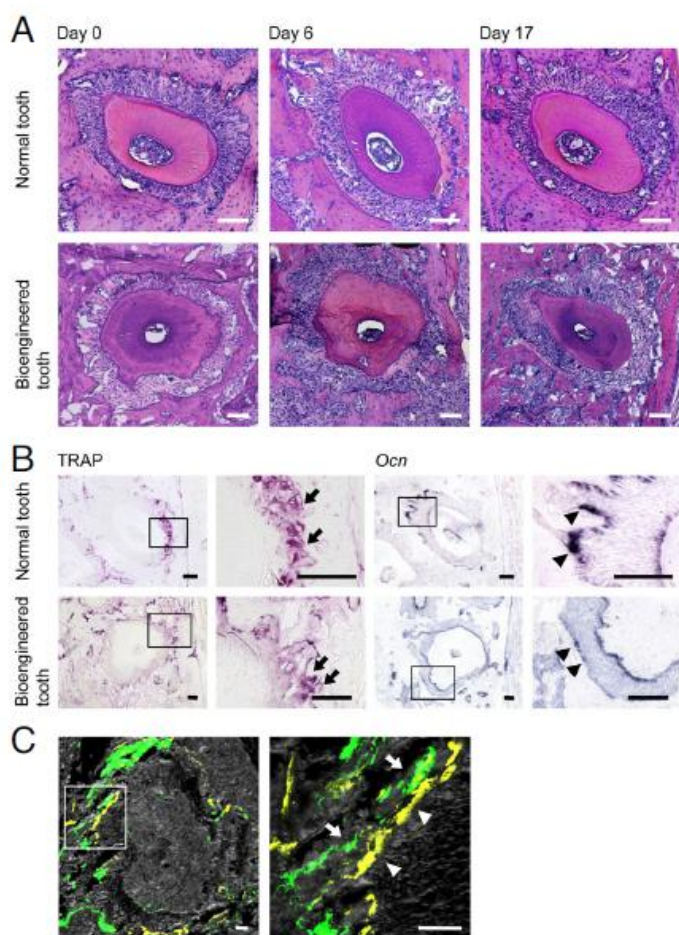
**Fig. 28**– Erupção de um dente no diastema do rato. Adaptado de *Yen & Sharpe, 2008*



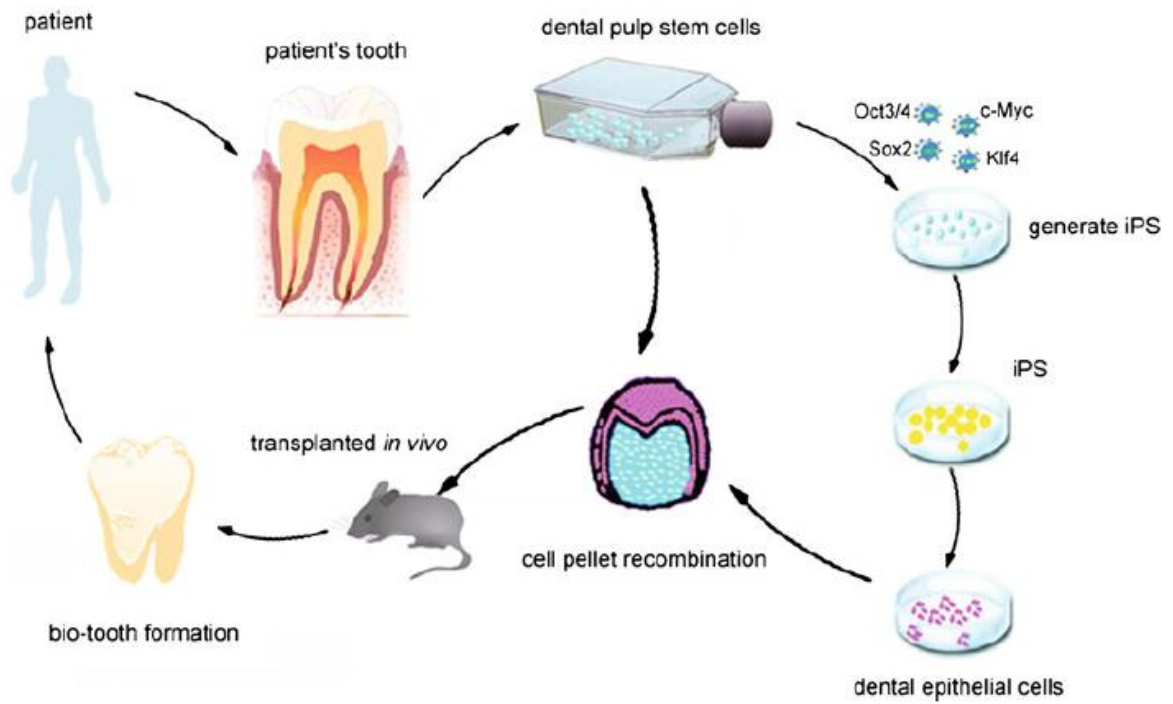
**Fig. 29**– Erupção e oclusão de um “biodente”. (A) Representação esquemática da técnica utilizada. (B) Imagem de contraste do germe em cultura 5 dias após a sua colocação. (C) Fotografias orais durante a erupção e oclusão. (D) Análise histológica antes da erupção (imagem da esquerda), imediatamente após a erupção (imagem do centro) e em oclusão (imagem da direita). (E) Fotografia oral. (F) Imagem seccional fluorescente. (G) e (H) Fotografia orais. Adaptado de *Ikeda et al, 2009*



**Fig. 30**– Avaliação da dureza do biodente através do teste Knoop. Adaptado de *Ikeda et al, 2009*



**Fig. 31**– Análise histológica após a aplicação de forças mecânicas. (A) Cortes horizontais da raiz do dente normal (em cima) e do “biodente” (em baixo). (B) Células TRAP-positivas (seta) e células Ocn mRNA-positivas (triângulo). (C) Deposição de tetraciclina (triângulo) e calceína no lado da tensão (seta). Adaptado de *Ikeda et al, 2009*



**Fig. 32**– Formação de um “biodente” a partir de iPSC. Adaptado de *Yan et al, 2011*