

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Instituto Universitário de Ciências da Saúde

CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA DENTÁRIA

Joana Fernandes Alves

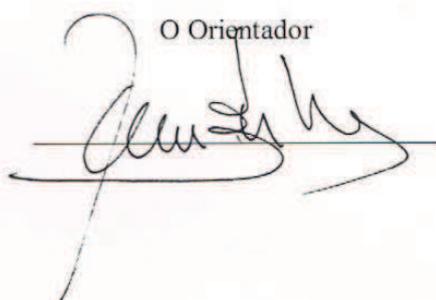
Orientador: Prof. Dr. Mário Barbosa

Co-Orientadora: Dra. Helga Leite

DECLARAÇÃO

Eu, **Fernando Mário de Almeida Barbosa**, com a categoria profissional de **Prof. Auxiliar** do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador do Relatório Final de Estágio intitulado “**CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA DENTÁRIA**”, do Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, **Joana Fernandes Alves**, declaro que sou de parecer favorável para que o Relatório Final de Estágio possa ser presente ao Júri para Admissão a provas conducentes à obtenção do Grau de Mestre.

Gandra, 28 de Junho 2016

O Orientador


Agradecimentos

Aos meus pais, por toda a ajuda, empenho e esforço que fizeram para que fosse possível concluir esta etapa. Sem eles teria sido impossível.

Ao meu irmão, por ter estado presente sempre que precisei.

A eles devo-lhes toda a dedicação, todo o amor e apoio incondicional.

Aos professores, por terem contribuído para que obtivesse uma formação de excelência nesta instituição.

Aos amigos, que me apoiaram e incentivaram sempre que foi necessário. Em especial à Catarina Oliveira, ao Bruno Pacheco e à Joana Barbosa. À minha binómia Ana Paula por toda a preocupação e interesse demonstrado.

Ao professor Dr. Mário Barbosa pela ajuda prestada.

À Dra. Helga Leite, por todo o apoio, ajuda e empenho demonstrado. São pessoas com o seu espírito que fazem falta. Este é o seu lema: "A partilha do saber, é a essência da aprendizagem". Obrigada por tudo o que partilhou comigo.

A todos os que questionaram que isto seria possível, o meu grande obrigada, pois foram uma enorme fonte de motivação.

"A persistência é o caminho do êxito."

Charles Chaplin

"Acredite em si próprio e chegará um dia em que os outros não terão outra escolha senão acreditar com você."

Cynthia Kersey

ÍNDICE GERAL

CAPÍTULO I - CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA DENTÁRIA	1
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Materiais e Métodos	3
3.1. Metodologia de Revisão Bibliográfica	3
4. Discussão	4
4.1 Tipos de Células Estaminais.....	4
4.1.1 Células Estaminais Embrionárias (CEE)	4
4.1.2 Células Estaminais Adultas (CEA)	5
4.1.3 Células Pluripotentes Induzidas (CPI).....	5
4.1.4 Células Estaminais derivadas do Líquido Amniótico	5
4.1.5 Células Estaminais derivadas do Cordão Umbilical.....	6
4.1.6 Células Estaminais derivadas da Medula Óssea.....	6
4.1.7 Células Estaminais derivadas do Tecido Adiposo.....	6
4.2 Células Estaminais da Polpa Dentária (CEPD)	7
4.2.1 Facilidade de acesso.....	8
4.2.2 Faixa Etária ideal para a recolha dos dentes a criopreservar.....	10
4.2.3 Protocolo de recolha dos dentes no Consultório Médico Dentário.....	10
5. Criopreservação	11
5.1 Expectativa de Criopreservação em condições favoráveis para uso no futuro	11
6. Aplicações Médicas	12
8. Conclusão	14
9. Bibliografia	15
CAPÍTULO II - RELATÓRIO DO ESTÁGIO	17
1. RELATÓRIOS	17
1.1. Relatório das Atividades Práticas das Disciplinas de Estágio Supervisionado	17
1.2. Estágio em Clínica Geral Dentária	17
1.3. Estágio em Clínica Geral Dentária em regime de Voluntariado.....	17
1.4. Estágio Hospitalar.....	18
1.5. Estágio em Saúde Oral Comunitária.....	18
Anexo A	19

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atos Clínicos do Estágio em Clínica Geral Dentária.....	20
Tabela 2 - Atos Clínicos de Estágio Voluntário de Verão	20
Tabela 3 - Atos Clínicos do Estágio Hospitalar	20
Tabela 4 - Plano de Atividades do Estágio Saúde Oral Comunitária	21

ÍNDICE DE IMAGENS

Imagem 1 - "O Dentola"	21
------------------------------	----

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- CE – Células Estaminais
- CEE - Células Estaminais Embrionárias
- CEA - Células Estaminais Adultas
- CPI - Células Pluripotentes Induzidas
- CEM - Células Estaminais Mesenquimais
- CEPD - Células Estaminais da Polpa Dentária

Resumo

Introdução: As células estaminais são células que se incluem no cordão umbilical, fluido amniótico, medula-óssea, tecido adiposo, cérebro e dentes. Possuem a capacidade de se diferenciarem e auto-replicarem por numerosas gerações. Podem ser armazenadas com segurança por muitos anos através da criopreservação. A polpa dentária é um tecido muito rico nestas células. A colheita através da peça dentária é uma prática minimamente invasiva que pode ser realizada até nos adultos, aquando da extração cirúrgica do terceiro molar. Um pequeno número de células estaminais pode ser suficiente para curar grandes defeitos ou para o tratamento de várias doenças.

Objetivos: Conhecer os usos terapêuticos possíveis das células estaminais recolhidas na polpa dentária; Conhecer em que faixa etária é possível realizar a sua recolha; Determinar os fatores de preferência de criopreservação das células estaminais provenientes da polpa dentária; Vantagens e inconvenientes da recolha e uso destas células; Conhecer o processo de recolha dos dentes a criopreservar no consultório Médico Dentário; Conhecer as expectativas da duração destas células para o seu uso com proveito.

Métodos: Metodologia de Revisão Bibliográfica. Foi realizada pesquisa bibliográfica, entre Abril de 2015 e Dezembro de 2015, nas bases de dados científicas Pubmed e ScienceDirect. A pesquisa foi selecionada no período compreendido entre 2006 e 2015.

Conclusões: Ao preservar as células estaminais podemos maximizar a sua capacidade e tirar proveito dos últimos desenvolvimentos terapêuticos e avanços científicos. Os Médicos Dentistas têm um papel preponderante na passagem da informação aos seus pacientes pois existem perspectivas promissoras no uso desse tecido usualmente descartado.

Palavras – Chave: "Células-tronco", "Células tronco multipotentes", " Criopreservação", "Polpa dentária", "Medicina regenerativa"

Abstract

Introduction: Stem cells are cells which are included in the umbilical cord, amniotic fluid, bone marrow, adipose tissue, brain and teeth. They have the capacity of distinguishing and self-replicating themselves on countless generations. Generally, they can be stored safely for a long time through cryopreservation. The dental pulp is a very rich tissue on these cells. The sampling through the dental part is a minimally invasive practice which can even be applied to adults when they undergo surgery to remove the third molar. A