

CURSO DE ODONTOLOGIA

Marla Cuppini

**ENGENHARIA TECIDUAL APLICADA À ODONTOLOGIA:
ESTADO DA ARTE**

Santa Cruz do Sul
2015

Marla Cuppini

**ENGENHARIA TECIDUAL APLICADA À ODONTOLOGIA:
ESTADO DA ARTE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso de Odontologia da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC.

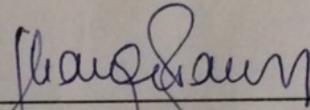
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suziane Maria Marques Raupp.

Santa Cruz do Sul
2015

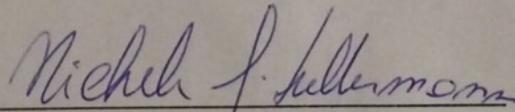
Marla Cuppini

**ENGENHARIA TECIDUAL APLICADA À ODONTOLOGIA:
ESTADO DA ARTE**

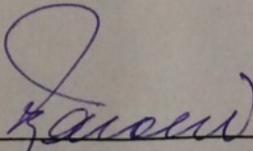
Esse trabalho foi submetido ao processo de avaliação por banca examinadora do Curso de Odontologia da Universidade de Santa Cruz do Sul - UNISC, como requisito para obtenção do título de Cirurgião-Dentista.



Prof^ª. Dr^ª. Suziane Maria Marques Raupp
Professora Orientadora – UNISC



Prof^ª. Dr^ª. Michele Gassen Kellermann
Professora Examinadora – UNISC



Prof. Dr. Dennis Baroni Cruz
Professor Examinador – UNISC

Santa Cruz do Sul

2015

“A journey of a thousand miles begins with a single step“.

Lao Tzu

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marlene e Nei por me darem todo amor, carinho e conforto que um filho possa ter, por abdicarem de suas próprias vontades para que as minhas pudessem ser feitas. Vocês dois são o maior exemplo de vida que eu desejo seguir. Obrigada por sempre acreditarem em mim, mesmo quando eu também tinha dúvidas. Amo vocês.

À minha irmã Nadia, por se fazer presente mesmo estando longe, pelo amor incondicional de irmã, pela voz de segunda mãe e pela cumplicidade que teremos por toda vida, meu maior orgulho é você!

Ao meu irmão Nédio e minha irmã emprestada Fernanda, por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, por serem um ombro confiante, pelos conselhos e pelas verdades, mas principalmente por terem trazido ao mundo meu sobrinho Theo, que é a maior prova de que a felicidade está em um sorriso. Vocês três moram no meu coração.

Às minhas amigas, sinto-me honrada só de conviver com pessoas como vocês, obrigada por tudo que passamos juntas e por sempre estarem presente quando eu mais precisei. A minha lealdade à vocês será eterna.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Suziane Maria Marques Raupp, por acreditar no meu potencial, por topa ser minha orientadora durante dois anos e por principalmente, ser a pessoa extraordinária que és. Obrigada pela paciência, pelas respostas rápidas e pelos conselhos sinceros. És uma referência de profissional para mim, sinto-me honrada por ter tido a oportunidade de ser tua orientada.

Enfim, à vida e pelas maravilhosas oportunidades que eu tenho tido a chance de abraçar.

RESUMO

A Engenharia Tecidual é um campo de pesquisa interdisciplinar que combina os princípios da engenharia de biomateriais e das ciências da saúde, rumo ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas e substitutos biológicos que visam restaurar, manter, substituir ou melhorar as funções dos tecidos ou órgãos perdidos. A terapia celular da Engenharia tecidual é considerada uma tríade, na qual estão presentes as células-tronco, matrizes proteicas extracelulares e sinais morfogênicos. Combinando esses três fatores com o aporte vascular, as interações entre as moléculas da matriz proteica extracelular e as células-tronco irão fornecer a base para traduzir ciência básica em componentes reais desenvolvidos a partir dessa tríade, sendo possível arquitetar uma estrutura favorável à regeneração de tecidos lesados, assim guiando uma nova fronteira para a Odontologia moderna. O objetivo deste estudo é apresentar os princípios subjacentes da tríade da Engenharia de Tecidual em um cenário atual, assim como os desafios e as perspectivas desta área na Odontologia. O crescimento da engenharia de tecidos como campo de pesquisa tem proporcionado um novo conjunto de estratégias terapêuticas para aplicações biomédicas, de fato, a engenharia de tecidos pode levar a novas estratégias para o manejo clínico de pacientes com necessidades de repor tecidos lesados em um futuro próximo.

Palavras-chave: Células-tronco; Odontologia regenerativa; Engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Tissue engineering is an interdisciplinary field that combines the principles of biomaterials engineering and biological sciences toward the development of therapeutic strategies and biological substitutes that restore, maintain, replace or improve biological functions. Tissue engineering is considered as a triad, in which are present stem cells, extracellular matrix protein and morphogenic signals. Combining these three factors with vascular supply, the interactions between the molecules of the extracellular matrix protein and stem cells will provide the design basis for translating basic science into real components developed from this triad, in order to construct a favorable structure for the regeneration of injured tissues, thus guiding a new frontier for modern dentistry. The objective of this study is to present the principles underlying tissue engineering triad and the current scenario, the challenges and the perspectives of this area in Dentistry. The growth of tissue engineering as a research field has provided a novel set of therapeutic strategies for biomedical applications, indeed, the tissue engineering may lead to new strategies for the clinical management of patients with dental and craniofacial needs in the future.

Keywords: Stem cells; Regenerative dentistry; Tissue engineering.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina-trifosfato
BMP	Proteína óssea morfogenética
CG	Complexo de Golgi
DFSCs	<i>Dental Follicle Stem Cells</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPSCs	<i>Dental Pulp Stem Cells</i>
ECMs	Matrizes proteicas extracelulares
miRNA	Micro RNA
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
PDLSCs	<i>Periodontal Ligament Stem Cells</i>
PSCaP	<i>Plasma sprayed calcium-phosphate</i>
RE	Retículo Endoplasmático
REI	Retículo Endoplasmático Liso
REr	Retículo Endoplasmático Rugoso
rhBMP-2	Proteína óssea morfogenética recombinante humana 2
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _r	RNA ribossomal
RNA _t	RNA transportador
SCAPs	<i>Stem Cells from Apical Papilla</i>
SHED	<i>Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth</i>
TGF-β	Fatores de crescimento beta
TGPCs	<i>Tooth Germ Progenitor Cells</i>
Ti	Titânio puro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1	Conceitos básicos de biologia molecular	12
2.1.2	Constituintes moleculares	12
2.1.2.1	Proteínas	13
2.1.2.2	Carboidratos	13
2.1.2.3	Lipídeos	13
2.1.2.4	Ácidos nucleicos	14
2.1.2.4.1	Ácido desoxirribonucleico (DNA)	14
2.1.2.4.2	Ácido ribonucleico (RNA)	15
2.1.3	Células eucarióticas X células procarióticas	15
2.1.3.1	Células procariontes	16
2.1.3.2	Células eucariontes	16
2.1.4	Citoesqueleto	16
2.1.5	Organização estrutural da célula	17
2.1.5.1	Membrana plasmática	17
2.1.5.2	Citosol	17
2.1.5.3	Organelas	18
2.1.5.3.1	Núcleo	18
2.1.5.3.2	Ribossomos	19
2.1.5.3.3	Reticulo endoplasmático (RE)	19
2.1.5.3.4	Complexo de Golgi (CG)	20
2.1.5.3.5	Mitocôndrias	21
2.1.5.3.6	Lisossomos	22
2.1.5.3.7	Peroxisomos	22
2.1.6	Expressão do gene	22
2.1.6.1	Transcrição	23
2.1.6.2	Tradução (síntese de proteínas)	23
2.2	Tríade da regeneração de tecidos odontogênicos	24
2.2.1	Células-tronco	25
2.2.1.1	Histórico	26

2.2.1.2	Células-tronco de origem odontogênica.....	28
2.2.1.2.1	Células-tronco derivadas da polpa dentária (DPSCs, TGPCs SHED)	29
2.2.1.2.2	Células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs).....	30
2.2.1.2.3	Células-tronco do folículo dentário (DFSCs).....	30
2.2.1.2.4	Células-tronco da papila apical (SCAP)	31
2.2.2	Matriz extracelular (<i>scaffold</i>)	31
2.2.3	Sinalização celular.....	36
2.2.3.1	Fatores de crescimento.....	37
2.3	Engenharia tecidual.....	39
2.3.1	Aplicações de células-tronco na área da saúde.....	39
2.3.2	Aplicações de células-tronco na odontologia.....	40
2.4	Futuro das células-tronco na odontologia.....	46
3	METODOLOGIA.....	47
3.1	Delineamento do estudo.....	47
3.2	Seleção do material bibliográfico.....	47
4	DISCUSSÃO.....	48
5	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O uso de materiais sintéticos restauradores como substitutos permanentes para estruturas dentais comprometidas é uma prática que vem ocorrendo desde o início da Odontologia. Uma grande parcela dos procedimentos realizados na clínica odontológica está limitada a substituição de tecidos degenerados por materiais sintéticos, que podem ou não possuírem características físicas, biológicas e químicas semelhantes as dos tecidos originais. Essas diferenças, juntamente com as interações da cavidade oral, pode resultar em curta durabilidade e insucesso nos tratamentos realizados com esses materiais (ROSA et al., 2012).

Mais de 85% da população necessita reparo ou substituição de alguma estrutura craniofacial. Esses defeitos podem ser uma simples perda dentária até grandes defeitos ósseos, anomalias congênitas e recessões oncológicas. A regeneração de tecidos faciais apresenta um enorme desafio que requer o conhecimento de ciência básica, de procedimentos clínicos e tecnológicos por parte da bioengenharia. O desejo de criar alternativas mais biológicas para o uso de materiais estáticos e sintéticos inspirou o campo da Engenharia Tecidual (SCHELLER; KRESBACH; KOHN, 2009).

Com o avanço no desenvolvimento da Engenharia Tecidual na última década, a Odontologia passou a explorar o potencial de reparo e regeneração tecidual. A evolução da tecnologia de DNA recombinante e do sequenciamento do DNA, tornou possível o isolamento e determinação de genes dos mais diferentes organismos, desta forma, com a disponibilidade de novos recursos, vários mecanismos biológicos, como a replicação do DNA e a divisão celular, começaram a ser intensamente estudados (CASAGRANDE; NOR, 2013).

As conquistas obtidas através da Engenharia Tecidual vêm disponibilizando novas terapias, como a produção de pele para o tratamento de queimaduras, enxertos ósseos para a substituição de grandes defeitos ósseos, artérias de menor calibre para o tratamento de aterosclerose vascular e cartilagem para cirurgias plásticas e reconstrutivas. Na Odontologia, o intuito da Engenharia Tecidual é regenerar estruturas como a articulação temporomandibular, glândulas salivares, ligamento periodontal, osso, dentina, esmalte, polpa e tecidos associados às estruturas dentárias (SCHELLER; KRESBACH; KOHN, 2009; SAKAI et al., 2010; CHEN et al., 2012; ROSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

Dentro desta nova perspectiva da ciência, os custos requeridos para introduzir tecnologias de última geração ao alcance de cientistas e pesquisadores da área, construir instalações de armazenamento e obtenção de células-tronco, e produção de matrizes biocompatíveis a preços acessíveis é um desafio no avanço da terapia celular para o uso clínico (ROSA et al., 2012).

A partir da hipótese de que a Engenharia Tecidual representa a nova fronteira do conhecimento para as ciências da saúde, na busca por um substituto biológico para manter, restaurar ou melhorar a função de seus órgãos ou tecidos, propõem-se nesta revisão de literatura, abordar o histórico da terapia celular, suas propriedades, modo de ação e técnicas de Engenharia Tecidual, assim como detalhar acerca de Células-Tronco de origem odontogênica, matriz extracelular (*scaffolds*) e sinalização celular. Analisa-se também os avanços relevantes a respeito da viabilidade do uso da Engenharia Tecidual, assim como a segurança relacionada a seu uso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceitos básicos de biologia molecular

Todos os seres vivos são constituídos de pequenas estruturas chamadas de células. Essas células são muito complexas e distintas, e são consideradas a menor unidade de vida dos organismos vivos, sendo assim a forma mais básica e simples da vida. Nessas estruturas celulares estão contidas características morfológicas e fisiológicas de cada indivíduo, por isso cada especificidade de um determinado organismo depende de suas células, por meio de seu material genético (ROSSETTI, 2012).

As células de diferentes organismos podem ser parecidas quanto à estrutura e organização celular, mas ao analisar os constituintes moleculares de cada ser vivo, deve ser levado em conta não somente as propriedades constituintes de cada molécula, mas também todo o meio em que estão envolvidas e suas interações. Essa análise é considerada ainda mais importante em indivíduos multicelulares, como os seres humanos (ROSSETTI, 2012).

Os avanços nos conhecimentos de biologia molecular a respeito da organização e função celular, proporcionarão uma nova maneira de realizar o diagnóstico e o tratamento de doenças. Esse novo jeito de pensar, baseado numa Odontologia contemporânea demandará o entendimento dos eventos celulares envolvidos no processo saúde/doença dos indivíduos (CASAGRANDE; NOR, 2013).

2.1.2 Constituintes moleculares

Os constituintes moleculares são as moléculas, ou macromoléculas, responsáveis pelas inúmeras reações bioquímicas que acontecem a nível celular. Essas reações indispensáveis aos organismos vivos, acontecem na sua maioria em meio aquoso. Por isso, a água é considerada como maior constituinte celular (ROSSETI, 2012).

Além da água, as células são basicamente constituídas por três polímeros (proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos), e uma grande quantidade de lipídeos (ácidos graxos na maioria das células) (ROSSETI, 2012).

2.1.2.1 Proteínas

Proteínas são polímeros de aminoácidos expressados pela informação contida no gene, por isso é o gene que determina a sequência de aminoácidos das mais específicas proteínas. Com exceção à água, é o componente mais abundante presente nos organismos vivos, podendo totalizar cerca de 50% de sua matéria seca. Nos seres humanos as proteínas representam cerca de 15% da massa corpórea total (CORTELAZZO, 2007; ROSSETTI, 2012).

As proteínas são responsáveis por inúmeras atividades citológicas. Existem proteínas relacionadas a mecanismos de defesa, hormônios proteicos, reserva nutritiva, transporte via proteínas (hemoglobina), além da movimentação celular. As funções mais conhecidas são as das proteínas estruturais (colágeno, proteoglicanas e queratinas), e das enzimas, que exercem funções catalisadoras, aumentando a velocidade das reações metabólicas consideravelmente (CORTELAZZO, 2007).

2.1.2.2 Carboidratos

Os carboidratos são açúcares simples (monossacarídeos), e representam uma extensa classe de moléculas biológicas que influem nas funções celulares. Os polímeros de carboidratos (polissacarídeos) são uma grande cadeia de monossacarídeos que constituem a função fundamental dessa molécula, sendo a principal fonte de energia celular (ROSSETTI, 2012).

2.1.2.3 Lipídeos

Os lipídeos são um agrupamento que não forma cadeias poliméricas, a característica que os mantém unidos é a pouca solubilidade em água, pois são solúveis somente a solventes orgânicos. Essa propriedade, em particular, promove associações do tipo anfipáticas (moléculas lipídicas com interações não covalentes em meio aquoso), importantes para o meio celular, pois é através delas que se formam as micelas e bicamadas, constituintes das membranas biológicas (ROSSETTI, 2012).

2.1.2.4 Ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos são polímeros lineares de nucleotídeos unidos por uma ligação fosfodiéster, existindo dois tipos distintos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA) (ROSSETTI, 2012).

O DNA e o RNA são estruturas moleculares de enorme importância biológica, pois é a partir deles que a síntese proteica é realizada. São responsáveis, portanto, de estocar e transmitir a informação gênica nas células (ROSSETTI, 2012).

A estrutura dos ácidos nucleicos é semelhante, ambos possuem apenas quatro tipos diferentes de nucleotídeos. Os nucleotídeos são compostos por um grupamento fosfato, um açúcar (pentose) e uma base nitrogenada heterocíclica (púridica ou pirimídica), que estão unidos por ligações covalentes (ROSSETTI, 2012).

Através do açúcar formador, tem-se a diferenciação entre DNA e RNA, no DNA estará presente a desoxirribose, e no RNA a ribose. Ligados a essas pentoses estão as bases heterocíclicas, que podem ser originadas dos compostos purina ou pirimidina (nucleosídeos). As bases púricas são conhecidas como adenina (A) e guanina (G), já as bases pirimídicas são chamadas de citosina (C), uracila (U) e timina (T) (CORTELAZZO, 2007).

2.1.2.4.1 Ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA é composto pelas bases A, T, G, C em sequência linear, e contém toda a informação genética de um organismo vivo. O arranjo espacial deste ácido nucleico é em forma de dupla-hélice, onde cada fita de DNA é uma sequência de 20 aminoácidos enrolada na outra. As bases estão localizadas no interior da hélice, ligadas por pontes de hidrogênio (ROSSETTI, 2012).

As pontes de hidrogênio estão presentes em quantidades diferentes conforme as bases ligadas, entre a ligação A/T existem duas pontes, e entre C/G existem três pontes, dessa maneira essas são as únicas ligações possíveis entre bases. As partes mais estáveis das fitas de DNA estão localizadas conforme a disposição das bases C/G, que apresentam mais pontes de hidrogênio na sua estruturação (ROSSETTI, 2012).

2.1.2.4.2 Ácido ribonucleico (RNA)

A estrutura do RNA é muito semelhante a do DNA, exceto pela substituição do açúcar desoxirribose pela ribose, e da base timina pela uracila. A molécula de RNA não é dupla como a do DNA, sendo encontrada apenas na forma de uma simples cadeia de polinucleotídeos (CORTELAZZO, 2007; ROSSETTI, 2012).

A síntese do RNA ocorre através de uma molécula de DNA que lhe serve de molde, assim, pode-se encontrar RNA no núcleo das células eucariontes, onde será feita a sua transcrição. O DNA pode transcrever até quatro famílias distintas de RNA: RNA transportador (RNAt), RNA mensageiro (RNAm), RNA ribossomal (RNAr) e o micro RNA (miRNA) (CORTELAZZO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

O RNA transportador é responsável pelo transporte dos resíduos de aminoácidos para a síntese proteica nos ribossomos. O RNAt corresponde aproximadamente de 10 a 15% do total de RNA encontrado na célula. Outra família de RNA é o RNA mensageiro (RNAm), que tem a função de codificar as proteínas (transferir a informação genética do DNA) nos ribossomos. A família de RNA ribossomal (RNAr), correspondente cerca de 75 a 80% do RNA presente nas células. O RNAr é fruto da transcrição do DNA, e juntamente com dezenas de proteínas forma uma organela conhecida como ribossomo. A última família de RNA é o micro RNA. Os miRNAs são moléculas menores, de fita simples (cerca de 21 a 23 nucleotídeos), elas chegam a ser transcritas mas não são traduzidas. Essas moléculas menores de RNA funcionam na expressão gênica, diminuindo sua taxa ao se ligar com os RNAm (CORTELAZZO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011; SCHRANK, 2012a).

2.1.3 Células eucarióticas X células procarióticas

Através da microscopia, foi descoberto que existem fundamentalmente duas classes de células: as procariontes, cujo material genético não está separado do citosol por membrana, e as eucariontes, as quais possuem um núcleo bem delimitado que individualiza seu material genético com o citosol (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

2.1.3.1 Células procariontes

Os procariotos incluem as bactérias e as arqueas a sua formação, e são organismos compostos de uma única célula (unicelulares), sendo mais simples na sua conformação. Esses organismos são capazes de se associarem e de viverem em colônias (ROSSETTI, 2012).

2.1.3.2 Células eucariontes

As células eucarióticas são as células que não somente abrangem organismos como plantas pluricelulares, animais, fungos e protozoários, mas também alguns organismos unicelulares (algas verdes e leveduras). Os organismos eucariotos são considerados mais complexos, e sua principal diferença celular com os organismos procariotos é que estes possuem organelas na composição de suas células. A organela eucariótica mais importante é o núcleo, que contém o genoma (ROSSETTI, 2012).

2.1.4 Citoesqueleto

O termo citoesqueleto designa a complexa rede de filamentos proteicos componentes das células eucariontes. Esses filamentos são responsáveis pela sustentação interior da célula, manutenção de sua forma, movimentação celular e pelo transporte de substâncias variadas (LINO NETO; GÓES; CARVALHO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

O citoesqueleto é constituído por três principais tipos de filamentos, cada um composto por proteínas diferentes, são eles os microtúbulos, os filamentos de actina e os filamentos intermediários (LINO NETO; GÓES; CARVALHO, 2007).

Os microtúbulos são formados pelas tubulinas e têm a função de organizar o citoplasma, além disso, eles interagem com as organelas promovendo seus movimentos. Os filamentos de actina (compostos pela proteína actina), assim como os filamentos intermediários, estão presentes em todo o citoplasma, formando uma rede de sustentação citoplasmática e dando a forma celular (LINO NETO; GÓES; CARVALHO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.5 Organização estrutural da célula

Todas as células eucariontes apresentam a mesma estrutura, independente do tamanho do organismo vivo, formadas por membrana plasmática, citosol e núcleo.

2.1.5.1 Membrana plasmática

A membrana plasmática é a estrutura que circunda toda a célula e a limita com o meio externo. Quimicamente, a membrana plasmática é composta por uma camada dupla de lipídeos (da classe dos fosfolipídios), que são denominadas de folheto interno e externo, sendo o interno o mais próximo do citosol. Proteínas também são encontradas associadas à membrana, mediando necessidades e funções biológicas conforme a demanda celular (CHANDAR; VISELLI, 2011; ROSSETTI, 2012).

A bicamada lipídica da membrana a torna permeável a certos gases, como oxigênio e gás carbônico e impermeável para substâncias como açúcares, aminoácidos e íons inorgânicos, dessa forma, conseguindo controlar a passagem de substâncias para dentro e para fora da célula. Esse fenômeno se chama permeabilidade da membrana, sendo que a água é o único elemento que pode difundir-se livremente entre o meio externo e interno da célula. Todos os componentes da membrana são capazes de estabelecer uma barreira dinâmica, a fim de facilitar as suas funções biológicas e manter o ambiente interno da célula estável (CHANDAR; VISELLI, 2011; ROSSETTI, 2012).

2.1.5.2 Citosol

É denominado citosol todo volume interno do conteúdo celular compreendido pela membrana plasmática. O citosol é composto de uma combinação de diversas partículas e moléculas em uma solução aquosa complexa. No citosol das células eucariontes estão mergulhadas estruturas membranosas, as organelas (ROSSETTI, 2012).

2.1.5.3 Organelas

As organelas são estruturas delimitadas por membranas que formam diferentes compartimentos, nos quais as mais diversas funções celulares são realizadas. Cada organela possui uma quantidade diferente de enzimas catalisadoras para suas reações, assim, cada uma desenvolve um papel específico no crescimento e metabolismo molecular (ROSSETTI, 2012).

Cada organela pode desempenhar uma função individual na célula ou pode estar associada à outras organelas, desenvolvendo um papel de cooperação entre elas. No caso da expressão de genes do DNA, é necessário, por exemplo, que as organelas como o núcleo, ribossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi fiquem organizadas de certa forma dentro da célula, e devido à sua proximidade elas participam no processamento de proteínas (CHANDAR; VISELLI, 2011).

Outras organelas, além dessas associadas ao processamento das proteínas são encontradas no citosol, e possuem funções diferentes, porém de igual importância ao meio celular. São elas os lisossomos, peroxissomos e mitocôndrias (CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.5.3.1 Núcleo

Todas as células de origem eucariótica possuem um núcleo (exceto as hemáceas), onde se localizam a cromatina (DNA genômico e proteínas) e o nucléolo. O núcleo é envolto por uma membrana dupla, o envoltório (ou envelope) nuclear, que é constituído por fosfolipídios (CHANDAR; VISELLI, 2011; ROSSETTI, 2012).

Nessa dupla membrana fosfolipídica estão presentes poros nucleares, que são pontos de fusão entre as membranas nucleares interna e externa. Devido a complexidade dessas estruturas, elas são denominadas complexos de poros. Sua função é facilitar a transferência de materiais entre o núcleo e o citosol, como por exemplo o transporte de proteínas (CARVALHO, 2007).

A membrana externa do envoltório nuclear é associada a presença de ribossomos, e é continua com o retículo endoplasmático (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

Presente no nucleoplasma (fluido interno do núcleo) está o DNA genômico em forma de cromossomos. Para cada célula humana normal existem 23 pares de cromossomos presentes no núcleo. Os cromossomos estão organizados pela lâmina celular, constituída por uma rede de proteínas, que forma a associação entre o DNA e a membrana nuclear interna (CHANDAR; VISELLI, 2011).

A suborganela denominada nucléolo, tem como principal função a biogênese dos ribossomos. A falta de uma membrana que reveste o nucléolo pode significar que não há barreiras entre ele e o restante dos materiais encontrados no nucleoplasma. O nucléolo é considerado uma região rica em RNA, onde os mesmos são sintetizados a partir de um molde de DNA, e posteriormente enviados para o citoplasma através dos complexos de poros das membranas nucleares (MELLO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011; ROSSETTI, 2012).

2.1.5.3.2 Ribossomos

Esta organela celular é constituída de moléculas de RNAr (RNA ribossômico) e proteínas, divididas em duas subunidades, uma maior e outra menor. A subunidade maior apresenta três moléculas de RNAr e aproximadamente 50 proteínas, enquanto a subunidade menor é formada por uma molécula de RNAr e cerca de 30 proteínas (CHANDAR; VISELLI, 2011).

Os ribossomos estão altamente associados à síntese proteica, pois a tradução do RNAm ocorre na interface entre suas subunidades, que se associam quando é necessário fazer a tradução na ordem precisa determinada pelo DNA. As subunidades maiores ou menores podem ser encontradas também dissociadas no citosol, de forma livre, ou associadas ao retículo endoplasmático (GOMES; PIMENTEL; RECCO-PIMENTEL, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.5.3.3 Retículo endoplasmático (RE)

O retículo endoplasmático tem aparência de um sistema de túbulos interconectados, achatados e ramificados. Muitas vezes, ainda, podem ter forma de cisternas ou sacos, delimitados por membranas que formam uma cavidade, mais conhecida como luz (lúmen) (BERTACHINI-LOMBELLO; CARVALHO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

A quantidade de RE e sua localização a nível intracelular variam de acordo com o tipo e metabolismo molecular, porém, sabe-se que será sempre próximo ao núcleo, pois a camada externa do envoltório nuclear é contígua a esta organela. O RE ainda pode ser distinguido em dois tipos: o RE rugoso (REr) ou granular e o RE liso (REI) ou agranular (BERTACHINI-LOMBELLO; CARVALHO, 2007).

O REr apresenta ribossomos associados à sua estrutura e, normalmente são encontrados na forma de cisternas. Esses ribossomos juntamente com o REr estão envolvidos na síntese e modificação de moléculas proteicas. As proteínas produzidas por essas estruturas serão inseridas na membrana plasmática, e atuarão em parte nos lisossomos, no complexo de Golgi, no próprio RE ou serão secretadas para fora da célula. Os dois tipos de RE atuam na glicosilação (adição de carboidratos) de proteínas e na síntese de lipídios (BERTACHINI-LOMBELLO; CARVALHO, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

A associação de ribossomos ao RE é temporária, e depende do estado fisiológico de cada célula. Na ausência desses ribossomos, o RE é denominado REI, formando estruturas predominantemente tubulares. O REr e REI podem estar presentes na mesma célula, ou seja, áreas de RE não associadas a ribossomos podem ser substituídas por REr no caso de demanda celular que envolva intensa síntese proteica. O inverso também pode ocorrer, caso essa demanda cesse. A capacidade de conversão do RE em dois tipos diferentes o torna uma organela bastante dinâmica (BERTACHINI-LOMBELLO; CARVALHO, 2007).

2.1.5.3.4 Complexo de Golgi (CG)

O CG faz parte do complexo de membranas encontradas no citosol. Sendo que partindo do núcleo, será a próxima molécula encontrada logo depois do retículo endoplasmático. A sua estrutura é composta por um conjunto de sáculos achatados, aproximadamente circulares, também chamados de cisternas, podendo ainda serem encontrados empilhados e envoltos por membranas. As cisternas do CG são dispostas de maneira diversas e organizadas em três partes: cis, mediana e trans (BERTACHINI-LOMBELLO; LOURENÇO; CARVALHO, 2007).

As cisternas cis são localizadas mais próximas ao retículo endoplasmático possível. As cisternas que ocupam a posição mais central do CG são denominadas médias (ou medianas), e as cisternas trans são as que estão mais próximas da

membrana plasmática. Todas as cisternas constituintes do CG são responsáveis por realizar modificações distintas em proteínas recém-formadas, como glicosilação, fosforilação ou proteólise (clivagem da proteína mediada por enzimas) (CHANDAR; VISELLI, 2011).

Ainda fazendo parte do CG existem duas redes de compartilhamento especializadas, denominadas rede Golgi cis e rede Golgi trans. Essas redes estão associadas ao intenso brotamento e fusão de vesículas transportadoras. A rede Golgi cis (localizada entre RE e cisternas cis) é o local onde chegam as vesículas provenientes do RE, já a rede Golgi trans (localizada após as cisternas trans) é considerada o sítio de saída de materiais e substâncias para o meio extracelular, ou para outras células (BERTACHINI-LOMBELLO; LOURENÇO; CARVALHO, 2007).

2.1.5.3.5 Mitocôndrias

As mitocôndrias, no geral, apresentam formas alongadas, mas podem também ser encontradas na forma de corpúsculos esféricos. A quantidade presente dessas organelas depende do tipo celular em questão. Nas células em que a demanda energética é maior, mais mitocôndrias são encontradas distribuídas no seu citosol. A distribuição das mitocôndrias pode ser considerada totalmente ao acaso, porém em células musculares serão encontradas mais perto da região que necessitar mais energia, como nos filamentos contráteis (PIMENTEL, 2007).

Uma característica marcante das mitocôndrias é sua membrana dupla, de composição fosfolipídica, que delimitam esta organela interna e externamente. A membrana interna é pregueada, de modo que se formam cristas projetadas no lúmen mitocondrial, também conhecido como matriz (CHANDAR; VISELLI, 2011).

A principal função das mitocôndrias é fornecer energia para a célula, através das moléculas de ATP (adenosina-trifosfato). O processo de oxidação de moléculas orgânicas (respiração celular) é responsável pela liberação de energia e síntese de ATP, sendo que os maiores rendimentos de moléculas de ATP estão nos carboidratos e lipídeos (PIMENTEL, 2007; CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.5.3.6 Lisossomos

Os lisossomos são organelas geralmente esféricas e de tamanho muito variável. É delimitado por uma membrana, na qual moléculas de carboidrato, normalmente, se encontram associadas, para evitar a digestão da própria membrana pelas hidrolases (AZEREDO-OLIVEIRA; CARVALHO, 2011).

No interior dos lisossomos o pH é ácido e são encontradas potentes enzimas conhecidas como hidrolases ácidas, que são responsáveis pela clivagem de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos). O papel dos lisossomos se encaixa na reciclagem celular, onde macromoléculas podem se acumular até um nível tóxico no interior das células caso não sejam recicladas por estas organelas (CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.5.3.7 Peroxissomos

Os peroxissomos se assemelham muito aos lisossomos em tamanho e estrutura. Apresentam membrana simples e no interior dessa organela também são encontradas enzimas hidrolíticas (CHANDAR; VISELLI, 2011).

A função básica dos peroxissomos é degradar ácidos graxos e purinas, além de converter o peróxido de hidrogênio em uma molécula não tóxica, visto que é um produto sintetizado por diversas reações metabólicas realizadas à nível celular. Outra importante função dos peroxissomos é a síntese de mielina, que é a substância que forma uma camada protetora ao redor de muitos neurônios (CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.6 Expressão do gene

Expressão gênica é o processo pelo qual a informação hereditária contida em um gene (sequência de DNA), é processada em um produto gênico funcional (proteínas ou RNA). Cada gene possui duas informações, uma específica à estrutura primária do produto final e outra fundamental para a regulação dos produtos gênicos (CHANDAR; VISELLI, 2011).

A informação do material genético é transmitido para as células-filhas através da replicação do DNA, a partir desse evento a expressão do gene se inicia, pela

transcrição (síntese de RNA), e por intermédio do RNAm é feita a sua tradução em proteínas, sendo a segunda fase da expressão gênica, conhecida também como síntese proteica (CHANDAR; VISELLI, 2011).

2.1.6.1 Transcrição

Transcrição é o processo de síntese de RNA a partir de uma fita molde do DNA, sendo catalisada e mediada por RNA-polimerases. Esse RNA formado é o conhecido como transcrito primário, que após o seu processamento originará um RNAm, o qual informará ao RNAt a ordem correta dos aminoácidos a serem sintetizados em proteínas nos ribossomos (CHANDAR; VISELLI, 2011; SCHRANK, 2012b).

2.1.6.2 Tradução (síntese de proteínas)

A via da síntese de proteínas é também conhecida como tradução, isso devido ao processo que está envolvido, pois se resume na tradução da sequência de nucleotídeos do RNAm para uma sequência de aminoácidos (CHANDAR; VISELLI, 2011).

Para que o processo de tradução ocorra são necessárias certas estruturas: o código genético (uma trinca de nucleotídeos armazenados no DNA), aminoácidos, RNAm, RNAt, ribossomos funcionais, ATP, além de enzimas e fatores proteicos (CHANDAR; VISELLI, 2011; SCHRANK; VAINSTEIN, 2012).

A síntese proteica é dividida em três etapas: início, alongamento e término. O início da tradução envolve a montagem das estruturas envolvidas antes que ocorra alguma ligação peptídica, logo após é feita a adição de aminoácidos à cadeia polipeptídica, o que vai aumentar o tamanho dessa cadeia (alongamento), até que os ribossomos (polissomos) se movam de uma extremidade da cadeia polipeptídica para a outra (translocação). O término da síntese de proteínas se dá quando algum códon de terminação (UAG, UGA ou UAA) é encontrado, liberando então o recém-sintetizado polipeptídeo (CHANDAR; VISELLI, 2011; SCHRANK; VAINSTEIN, 2012).

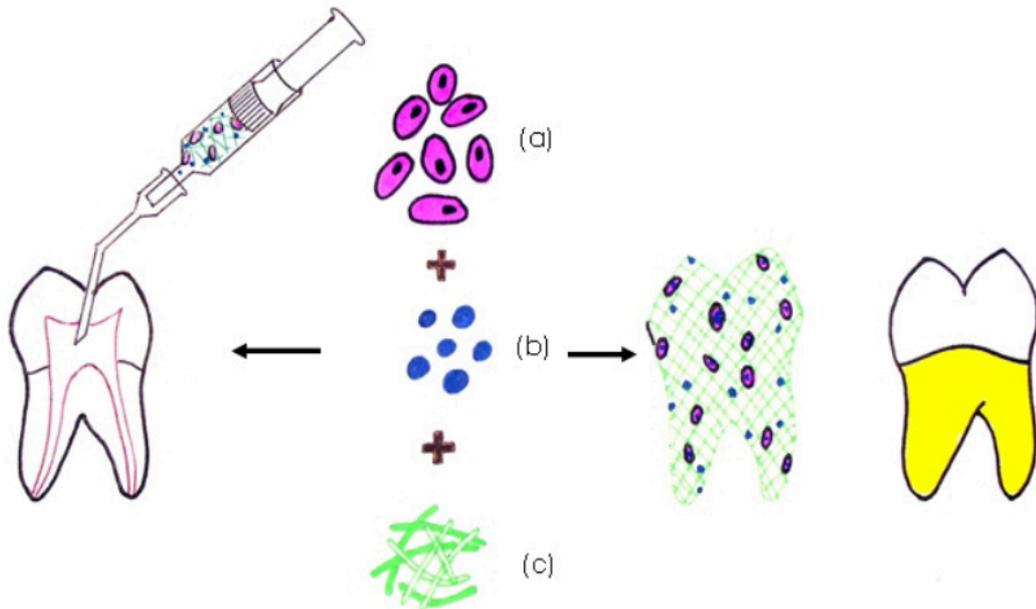
Após a compreensão fundamental de como os tecidos desenvolvem-se *in vivo* e quais são os constituintes críticos para a função à nível molecular, tal informação deve ser usada para formular estratégias para o reparo ou regeneração de tecidos

perdidos, como por exemplo, a utilização da tecnologia do DNA recombinante, na qual proteínas sintéticas podem ser criadas para imitar os constituintes de ECMs específicos. As relações entre estruturas e funções celulares são bases para estratégias de design dos elementos necessários para a Engenharia Tecidual, sendo essa considerada uma tríade: células-tronco, matrizes proteicas extracelulares e sinais morfogênicos. É um desafio decifrar o que estimula as células a mandarem sinais para organizarem-se em tecidos, quais células que devem ser direcionados e qual o nível de hierarquia é o mais crítico para o controle dessas sinalizações. A Engenharia de Tecidos vai além da medicina regenerativa, e incorpora as qualidades únicas da utilização dos métodos da engenharia como suporte para o desenvolvimento de abordagens com a possibilidade de controlar sistemas biológicos (SCHELLER; KRESBACH; KOHN, 2009).

2.2 Tríade da regeneração de tecidos odontogênicos

A associação de biomateriais, células-tronco, fatores de crescimento e diferenciação rendeu o desenvolvimento de novas oportunidades de tratamento em várias áreas biomédicas. Na odontologia, a presença dessa tríade (células-tronco, matrizes extracelulares biocompatíveis – *scaffolds* - e sinais morfogênicos), juntamente com o aporte vascular (presença de capilares sanguíneos), é a chave para a engenharia tecidual do complexo dentinopulpar e tecidos adjacentes. A esquematização da tríade da regeneração de tecidos odontogênicos está representada na figura 1 (SCHELLER; KRESBACH; KOHN, 2009; ROSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

Figura 1 - Esquemática dos fatores que direcionam a engenharia tecidual



(a) Células-tronco, (b) fatores de crescimento (sinais morfogênicos) e (c) *scaffolds*. A união dos itens representa um arcabouço tridimensional da tríade da regeneração tecidual.

Fonte: Sharma et al. (2014).

2.2.1 Células-tronco

Todas as células constituintes dos organismos vivos são derivadas de células precursoras. Essas células precursoras são capazes de se dividirem e formar novas células especializadas, que realizarão funções específicas em tecidos e órgãos. As células capazes de originar um organismo vivo são conhecidas também como células-tronco (CHANDAR; VISELLI, 2011).

As células-tronco são células imaturas, não especializadas e caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação e formação de diversas células-filhas, que estarão comprometidas em se diferenciar (modificação celular) em uma grande gama de tipos celulares (pluripotência) (CHANDAR; VISELLI, 2011; EGUSA et al., 2012).

Existem dois principais grupos de células-tronco: células-tronco embrionárias (ES) e células-tronco adultas, ambas encontradas naturalmente nos organismos vivos multicelulares. Adicionalmente a estes dois grupos existem as células-tronco induzidas (iPS), que são sintetizadas artificialmente (EGUSA et al., 2012).

As células-tronco adultas são encontradas em diferentes tecidos do corpo, incluindo medula óssea, cérebro, vasos sanguíneos, fígado, pele, retina, pâncreas, sangue periférico, músculos, tecidos adiposos e tecidos dentários (SEDGLEY; BOTERO, 2012).

As células-tronco embrionárias e as células tronco induzidas (iPS) são consideradas células-tronco pluripotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células conhecidas. Em contraste, células-tronco adultas são classificadas como células-tronco multipotentes, pelo fato de se diferenciarem em um limitado tipo de células (EGUSA et al., 2012).

Pelo fator ético, o uso de células-tronco embrionárias apresentam muitos dogmas e limitações, assim, as células-tronco adultas, principalmente as células-tronco mesenquimais, são a fonte de células-tronco mais utilizadas e estudadas na engenharia tecidual (ABBAS et al., 2012).

2.2.1.1 Histórico

É difícil dizer exatamente quando uma descoberta foi feita. Geralmente as informações são acumuladas durante um período extenso de tempo e, então, fica claro que algo foi descoberto. Este é o caso das células-tronco para a medicina moderna (MUMMERY et al., 2014).

O conceito de células-tronco marca sua origem no final do século XIX, como uma teoria sobre a habilidade de certos tecidos, como o sangue e a pele, de se regenerarem. Anos após esse primeiro conceito, foi descoberto que as células-tronco eram entidades celulares imaturas capazes de se diferenciarem em diversos outros tipos celulares (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008).

Na década de 1950, quase por acidente, a investigação sobre células-tronco começou. Enquanto investigava os efeitos de papel de cigarro e tabaco em modelo murino, o cientista Leroy Stevens (1953) notou a presença de um tumor em um de seus modelos murinos, localizado nos testículos de ratos adultos, o tumor foi classificado como teratoma, ou seja, uma massa de células imaturas diferenciadas indevidamente, contendo ossos, tecidos relacionados à formação de dentes e cabelo. O pesquisador descobriu então, que através da injeção de células-tronco derivadas da massa celular interna de blastócitos embrionários em testículos de outro modelo murino, ele poderia induzir a formação de um teratoma. Em uma série

de experimentos, ele provou que as células-tronco poderiam ser obtidas a partir de um embrião, e forçadas a se diferenciarem quando colocadas em um organismo vivo. Um ano depois, em 1954, o Dr. John Enders, da Universidade de Harvard começou a usar células-tronco derivadas de rim fetal para produzir poliovírus, e por esse trabalho foi premiado com o Prêmio Nobel de Medicina (MUMMERY et al., 2014).

As primeiras terapias médicas baseadas na utilização de células-tronco tornaram-se disponíveis no final da década de 1960. Em 1968, o Dr. Robert Good, tratou um menino com apenas 8 anos de idade, que sofria do transtorno genético da Síndrome da Imunodeficiência Combinada Grave (SCID), conhecida geralmente como a "desordem do menino bolha" na qual não há glóbulos brancos funcionais, com transplante de medula óssea extraído de sua irmã. Após o transplante, a criança foi reavaliada e notou-se que existia neoformação de células sanguíneas brancas, provando que a medula óssea transplantada continha células-tronco do sangue, e que estas células foram capazes de sobreviver e de se diferenciar em um novo organismo (MUMMERY et al., 2014).

Nos anos de 1970 e 1980, as células-tronco embrionárias demonstraram originar espontaneamente um número de diferentes tipos celulares, ao diferenciarem-se e ao replicarem-se em uma placa de Petri. Uma das descobertas mais excitantes relacionados à investigação de células-tronco ocorreu em 1996, quando os cientistas do Instituto Roslin, na Escócia, anunciaram o nascimento da ovelha Dolly, o primeiro animal clonado a partir de células-tronco adultas (MUMMERY et al., 2014).

Cientistas nos Estados Unidos também estavam pesquisado sobre esse novo horizonte da medicina moderna. Em 1998, duas equipes de pesquisa liderada pelos Drs. James Thompson, da *Wisconsin University* e John Gearhart, da *Johns Hopkins University* desenvolveram as primeiras linhas de pesquisa sobre células-tronco. Através das células-tronco embrionárias que foram colocadas em uma placa de Petri e induzidas a se replicar, reproduzindo uma fonte permanente de células-tronco pluripotentes (MUMMERY et al., 2014).

Dr. Thompson e seus colegas obtiveram a fonte de sua linha de células-tronco a partir de células retiradas de embriões excedentários doados voluntariamente por casais submetidos a tratamento de fertilidade (fertilização in vitro - FIV). Já Dr. Gearhart, pesquisava com linhas celulares de fetos não desenvolvidos, através do

aborto no primeiro trimestre de gestação. Os pesquisadores provaram que as células-tronco poderiam ser replicadas indefinidamente e que possuíam o potencial de se transformar em qualquer tecido ou órgão do corpo, mantendo assim, uma grande promessa para o tratamento e para a cura dos mais variados tipos de doenças. Antes disso, os embriões de animais eram a única fonte de células-tronco embrionárias, porém quando o estudo estava avançando em um ritmo considerado avassalador muitos problemas relacionados à ética de utilizar células provenientes de fetos foram encontrados. Hoje, os estudos relacionados as células-tronco, principalmente às células-tronco embrionárias, devem ser aprovados por um comitê de ética antes de serem postos em prática (MUMMERY et al., 2014).

O principal acontecimento na história das células-tronco em Odontologia regenerativa foi em 2000, quando Gronthos et al., identificaram e isolaram células-tronco através da polpa dentária, conhecidas como *Dental Pulp Stem Cells (DPSCs)*. Desde a descoberta, vários tipos de células-tronco de origem odontogênicas foram reportados e estudados.

2.2.1.2 Células-tronco de origem odontogênica

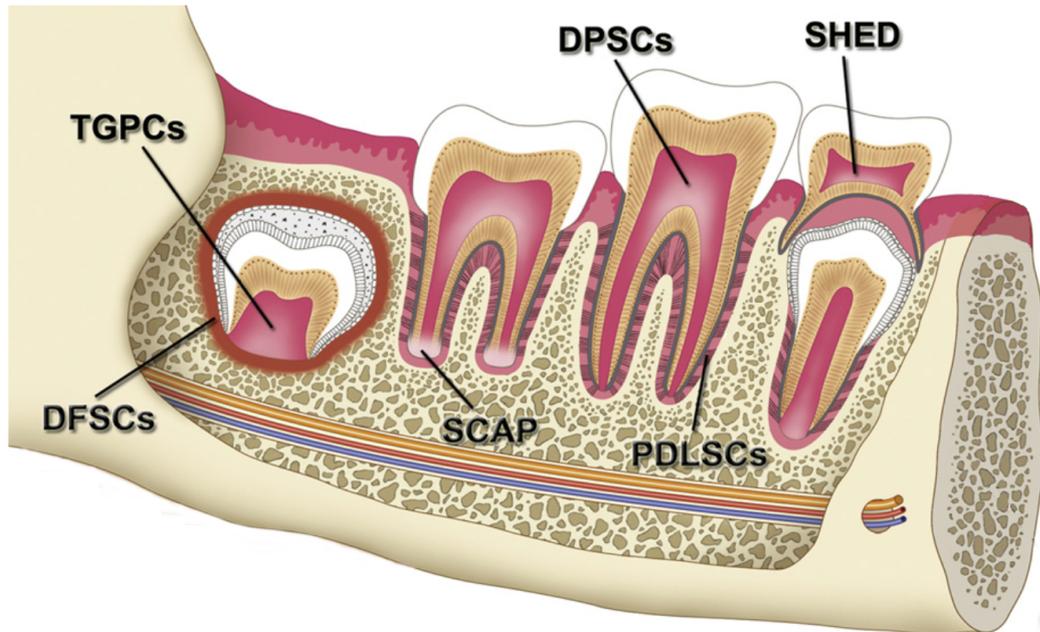
As estruturas dentárias se desenvolvem como resultado de cuidadosas interações entre as células do epitélio oral do ectoderma (formação de esmalte) e da crista neural, derivada de células mesenquimais (formação do folículo dentário e da papila dentária). Os componentes mesenquimais dão origem à estruturas, como dentina, polpa, ligamento periodontal e cimento (SEDGLEY; BOTERO, 2012).

As células-tronco de origem odontogênicas encontradas após o nascimento são classificadas como células-tronco adultas de origem mesenquimal. Essas células são encontradas em diferentes nichos, podendo ser obtidas através da polpa dos dentes decíduos e permanentes, ligamento periodontal e de outras estruturas dentais (SUJESH et al., 2011).

Os tipos de células-tronco de origem odontogênica dividem-se em: células-tronco da polpa dental (DPSCs – *Dental Pulp Stem Cells*), células-tronco do germe dos terceiros molares (TGPCs – *Tooth Germ Progenitor Cells*), células-tronco da polpa dental de dentes decíduos exfoliados (SHED – *Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth*), células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs – *Periodontal Ligament Stem Cells*), células-tronco do folículo dentário (DFSCs –

Dental Follicle Stem Cells) e células-tronco da papila apical (*SCAPs – Stem Cells from Apical Papilla*), e estão ilustradas na figura 2 (SUJESH et al., 2011; SEDGLEY; BOTERO; EGUSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

Figura 2 - Esquematização das células-tronco de origem odontogênica



Fonte: adaptado de Egusa et al. (2012).

2.2.1.2.1 Células-tronco derivadas da polpa dentária (DPSCs, TGPCs SHED)

A câmara pulpar abriga a polpa dentária, um nicho rico em células-tronco mesenquimais. Essas células provenientes de dentes permanentes são chamadas de DPSCs, e as de dentes decíduos exfoliados são conhecidas como SHED (SIAL et al., 2012).

Ikeda et al. (2008) identificaram células-tronco mesenquimais distintas no germe dentário de terceiros molares. Presentes no estágio histológico de campânula, as TGPCs (*Tooth Germ Progenitor Cells*), possuem alta capacidade de diferenciarem-se *in vitro* em três diferentes tipos celulares: odontoblastos, células neurais e hepatócitos.

O potencial regenerativo do complexo dentinopulpar, para formar dentina reparativa frente às injúrias como lesões cáries ou traumas, sugere a presença de células progenitoras de dentina (secretoras de matriz dentinária), ou seja, a presença de células dentinogênicas. Essa população de células, quando isolada,

mostra origem ectomesenquimal e foi caracterizada como DPSCs (GRONTHOS et al., 2000; MACHADO; FERNANDES; GOMES, 2012).

As células-tronco da polpa dental de dentes decíduos exfoliados (SHED), são células altamente proliferativas, com características clonogênicas. Essas células tem alta plasticidade, ou seja, são capazes de se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares (células neurais, adipócitos e odontoblastos) (MIURA et al., 2003; YAMAZA et al., 2010; MATHUR et al., 2014).

Dentes decíduos, apesar de sua formação, tecidos, estruturas e funções serem quase as mesmas dos dentes permanentes, são distintos quando analisados a nível celular. As células-tronco encontradas na polpa de dentes decíduos exfoliados, apresentam uma taxa de proliferação maior e tendem a ser mais imaturas, além de serem capazes de induzir a formação óssea *in vivo*, de gerar dentina e de sobreviver em cérebros de modelos murinos com expressão de marcadores neurais (MIURA et al., 2003; YAMAZA et al., 2010; CHANDKI et al., 2011).

2.2.1.2.2 Células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs)

O ligamento periodontal é outra fonte de células-tronco odontogênicas, através das PDLSCs. Essas células vêm demonstrando uma capacidade de regenerar tecidos periodontais (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) em experimentos realizados em modelo murino (SEO et al., 2004; EGUSA et al., 2012).

Essa população celular pode ser encontrada em ligamentos periodontais de dentes sadios, nas suas superfícies radiculares (coronal, apical e região de furca). O estudo de Chen et al. (2006) mostra que em dentes periodontalmente comprometidos não foram encontradas PDLSCs na superfície coronal das raízes, pois estas áreas estavam comprometidas pelo processo da doença, porém nas superfícies radiculares apicais e regiões de furca foram encontradas PDLSCs iguais a de dentes sadios (CHEN et al., 2006; MACHADO; FERNANDES; GOMES, 2012).

2.2.1.2.3 Células-tronco do folículo dentário (DFSCs)

O folículo dentário é uma espécie de saco ectomesenquimal que envolve o germe dos dentes em desenvolvimento e que, posteriormente, se diferencia em ligamento periodontal. As células que derivam dele, conhecidas como DFSCs são

células capazes de regenerar tecidos periodontais (MORSCZECK et al., 2005; YAO et al., 2008; EGUSA et al., 2012).

2.2.1.2.4 Células-tronco da papila apical (SCAP)

Células-tronco derivadas da papila apical foram encontradas no ápice das raízes em desenvolvimentos (raízes incompletas). As SCAPs são responsáveis pela formação primária de odontoblastos, os quais são responsáveis por sintetizarem a polpa radicular (ABE; YAMAGUCHI; AMAGASA, 2007; SONOYOMA et al., 2008; HUANG et al., 2008).

Comparando SCAPs com DPSCs, as SCAPs demonstram uma melhor proliferação *in vitro* e melhor regeneração de matriz dentinária quando transplantadas em modelos murinos imunocomprometidos. Através desses dados, é evidente a diferença de tipo de células-tronco que os tecidos em desenvolvimento possuem comparando com os tecidos adultos (já desenvolvidos). Os tecidos em desenvolvimento apresentam células-tronco mais imaturas, sendo uma fonte melhor para a Engenharia Tecidual (EGUSA et al., 2012).

2.2.2 Matriz extracelular (*scaffold*)

Todos os seres celulares possuem uma espécie de arcabouço natural que circunda as células, conhecidos como *scaffold*, cuja função principal é o suporte estrutural para a formação e a manutenção de órgãos e de tecidos. O *scaffold* é composto, principalmente, por matrizes proteicas extracelulares ou por ECMs, no qual o colágeno, vitronectina, fibronectina e laminina são base para a ancoragem celular e para a fixação de fatores de crescimento. Ainda contribuem para que as células sinalizadas migrem, diferenciem-se e proliferem-se mediadas pela sinalização celular. As ECMs possuem um papel importante na regeneração de tecidos dentários (KUMAR et al., 2010; MURRAY, 2012).

Em um estudo realizado por Howard, Murray e Namerow (2010), foi demonstrado que a laminina é um fator importante na migração de células-tronco na polpa dentária, promovendo a diferenciação de odontoblastos. Outra ECM de grande importância é a fibronectina que tem se mostrado capaz de promover o aumento do crescimento e da diferenciação de ameloblastos, enquanto a vitronectina fornece um

quadro estrutural estável para tecidos e órgãos. O colágeno é o componente estrutural predominante de todos os órgãos e tecidos, e sua função de manter os fatores de crescimento fixados para a regulação da proliferação e diferenciação celular tem sido fundamental para a regeneração de tecidos perdidos.

Os *scaffolds* precisam suportar vários processos celulares vitais para que haja regeneração de tecidos e funções que incluem: a colonização e a adesão celular, a migração, o crescimento e a diferenciação. Propriedades físico-químicas, morfológicas e de degradação cinética do *scaffold* também são características importantes para a engenharia tecidual (CHANDKI et al., 2012; HAN et al., 2014).

Scaffolds de ECMs naturais têm diferentes características químicas e físicas que contribuem para as funções específicas dos tecidos em que residem. Já os *scaffolds* sintéticos, criados para a engenharia de tecidos, foram elaborados com uma gama de propriedades físicas, que incluem porosidade, tamanho dos poros, peso e a capacidade de hidratação, como ilustrado na Tabela 1 (MURRAY, 2012).

Tabela 1 – Propriedades físicas dos *scaffolds* sintéticos

Tipo de Scaffold	Dimensão média	Capacidade de hidratação	Porosidade (poro per inch linear)	Tamanho médio dos poros	Peso
Polímero	5x4mm 0.039cm ³	30 mL	120-/+20	100-200 mm	5.2mg/32mg
Colágeno	4.5x4.2mm 0.039cm ³	25 mL	120-/+20	100-200 mm	3.5mg/45mg
Fosfato de Cálcio	5x3mm 0.058cm ³	30 mL	60-/+10	200-400 mm	45mg/99mg

Fonte: Murray (2012).

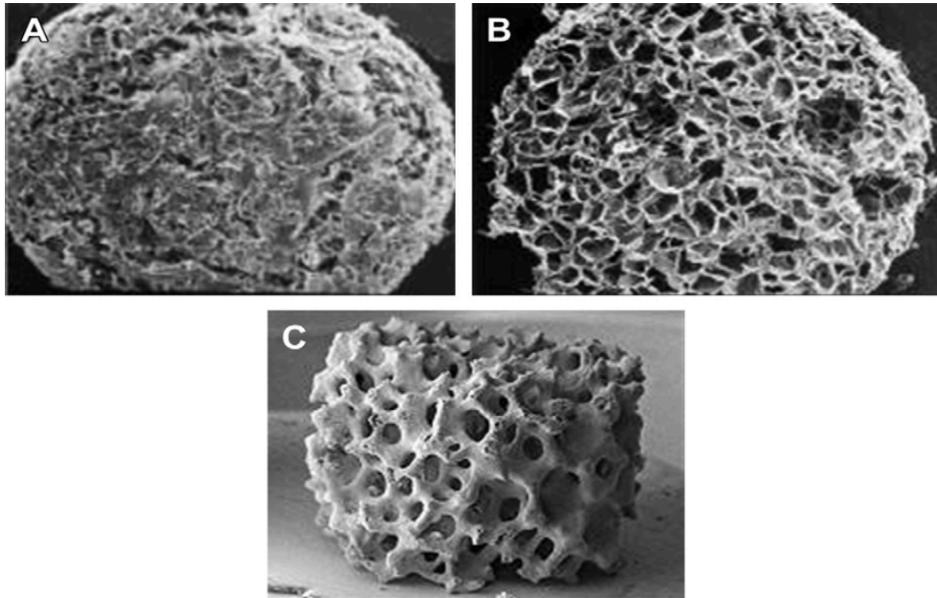
Alta porosidade e tamanho de poro suficientes são necessários para facilitar a difusão de células e nutrientes pela estrutura do *scaffolds*, além de permitir a revascularização arterial. Outras propriedades importantes são a biocompatibilidade e a biodegradabilidade com uma taxa controlável para complementar o crescimento e a maturação de células e tecidos. Alguns *scaffolds* são permanentes, enquanto que para outros há necessidade de reabsorção pelos tecidos circundantes, para evitar danos e/ou interferências com o tecido regenerado. A taxa de degradação

deve coincidir com a taxa de neoformação do tecido (HUTMACHER; COOL, 2007; MURRAY, 2012).

Para a neoformação bem sucedida de tecidos, a remodelação e maturação no local do defeito são essenciais para compreender e controlar o processo de degradação do *scaffold*. Nos primeiros estudos sobre engenharia de tecidos, acreditava-se que *scaffolds* deveriam degradar-se rapidamente e desaparecer à medida que a neoformação de tecidos ocorria. É importante reconhecer que a taxa de crescimento, maturação e remodelação diferem temporalmente entre os diferentes tecidos, portanto, tem sido proposto que o início da degradação do *scaffold* deve ocorrer apenas depois do tecido recém formado ser incluído, pelo menos uma vez, no ciclo de remodelação natural do organismo (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010; HAN et al., 2014).

As últimas gerações de *scaffolds* foram projetados para terem propriedades ideais e customizadas para cada tipo de tecido, são elas: serem injetáveis, de fabricação sintética, biocompatíveis, não imunogênicos, transparentes, possuir fibras em nanoescala, ter baixa concentração e altas taxas de reabsorção. Os *scaffolds* para engenharia de tecidos podem ser criados a partir de materiais sintéticos, tais como polímeros semelhantes às suturas cirúrgicas absorvíveis, ou por colágeno e fosfato de cálcio. Na figura 3 a estrutura dos *scaffolds* mais utilizados atualmente é evidenciada através da fotomicrografia (MURRAY, 2012).

Figura 3 - Fotomicrografia da estruturas de *scaffolds*.



(A) Fotomicrografia de *scaffold* de colágeno. O *scaffold* composto de colágeno tipo III são fabricados a partir de uma mistura de colágenos que são derivados a partir de pele bovina. Em geral, este material apresenta uma arquitetura de colágeno fibrilar, o que é representativo da estrutura de colágeno no interior da matriz intersticial. (B) Fotomicrografia de *scaffold* polimérico. O OPLA 3D (Open-Cell ácido polilático) *scaffold* é um polímero sintético, esse material tem uma arquitetura facetada, que é eficaz para a cultura de suspensões de células de alta densidade. (C) Fotomicrografia da estrutura de *scaffold* de fosfato de cálcio. O *scaffold* com fosfato de cálcio tridimensional ideal para a análise *in vitro* do metabolismo ósseo da regeneração da cartilagem.
 Fonte: Murray (2012).

Os *scaffolds* para a regeneração de tecidos dentários são compostos de um grupo diversificado de tecidos naturais, tais como a pele e osso provenientes de doadores humanos. Também podem ter estruturas a partir de materiais sintéticos concebidos para serem utilizados como *scaffolds* de pele e dos ossos. *Scaffolds* injetáveis são de fácil utilização, no entanto, os *scaffolds* de hidrogel e nanofibras, muitas vezes, não são capazes de manter uma boa taxa de sobrevivência celular. *Scaffolds* esponjosos incluem colágeno e polímeros absorvíveis, que podem manter boa sobrevivência de células-tronco, mas que não têm força estrutural necessária para suporte de carga e movimento muscular. As vantagens e limitações dos tipos mais comuns de *scaffolds* para a regeneração dental estão resumidos na Tabela 2 (MURRAY, 2012).

Tabela 2 – Tipos mais comuns de *scaffolds* para a regeneração de tecidos dentários

Tipo de <i>scaffold</i>	Propriedades	Vantagens	Limitações
Hidrogel Nanofibras	Colóide gelatinoso Peptídeos de automontagem, muitas vezes com adição de hidrogel	Injetáveis, biocompatíveis e absorvidos pelo corpo	Baixa taxa de sobrevivência de células-tronco, falta de força estrutural
Colágeno Polímeros Fosfato de Cálcio	Esponjoso Quebradiço	Fácil utilização, clinicamente efetivo e absorvido pelo corpo Fácil obtenção do <i>scaffold</i> através do sangue do receptor	Falta de força estrutural necessária para suporte de tecidos ou movimento muscular
Fibrina	Centrifugado através do sangue periférico		
Osso	Fonte pode ser de doador e ou pó de osso liofilizado	Enxertos ósseos são clinicamente muito efetivos	Alto custo, requer um doador no qual o risco de contaminação pode ser grande
Osso Sintético	Material de preenchimento de defeitos ósseos	Clinicamente eficiente e seguro	Não é tão efetivo quanto osso de fonte natural
Pele	Fonte de doador cadavérico	Clinicamente eficiente	Necessita de doação de cadáveres ou doação de pele. Risco de contaminação
Pele Sintética	Material de preenchimento de defeitos na pele	Clinicamente eficiente e seguro	Recurso temporário, o paciente ainda terá que fazer um transplante de pele.

Fonte: Murray (2012).

Para que haja maior sucesso na engenharia de tecidos, os *scaffolds* devem ser combinados com células-tronco vivas e/ou moléculas biologicamente ativas (fatores de crescimento), assim será arquitetado um arcabouço que irá promover a regeneração de tecidos perdidos (SLAVKIN; BARTOLD, 2006; BARTOLD et al., 2006).

2.2.3 Sinalização celular

A sinalização celular faz parte de um complexo sistema de comunicação que governa as atividades celulares e organiza suas interações. A habilidade que as células possuem em perceber algum sinal e responder corretamente aos estímulos forma a base do desenvolvimento, da reparação de tecidos, da imunidade e de outras funções de homeostasia (COOPER; HAUSMAN, 2007).

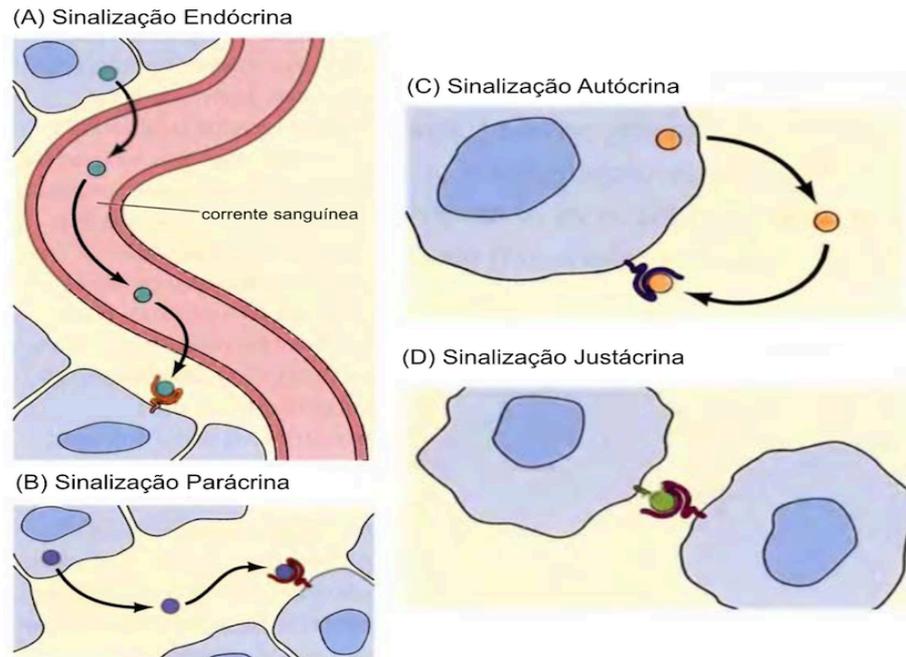
As células comunicam-se através de diferentes tipos de moléculas de sinalização, tais como proteínas, aminoácidos, nucleotídeos, esteróides, pequenos peptídeos, derivados de ácidos graxos ou gases como óxido nítrico e monóxido de carbono (COOPER; HAUSMAN, 2007).

A sinalização celular pode ocorrer diretamente de célula-para-célula (justácrina) ou através de moléculas secretadas, dividindo-se em três categorias baseadas na distância na qual a molécula secretada é transmitida. Os sinais dependentes da secreção de moléculas são os sinais endócrinos, parácrinos e autócrinos (COOPER; HAUSMAN, 2007).

Os sinais endócrinos deslocam-se através do sistema circulatório até chegarem a todas as partes do corpo. Um exemplo desses sinais são os hormônios secretados que viajam na corrente sanguínea até chegar no local desejado. Os sinais parácrinos são enviados apenas às células na vizinhança da célula sinalizante, são eles os neurotransmissores. Os sinais autócrinos, afetam apenas as células que são do mesmo tipo celular que a célula sinalizante. Um exemplo de sinal autócrino são os Linfócitos T, quando respondem aos antígenos elaborando um fator de crescimento que impulsiona a sua própria proliferação, amplificando assim a resposta imune. Tumores repetidamente produzem excessivos fatores de crescimento e receptores, estimulando assim sua própria proliferação através de um “ciclo autócrino” (COOPER; HAUSMAN, 2007; KUMAR et al., 2010).

Além desses três tipos de sinalização celular existe a sinalização conhecida como sinalização justácrina (célula-para-célula), que é transmitida através das membranas celulares, via componentes proteicos ou lipídicos (integrados à membrana plasmática), e que é capaz de afetar tanto a célula emissora quando a célula imediatamente adjacente. A figura 4 esquematiza os diferentes tipos de sinalização celular (COOPER; HAUSMAN, 2007).

Figura 4 - Tipos de sinalização celular



A, B, C – Sinalização celular através de moléculas secretadas. D – Sinalização do tipo célula-para-célula.

Fonte: Cooper, Hausman (2007).

Erros relacionados ao processamento de informação celular são responsáveis por doenças como o câncer, a autoimunidade e a diabetes. Ao se entender melhor os processos de sinalização celular, muitas doenças poderão ser tratadas de maneira mais eficiente e a engenharia tecidual poderá ser amplamente utilizada (COOPER; HAUSMAN, 2007; KUMAR et al., 2010).

2.2.3.1 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são um grupo de polipeptídios biologicamente ativos, que regulam as atividades celulares base durante o reparo e a regeneração de tecidos, incluindo a proliferação celular, a quimiotaxia, a diferenciação e a síntese de matriz. Fatores de crescimento, juntamente com o suporte de *scaffolds*, fornecem funções biológicas essenciais para a terapêutica a base de células-tronco (CHEN; ZHANG; WU, 2010; KUMAR et al., 2010; SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014; PILIPCHUCK, 2015).

Entre as exigências primárias da engenharia de tecidos, a seleção ideal dos tipos de células-tronco e propriedades adequadas de *scaffolds* para reconstituir um tecido específico na sua configuração e função própria, são determinantes para o

sucesso da regeneração. O sucesso da engenharia de tecidos é influenciado, também, por fatores e interações que necessitam de controle para que ocorra uma regeneração tecidual segura e eficaz de tecidos funcionais (CHEN; JIN, 2010; PILIPCHUCK, 2015).

Interações coordenadas com fatores de crescimento solúveis, células-tronco e matrizes proteicas extracelulares (ECM) definem um microambiente celular no qual as células podem executar a regulação complexa e dinâmica de seus processos. A base para a regeneração dos tecidos, por conseguinte, é a utilização de técnicas de engenharia que imitam os aspectos críticos de processos naturais de cura da "cascata de cicatrização", através do fornecimento apropriado de fatores bioquímicos e físico-químicos para a neoformação tecidual (CHEN; JIN, 2010; PILIPCHUCK, 2015).

Através da descoberta e de entendimento da "cascata de cicatrização", foi constatado que a capacidade de autocura dos pacientes pode ser aumentada artificialmente, acelerando a proliferação e a diferenciação das células-tronco recrutadas ou implantadas através da integração de fatores de crescimento e citosinas, por exemplo. Os fatores de crescimento desempenham um papel fundamental na transferência de informação entre as células-tronco e a suas ECM, além de estimular os mecanismos de reparação endógena, fornecendo os sinais corretos para as células levando a uma recuperação funcional acelerada de tecidos danificados ou defeituosos (CHEN; ZHANG; WU, 2010).

Assim, pode-se presumir que a capacidade do tecido danificado regenerar-se e a possível extensão da regeneração determinam a necessidade de uma tecnologia de engenharia de tecidos, e, conseqüentemente, a necessidade da integração dos fatores de crescimento e moléculas de ECM em biomateriais cuidadosamente concebidos por uma questão de regulação celular proliferação, migração, diferenciação, adesão e expressão gênica (CHEN; ZHANG; WU, 2010).

Exemplos de fatores de crescimento para efeitos regenerativos de interesse odontológico incluem principalmente: fator de crescimento de fibroblastos (FGF), proteínas óssea morfogenética (BMPs), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), plasma rico em plaquetas (PRP) e os fatores de crescimento beta (TGF- β) (MAEDA et al., 2013; SHRIVATS; MCDERMOTT; HOLLINGER, 2014).

2.3 Engenharia tecidual

Os progressos nos estudos da Biologia Molecular vêm contribuindo para novos horizontes e perspectivas na área da saúde. Com o desenvolvimento de novas técnicas de reparo e regeneração de tecidos danificados, a Engenharia Tecidual aplica os princípios básicos da engenharia mecânica, biologia e ciências clínicas, visando um futuro no qual seja possível usar substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de órgãos e tecidos (CASAGRANDE; NOR, 2013).

A Engenharia tecidual é um campo multidisciplinar emergente, sendo um dos objetivos principais investigar como será possível a utilização clínica, através das vias de sinalização e componentes biológicos. Essa possibilidade depende do uso correto de células progenitoras e biomateriais, favorecendo a remodelação tecidual no processo de reparo e/ou melhora dos órgãos e funções teciduais (BIANCO; ROBEY, 2001).

2.3.1 Aplicações de células-tronco na área da saúde

Através de pesquisas realizadas sobre células-tronco, as do tipo mesenquimal (*Mesenquimal stem cells* - MSC) vêm sendo consideradas como as mais seguras, tendo um futuro promissor para o uso nas terapias regenerativas. As MSC possuem uma ampla plasticidade, podendo reprogramar e gerar células dos mais variados tecidos, além de possuírem um índice alto de proliferação e autorrenovação (CASAGRANDE; NOR, 2013).

Na engenharia tecidual, as MSC ganham foco por poderem ser extraídas de diversos tecidos do corpo humano. A sua utilização na regeneração de tecidos e órgãos e nas terapias de doenças com relação à imunidade, como rejeição de transplantes e doenças autoimunes, estão sendo testadas clinicamente e poderão ser difundidas em um futuro próximo (WADA et al., 2013).

É de suma importância que o uso de células-tronco em terapias regenerativas seja realizado com cautela, devendo ser considerado em primeiro lugar o risco/benefício para o paciente. Em casos como o transplante de células-tronco em pacientes com câncer hematológico, o seu benefício no tratamento já está comprovado, superando qualquer risco de procedimento (CASAGRANDE; NOR, 2013).

Para o tratamento de diversas doenças e condições sistêmicas, as células-tronco vêm oferecendo uma fonte renovável para a substituição de células e tecidos lesados. São exemplos de doenças tratadas pela tecnologia de células-tronco: Parkinson (quando as células cerebrais que secretam dopamina foram destruídas), Diabetes mellitus tipo 1 (quando há destruição de células β do pâncreas), Mal de Alzheimer (quando ocorre a degeneração dos neurônios pelo acúmulo de precipitados proteicos no cérebro), Infarto (quando o coágulo sanguíneo causa perda da oxigenação do tecido nervoso) e danos à medula espinal (quando esta condição pode levar à paralisia da musculatura esquelética). Além dessas doenças, ainda há aplicabilidade em situações como queimaduras, doenças cardíacas, osteoartrite e artrite reumatoide, nas quais as células perdidas podem ser substituídas por células-tronco (CHANDAR; VISELLI, 2011).

A descoberta de que a polpa madura de dentes permanentes contém uma população de células-tronco mesenquimais multipotentes, com alto potencial de proliferação e capacidade de autorrenovação, revolucionou a pesquisa na área odontológica e abriu novos horizontes para a Engenharia Tecidual, em particular para Odontologia regenerativa (SUJESH et al., 2011).

2.3.2 Aplicações de células-tronco na odontologia

Enquanto existem evidências de que as MSC podem ser usadas na Odontologia regenerativa, diversos fatores devem ser considerados, tais como: um melhor e amplo entendimento sobre o mecanismo de autorrenovação celular (para regular a proliferação celular *in vitro* gerando um número suficiente de células para a terapia), a possibilidade de modelar a diferenciação celular em tecidos e células específicos, e a interação entre células-tronco e o sistema imunológico (HAN et al., 2014).

Avanços na Engenharia Tecidual sugerem mudanças significantes na clínica odontológica tradicional. Tem-se como exemplo a Engenharia Tecidual dos tecidos periodontais, que está estabelecendo novos paradigmas no controle de doenças relacionadas ao periodonto, mudando o que antes estava concentrado somente no controle da infecção. A terapia celular para a doença periodontal visa controlar a inflamação e infecção com células-tronco especializadas, capazes de regenerar novos tecidos periodontais (CHEN et al., 2012; ROSA et al., 2012).

Conforme um estudo realizado por Liu et al. (2008) o potencial das células-tronco para tratar as sequelas da periodontite foi demonstrado pela implantação autóloga de PDLSCs com *scaffolds* de HA/TCP (fosfato de cálcio) em defeitos ósseos periodontais. As PDLSCs foram obtidas a partir de dentes extraídos de modelo porcino e, em seguida, expandidas *ex vivo* para aumentar em número. Os defeitos foram gerados na área de primeiros molares dos modelos porcino por remoção cirúrgica do osso, e subsequente sutura de seda em torno da porção de ligamento cervical do dente, por 12 semanas. Quando transplantadas para as áreas de defeitos ósseos periodontais criados cirurgicamente, as PDLSCs foram capazes de regenerar tecidos periodontais, sendo esse um grande avanço no tratamento da periodontite. Além disso, foi possível observar uma regeneração óssea de aproximadamente 50% da altura total inicial de 7 mm. Esse estudo demonstrou a viabilidade da utilização de engenharia de tecidos mediada por células-tronco para tratar sequelas geradas por doenças periodontais.

Em cenários clínicos têm-se a possibilidade de reconstruir grandes perdas ósseas devido à trauma, ao câncer ou até mesmo para ajudar na osseointegração de implantes dentários (MOY et al., 2005; ROSA et al., 2012). Os benefícios da abordagem com terapias celulares respalda na expectativa de introduzir células-tronco e biomateriais que, possivelmente, possam diferenciar-se em osteoblastos, em proteínas e em matriz óssea. A vantagem dessa terapia visa, principalmente, pacientes imunocomprometidos ou idosos que já não possuem um amplo reservatório de células osteoprogenitoras (HOLLINGER; WINN; BONADIO, 2000).

Em pacientes saudáveis, nos quais é encontrado osso normal, a taxa de sucesso dos implantes está acima de 90%, no entanto, em pacientes com condições especiais como diabetes, fumantes e pacientes que fazem uso da radioterapia, essa taxa de sucesso diminui consideravelmente. A quantidade e qualidade óssea influenciam muito nos implantes dentários e, nesses casos, podem tornar desafiadora a cicatrização óssea (MOY et al., 2005; ROSA et al., 2012). Através do desenvolvimento das terapias baseadas em células-tronco e biomateriais, a adesão óssea poderá ser aumentada, o que irá resultar em osseointegração de implantes dentários até mesmo em locais biologicamente e anatomicamente desfavoráveis para implantes (JOOS, 2009; ROSA et al., 2012).

A proteína morfogenética óssea (BMP) já é amplamente estudada e possui muitos pontos positivos, sendo o seu uso clínico liberado pela *Food and Drug*

Administration (FDA). Esse fato faz com que aumente o interesse em estudos para outros procedimentos além da área de implantes, como na cirurgia maxilofacial, para grandes reconstruções ósseas e em defeitos após ressecções mandibulares (DAVIES; OCHS, 2010). Os principais estudos na área odontológica sobre a BMP estão relacionados à implantes dentários. Uma estratégia interessante para a implantologia é impregnar os implantes de titânio com componentes como a BMP, o colágeno e TGF- β visando ampliar a osseointegração (STADLINGER et al., 2008; ROSA et al., 2012).

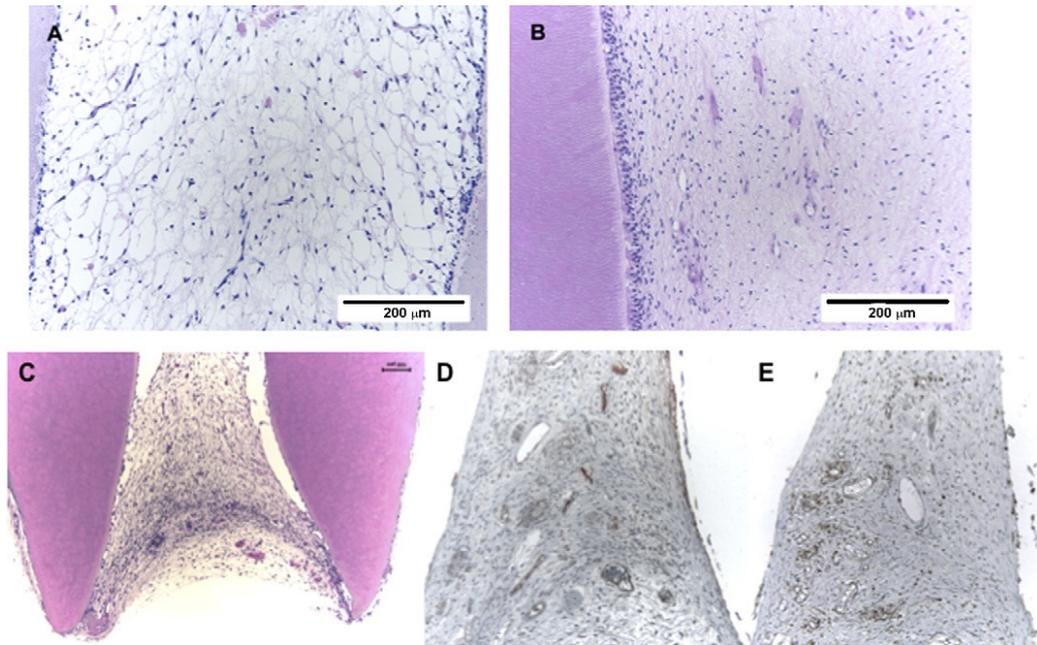
Um estudo realizado por Yoo et al. (2014), que visou expor as características clínicas que a proteína óssea morfogenética recombinante humana 2 (rhBMP-2) poderia fornecer na melhoria da adesão de implantes dentários, avaliou 4 grupos diferentes de tratamento de superfície de implantes: implante de titânio puro convencional (Ti), implante de titânio puro impregnado com rhBMP-2 (Ti-BMP), implante de titânio revestido por PSCaP (*plasma sprayed calcium-phosphate* – plasma pulverizado de fosfato de cálcio) e impregnado por rhBMP-2 (PSCaP-BMP) e implante de titânio revestido por PSCaP sem rhBMP-2 (PSCaP). Esses implantes foram colocados cirurgicamente na crista ilíaca de ovelhas, em dois grupos, o primeiro sacrificado em 3 semanas e o outro grupo sacrificado 6 semanas após a cirurgia. A presença de rhBMP-2 pareceu induzir a maior formação de osso novo para ambos os implantes PSCaP e Ti. No entanto, também foi qualitativamente evidente que a combinação de PSCaP e rhBMP-2 atraiu mais osseointegração que os implantes de titânio puro. A maior rapidez na osseointegração de implantes dentários pode contribuir, significativamente, na diminuição de seu extensivo tempo de tratamento. Em conclusão, a incorporação de rhBMP-2 e PSCaP nas superfícies de implantes de titânio reforçou a aposição óssea e aumentou a formação óssea próximo a superfície do implante favorecendo sua estabilidade. Além disso, grande atividade de osteoblastos estava presentes em todos os grupos em 3 semanas, indicando mineralização e progressivo crescimento em regiões disponíveis, sendo que os implantes revestidos com PSCaP-BMP exibiram maior atividade dessas células formadoras de osso ao longo dos implantes. Porém, novos estudos considerando dosagens e métodos alternativos de disponibilização da BMP são necessários para confirmar sua eficácia em implantes dentários.

Na Odontologia Restauradora, os estudos têm buscado técnicas e materiais para regenerar o complexo dentinopulpar de maneira biológica, e a Engenharia

Tecidual dos tecidos da polpa dental está alcançando resultados significantes. As células-tronco da polpa de dentes decíduos exfoliados (SHED) e da polpa de dentes permanentes são capazes de se diferenciar em odontoblastos (células que secretam matriz dentinária). Estudos realizados em modelo murino mostraram que as SHED foram capazes de produzir tecidos pulpare. Outros estudos também relatam quem as DPSCs estão aptas a produzir tecidos pulpare em canais radiculares vazios, com o depósito de camadas teciduais mineralizadas nas paredes das raízes (HUANG et al., 2009; SAKAI et al., 2010; ROSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

Um avanço promissor para as técnicas endodônticas regenerativas foi alcançado quando as SHED foram associadas à *scaffolds* de nanofibras peptídicas e, injetados em canais radiculares sendo capazes de gerar tecido pulpar. A figura 5 é mostra a presença de tecido pulpar preenchendo os canais radiculares, apresentando alta taxa de proliferação celular e uma rede sanguínea compatível à de um pré-molar sadio. O tecido obtido através da engenharia do complexo dentinopulpar foi capaz de depositar dentina de forma organizada ao longo das paredes dos canais radiculares, conforme ilustra a figura número 5 (ROSA et al., 2012).

Figura 5 - Técnicas endodônticas regenerativas apresentando avanço à nível celular



A - Engenharia do complexo dentinopulpar usando SHED e *scaffolds* de nanofibras peptídicas em 35 dias. B – dente pré-molar natural para comparação. C – tecido gerado através da Engenharia tecidual ocupando toda porção apical do dente, pode-se notar a ausência de sinais de inflamação. D e E – imunohistoquímica com marcadores PCNA (proliferating cell nuclear activity) e Fator VIII mostram um tecido proliferativo bem estabelecido e a presença de um sistema sanguíneo maduro.

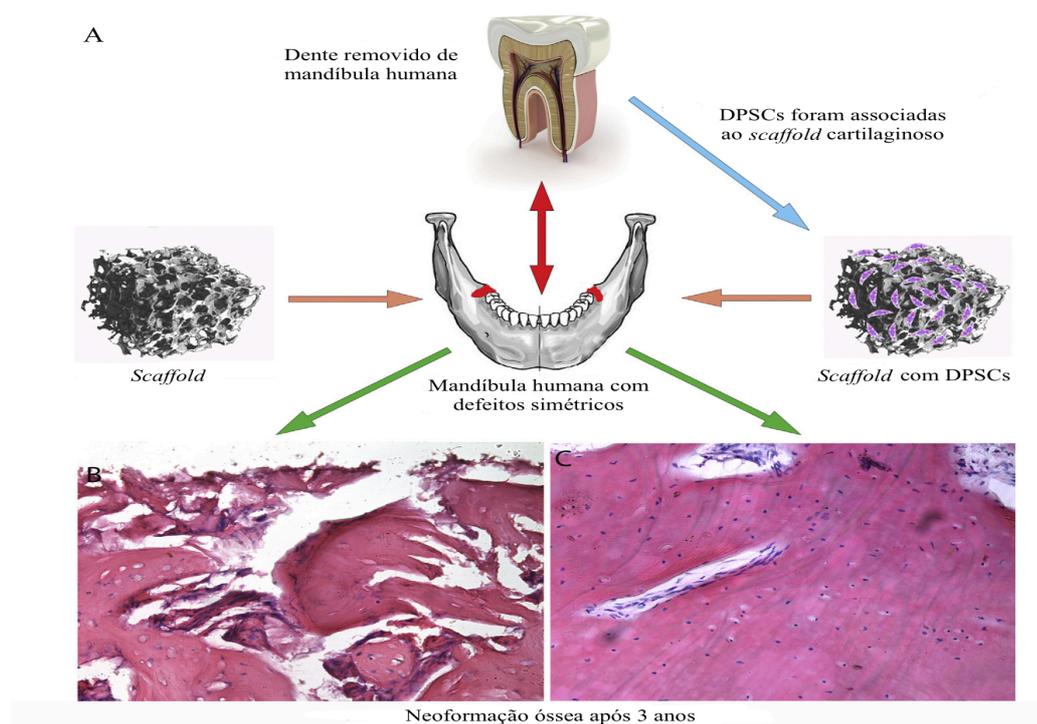
Fonte: Rosa et al. (2012).

Esses relatos suportam a ideia de que a regeneração do complexo dentinopulpar possa ser clinicamente possível, uma vez que as SHED podem ser obtidas através de dentes decíduos exfoliados. A associação com *scaffolds* injetáveis permite a fácil introdução das células-tronco dentro dos canais radiculares, desconsiderando o difícil acesso que sua anatomia interna possa proporcionar (HUANG et al., 2009; ROSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

A maioria dos estudos que possuem aplicações *in vivo* de DPSCs são realizados em modelos animais. Existem poucos ensaios clínicos, porém em um estudo clínico realizado por D'Aquino et al. (2009), a formação de osso subsequente ao transplante DPSCs foi evidenciada radiograficamente. Os pesquisadores extraíram células da polpa dentária dos terceiros molares do próprio indivíduo e implantaram em *scaffolds* de colágeno. Os dois terceiros molares inferiores de cada paciente foram extraídos, um lado recebeu DPSCs associada ao *scaffold* colagenoso, e o outro lado foi utilizado como controle negativo, sendo preenchido com o *scaffold* sem as DPSCs. Três meses após a lesão, a análise radiográfica e histológica mostrou uma diferença notável na regeneração óssea entre os dois

locais: o lado controle tinha uma quantidade significativamente menor de osso formado, dando evidência clara da possibilidade de empregar DPSCs para reparar defeitos ósseos em humanos. O acompanhamento realizado por Giuliani et al. (2013) após três anos da cirurgia, comprovou que o osso regenerado foi uniformemente e qualitativamente compactado e vascularizado. Esse resultado demonstrou que as DPSCs podem ter sucesso no reparo e na regeneração óssea, por exemplo, o osso regenerado após o enxerto em defeitos de mandíbula poderia ser considerado de importância crítica para limitar a fratura patológica e garantir uma melhor qualidade de vida em pacientes com câncer bucal. Ainda existe a necessidade de serem realizados mais ensaios clínicos para confirmar o potencial das DPSCs na regeneração óssea para uma abordagem terapêutica. O estudo está ilustrado na figura 6 (LA NOCE et al., 2014).

Figura 6 - Esquemática do estudo realizado



A - Representação de reparo de defeito mandibular usando DPSCs. B- A avaliação histológica (3 anos após cirurgia) que mostra um osso esponjoso reabsorvido no local de controle (200T ampliação original). C- Avaliação histológica (3 anos após cirurgia) ao local de teste, que mostra um osso mais compacto (200T ampliação original).

Fonte: adaptado de La Noce et al. (2014).

Um dos desafios da Engenharia Tecidual do complexo dentinopulpar é que ela não poderá ser aplicada em todos os casos. Dentes de pacientes idosos, que

apresentam condições como uma câmara pulpar menor, condutos radiculares parcialmente obliterados e ápice fechado, podem ser um grande problema para a terapia celular regenerativa, por não possuírem a mesma resposta celular que dentes de pacientes mais jovens (ROSA et al., 2012).

2.4 Futuro das células-tronco na odontologia

O futuro da Engenharia Tecidual na Odontologia é considerado promissor. É possível que quando os pesquisadores, unirem as recentes descobertas em biomateriais, genética, biologia molecular e celular e as combinarem para novas alternativas de tratamento regenerativo (tecidos moles, osso, controle de doenças periodontais e procedimentos que regenerem esmalte, dentina e polpa) esses estejam disponíveis para aplicações clínicas (CHEN et al., 2012; ROSA et al., 2012).

Contudo, um dos fatores importantes é o custo que esses procedimentos poderão apresentar, não considerando somente o tratamento, mas agregando os custos requeridos para introduzir tecnologias de última geração para o alcance de cientistas e pesquisadores da área, além do custo para construir instalações para obtenção e armazenamento de células-tronco, e para a produção de matrizes biocompatíveis a preços acessíveis (ROSA et al., 2012).

A regeneração de tecidos dentais baseado nas células-tronco e Engenharia Tecidual é um campo relativamente novo, com um alto potencial para introduzir novos paradigmas na prática odontológica. O futuro dependerá de um profundo entendimento da biologia molecular das células que serão utilizadas nos procedimentos regenerativos, e os limites serão demarcados pelos riscos potenciais como a transformação das células em tumores, e a contaminação indesejada, sendo os meios para impedir ou superar esses riscos o sucesso da Engenharia Tecidual na Odontologia (CASAGRANDE; NOR, 2013).

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento do estudo

O presente estudo caracteriza-se por uma revisão de literatura, a qual consiste em um levantamento das evidências científicas a respeito do tema da pesquisa. Essa categoria de pesquisa possui um papel fundamental para a educação continuada, permitindo ao pesquisador e ao leitor adquirir e, também, atualizar o conhecimento sobre determinado assunto.

3.2 Seleção do material bibliográfico

Os livros utilizados fazem parte do acervo da Biblioteca Central da Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Os artigos científicos foram coletados nas bases de dados Scielo, Portal de Periódicos da CAPES, PubMed e também pelo sistema EBSCO - *Discovery Service* de acesso universal à artigos científicos da *New York University*. A pesquisa abrange publicações desde o ano 2000 até outubro de 2015, nos idiomas português e inglês.

As palavras chaves pesquisadas foram: Células-tronco, Odontologia Regenerativa, Engenharia de Tecidos.

4 DISCUSSÃO

Pesquisas relacionadas às células-tronco têm recebido atenção considerável desde a constatação de que as células-tronco adultas possuem capacidade de originar diferentes tipos de tecidos. Avanços contínuos no isolamento, caracterização e modulação do comportamento de células-tronco de origem dental, associadas ao aperfeiçoamento da ciência de biomateriais, suportam a viabilidade da aplicação da engenharia de tecidos craniofaciais (MACHADO; FERNANDES; GOMES 2012; MATHUR et al., 2014).

Atualmente, seis populações de células-tronco de origem dentária foram isoladas e caracterizadas: DPSCs, SHED, SCAPs, PDLSCs, TGPCs e DFPCs. Estas populações pós-natais têm características mesenquimais, incluindo a capacidade de autorrenovação e potencial de diferenciação em múltiplas linhagens. Além disso, as células-tronco derivadas do tecido dental possuem capacidades notáveis na diferenciação odontogênica e osteogênica, com sucesso comprovado em ensaios pré-clínicos (SUJESH et al., 2011; MACHADO; FERNANDES; GOMES, 2012; SEDGLEY; BOTERO; EGUSA et al., 2012; CASAGRANDE; NOR, 2013).

Dentre os desafios relacionados à engenharia tecidual vêm sendo particularmente difícil para os cientistas assegurar a alta capacidade proliferativa e pluripotência das célula-tronco à longo prazo. A cultura de células-tronco *in vitro*, também é um desafio presente, sendo necessário certificar que o crescimento dessas células seja suficiente para o tratamento de doenças específicas ou para regenerações de tecidos. Além disso, a formação de teratoma é um obstáculo que precisa ser superado, pois a formação dessas massas de células tumorais no sítio implantado limita, significativamente, as aplicações terapêuticas potenciais das células-tronco (MATHUR et al., 2014).

Desafios imunológicos também são uma barreira significativa para a aplicação de terapias com células-tronco. Se as novas células-tronco implantadas forem reconhecidas como corpo estranho, elas serão rejeitadas e destruídas. Foram propostas duas soluções possíveis para esse problema, uma delas é a criação de células-tronco sintéticas através de técnicas de engenharia genética (utilização de iPS). A outra opção para a rejeição imunitária seria manipular e cultivar células-tronco do próprio paciente (MATHUR et al., 2014).

Os avanços no conhecimento a respeito de células-tronco adultas têm proporcionado um grande impulso para os pesquisadores transformarem esses achados em aplicações clínicas. O fato dos pesquisadores possuírem acesso à populações de células-tronco que podem gerar osso e medula, cemento, dentina e ligamento periodontal, faz com que seja possível prever a restauração completa dos tecidos da cavidade oral, utilizando as células do próprio paciente, evitando assim problemas de histocompatibilidade. Ademais, os avanços nas técnicas para modificar a atividade do gene de células-tronco durante o seu cultivo *ex vivo* oferece possibilidade única para melhorar as células-tronco do próprio paciente. No entanto, a substituição de tecidos dentais baseada na terapia gênica pode ser complicada em áreas de inflamação crônicas ou agudas não resolvidas, destacando assim, a necessidade de mais pesquisas para entender potenciais fatores complicadores sobre a terapia à base de células. Enquanto as barreiras técnicas para alcançar um resultado ideal na regeneração de tecidos não devem ser subestimadas, o recente reconhecimento de células-tronco e seu papel na regeneração de tecidos fornecem uma base sólida sobre a qual os pesquisadores podem construir o manejo clínico de defeitos craniofaciais e a regeneração de tecidos dentários (MATHUR et al., 2014).

A implementação da engenharia tecidual de tecidos dentários está avançando para cenários clínicos, e os resultados obtidos até o momento sugerem que o conhecimento completo das células-tronco será a base substancial para o entendimento dos seus mecanismos de ação regenerativa. Existe ainda uma distância considerável entre o que já se sabe e o que ainda precisa ser entendido para compreender plenamente o potencial e comportamento de células progenitoras derivadas de elementos dentários, e as modalidades de tratamento clínicos subsequentes. Não obstante, as oportunidades para a sua exploração na Odontologia regenerativa estão ficando mais claras e os benefícios são significativos no reparo de defeitos ou perda de tecido. Embora ainda haja muitos obstáculos técnicos voltados para soluções mais biológica de reparos relacionados ao tecido dentário, a tentativa de regeneração por células-tronco é um campo promissor que abrirá oportunidades terapêuticas ainda não exploradas (CHEN; JIN, 2010).

O transplante de DPSCs em modelo murino imunocomprometido proporcionou um novo modelo de caracterização e entendimento desta população de células-tronco. Além disso, é importante salientar que a quantidade de tecido relacionado à dentina e a polpa formado nesses transplantes excede em muito o valor que seria

gerado *in situ* durante a vida de um organismo. Consequentemente, existe um grande potencial para o isolamento de um grande número de DPSCs a partir de um único dente, e que poderia ser usado após para a reparação da dentina de um número maior de dentes. O contínuo desenvolvimento de *scaffolds* e fatores de crescimento com forma e composição apropriada para serem usados em conjunto com o cultivo *ex vivo* de DPSCs torna a regeneração dentária uma possibilidade real (GRONTHOS et al., 2000).

Da mesma forma, os fatores de crescimento são componentes essenciais de qualquer estratégia regenerativa para a reparação ou substituição de tecidos, sendo sua terapêutica e estudos relacionados com a liberação dos fatores de crescimento no local do defeito têm crescido exponencialmente ao longo da última década. O potencial de diferentes fatores de crescimento como agentes terapêuticos para uma variedade de desordens imunológicas e para o reparo ou regeneração de tecidos dentários tem sido amplamente estudados. A visão geral sobre a necessidade de liberação de múltiplos fatores de crescimento e metodologias para atingir esse objetivo, em relação as suas combinações e estratégias para a sua liberação, necessitam de mais estudos para comprovar qual fator de crescimento, e com qual associação de *scaffolds* seria a melhor opção para cada tipo de tecido (CHEN; ZHANG; WU, 2010).

Scaffolds são indispensáveis na regeneração de tecidos, eles servem como estruturas porosas sobre o qual todos os biomateriais e biomoléculas para a regeneração do tecido são ancorados (fatores de crescimento e células-tronco, principalmente). Pesquisas relacionadas à biomateriais tem focado, principalmente, na construção de *scaffolds* com propriedades físicas, químicas e mecânicas ideais, além da inclusão de biomoléculas e sua liberação controlada no sítio do defeito para promover e prolongar a sobrevivência da interações da tríade da engenharia tecidual (células, *scaffolds* e fatores de crescimento). Com o advento das tecnologias em nanoescala, tornou-se possível projetar e fabricar *scaffolds* que não são apenas um arcabouço para guiar a regeneração, mas também proporcionaram um microambiente tridimensional que suporta o comportamento celular, a função do tecido e a implantação e a integração do hospedeiro. Pesquisas ainda necessitam serem realizadas para utilizar-se o conhecimento da engenharia tecidual na regeneração de tecidos dentários, para que esses possam ser clinicamente aplicáveis em ensaios clínicos em humanos. A aplicabilidade das células-tronco e as

ciências de biomateriais para a reconstrução dental não pode ser subestimada e oferece um futuro promissor (SHARMA et al., 2014).

As limitações deste estudo envolvem o restrito número de ensaios clínicos disponíveis, os quais respaldariam a aplicação clínica da Engenharia Tecidual na área Odontológica.

5 CONCLUSÃO

Com base nas evidências científicas disponíveis, esta revisão de literatura pôde concluir que a Engenharia Tecidual é um campo promissor e pesquisas relacionadas a este tema só tendem a evoluir, podendo no futuro proporcionar a cura de defeitos ou regenerações de tecidos perdidos como uma alternativa de tratamento mais biológico para os pacientes. A tríade descrita no estudo possibilita concluir que as células-tronco de origem odontogênica mostram-se uma fonte de células progenitoras de fácil obtenção, e sua associação com *scaffolds* e fatores de crescimento têm demonstrado avanços significativos. Os estudos analisados citam *scaffolds* como aliado no sucesso da regeneração de tecidos dentários, entretanto busca-se ainda o seu aprimoramento, para que ele preencha um número maior de requisitos para a função. Os fatores de crescimento descritos vêm sendo amplamente estudados e o controle da sua liberação no local desejado requer mais estudos para garantir sua presença durante todo o processo de regeneração dos tecidos perdidos.

Efeitos adversos como o crescimento tumoral foram relatados, porém, obstáculos como esse podem ser evitados com o entendimento profundo da sinalização celular. Necessita-se ainda pesquisas que avaliem alterações no crescimento anormal da implantação à longo prazo. Um maior número de ensaios clínicos em humanos serão necessários para comprovar a eficácia da tríade da Engenharia Tecidual além dos já realizados em animais.

A busca pela regeneração de tecidos dentários com base na terapia celular mostra-se próspera. Acredita-se que em um futuro não tão distante a terapêutica celular esteja disponível para o uso clínico e seguro em pacientes necessitados.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, F. M. et al. Expression of odontogenic genes in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Journal*, v. 15, n. 2, p. 136-141, 2012.
- ABE, S.; YAMAGUCHI, S.; AMAGASA, T. Multilineage cells from apical pulp of human tooth with immature apex. *Oral Science International*, v. 4, n. 1, p. 45-58, 2007.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; CARVALHO, H. F. Lisossomos. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 185-198.
- BARTOLD, P. M. et al. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, v. 41, n. 1, p. 123– 135, 2006.
- BERTACHINI-LOMBELLO, C.; CARVALHO, H. F. Reticulo endoplasmático. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 172-184.
- BERTACHINI-LOMBELLO, C.; LOURENÇO, L. B.; CARVALHO, H. F. Complexo de Golgi. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 185-198.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, v. 414, n. 6859, p. 118-121, 2001.
- BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SIMMONS, P. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, v. 2, n. 4, p. 313–9, 2008.
- CARVALHO, Hernandes F. Envoltório nuclear. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 113-127.
- CASAGRANDE, L.; NOR, J. E. Biologia molecular e celular na clínica odontológica infantil. In: FELDENS, C. A.; KRAMER, P. F. *Cárie dentária na infância: uma abordagem contemporânea*. São Paulo: Santos, 2013. p. 267-281.
- CHANDAR, N.; VISELLI, S. *Biologia celular e molecular ilustrada*. Porto Alegre: Arned, 2011. 236 p.
- CHANDKI, R. et al. From stem to roots: tissue engineering in endodontics. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 4, n. 1, p. 66-71, 2011.
- CHEN, F. et al. Stem cells delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, v. 33, n. 27, p. 6320-6344, 2012.
- CHEN, F. M.; JIN, Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Engineering Part B Reviews*, v. 16, n. 2, p. 219-55, 2010.

CHEN, F. M.; ZHANG, M.; WU, Z. F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*, v. 31, n. 24, p. 6279-308, 2010.

CHEN, S. C. et al. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *Journal of Periodontal Research*, v. 41, n. 6, p. 547-553, 2006.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. Cell signaling. In: _____. *The cell: a molecular approach*. 4th ed. Sunderland : Sinauer, 2007. p. 599-648.

CORTELAZZO, Angelo Luiz. Moléculas importantes para a compreensão da célula e do seu funcionamento. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 7-23.

D'AQUINO, R. et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells & Materials*, v. 12, n. 18, p.75-83, 2009.

DAVIES, S. D.; OCHS, M. W. Bone morphogenetic proteins in craniomaxillofacial Surgery. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, v. 22, n. 10, p. 17-31, 2010.

EGUSA, H. et al. Stem cells in dentistry – part I: stem cells sources. *Journal of Prosthodontic Research*, v. 56, n. 3, p. 151-165, 2012.

GIULIANI, A. et al. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 2, n. 4, p. 316–24, 2013.

GOMES, L.; PIMENTEL, E. R.; RECCO-PIMENTEL, S. M. Ribossomos e síntese proteica. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 172-184.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 97, n. 25, p. 13625–30, 2000.

HAN, J. et al. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, v. 59, n. 1, p. 1-14, 2014.

HOLLINGER, J. O.; WINN, S.; BONADIO, J. Options for tissue engineering to address challenges of the aging skeleton. *Journal of Tissue Engineering*, v. 6, n. 4, p. 341-350, 2000.

HOWARD, C.; MURRAY, P. E.; NAMEROW, K. N. Dental pulp stem cell migration. *Journal of Endodontics*, v. 36, n. 12, p.1963–6, 2010.

HUANG, G. T. et al. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 6, p. 645–651, 2008.

_____ et al. Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an vivo model. *Tissue Engineering Part A*, v. 16, n. 2, p. 605-15, 2009.

HUTMACHER, D. W.; COOL, S. Concepts of scaffold-based tissue engineering—the rationale to use solid free-form fabrication techniques. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 11, n. 4, p. 654–69, 2007.

IKEDA, E. et al. Multipotent cells from the human third molar: feasibility of cell-based therapy for liver disease. *Differentiation*, v. 76, n. 5, p. 495–505, 2008.

JOOS, Ulrich. Tissue engineering strategies in dental implantology. In: MEYER, U. et al. *Fundamentals of tissue engineering and regenerative medicine*. Nova Iorque: Springer, 2009. p. 839-85.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 339 p.

KUMAR, V. et al. Tissue renewal, repair and regeneration. In: KUMAR, V. et al. *Robbins & Cotran pathologic basis of disease*. 8. ed. Philadelphia: Saunders, 2010. p. 79-110.

LA NOCE, M. et al. Dental pulp stem cells: state of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*, v. 42, n. 7, p. 761–768, 2014.

LINO NETO, J.; GOÉS, M. R.; CARVALHO, H. F. Citoesqueleto. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 258-275.

LIU, Y. et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*, v. 26, n. 4, p. 1065-73, 2008.

MACHADO, E.; FERNANDES, M. H.; GOMES, P. S. Dental stem cell for craniofacial tissue engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 113, n. 6, p. 728-33, 2012.

MAEDA, H. et al. Periodontal tissue engineering: defining the triad. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 28, n. 6, p. 461-7, 2013.

MATHUR, S. et al. Stem cell research: applicability in dentistry. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 29, n. 2, p. 210-219, 2014.

MELLO, Maria Luiza Silveira. Nucléolo. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 144-154.

MIURA, M. et al. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v. 100, n. 10, p. 5807–5812, 2003.

MORSCZECK, C. et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biology*, v. 24, n. 2, p. 155–65, 2005.

MOY, P. K. et al. Dental implant failure rates and associated risk factors. *Journal of Oral Maxillofacial Implants*, v. 20, n. 4, p. 569-577, 2005.

MUMMERY, C. et al. Of mice and men: the history of embryonic stem cells. In: _____. *Stem cells: scientific facts and fiction*. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 69-100.

MURRAY, Peter. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue. *Dental Clinics of North America*, v. 56, n. 3, p. 577–88, 2012.

PILIPCHUCK, S. P. et al. Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. *Dental Materials*, v. 31, n. 4, p. 317–38, 2015.

PIMENTEL, Edson Rosa. Mitocôndria. In: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. *A Célula*. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. p. 211-225.

ROSA, V. et al. Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dental Materials*, v. 28, n. 4, p. 341-348, 2012.

ROSSETI, Maria Lucia R. A Célula e seus constituintes moleculares. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 2-14.

SAKAI, V. T. et al. SHED differentiate into functional odontoblast and endothelium. *Journal of Dental Research*, v. 89, n. 8, p. 791-6, 2010.

SCHRANK, Augusto. Estrutura dos ácidos nucleicos. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012a. p. 18-32.

_____. Transcrição. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012b. p. 205-232.

SCHRANK, I. S.; VAINSTEIN, M. H. Código genético e síntese de proteínas. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 256-273.

SHELLER, E. L.; KREBSBACH, P. H.; KOHN D. H. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Journal of Oral Rehabilitation*, v. 36, n. 5, p. 368-389, 2009.

SEDGLEY, C. M.; BOTERO, T. M. Dental stem cells and their sources. *Dental Clinics of North America*, v. 56, n. 3, p. 549-61, 2012.

SEO, B. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, v. 364, n. 9429, p. 149-155, 2004.

SHARMA, S. et al., Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 1, p. 309-315, 2014.

SHRIVATS, A. R.; MCDERMOTT, M. C.; HOLLINGER, J. O. Bone tissue engineering: state of the union. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 6, p. 781-6, 2014.

SIAL, S. et al. Role of tissue engineering in dental pulp regeneration. *European Journal of General Dentistry*, v. 1, n. 2, p. 74-77, 2012.

SLAVKIN, H. C.; BARTOLD, P. M. Challenges and potential in tissue engineering. *Periodontology 2000*, v. 41, n. 1, p. 9-15, 2006.

SONOYAMA, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal Of Endodontics*, v. 34, n. 2, p. 166-71, 2008.

STADLINGER, B. et al. Effect of biological implant surface coatings on bone formation, applying collagen, proteoglycans, glycosaminoglycans and growth factors. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 3, p. 1043-1049, 2008.

SUJESH, M. et al. Stem cell mediated tooth regeneration: new vistas in dentistry. *Indian Prosthodontic Society*, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2011.

WADA, N. et al. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontology 2000*, v. 63, n. 1, p. 198-216, 2013.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D. W. The return of a forgotten polymer— Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, n. 10, p. 217-256, 2010.

YAMAZA, T. et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2010.

YAO, S. et al. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *Journal of Dental Research*, v. 87, n. 8, p. 767-71, 2008.

YOO, D. et al. Increased osseointegration effect of bone morphogenetic protein 2 on dental implants: an in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 102, n. 6, p. 1921-1927, 2014.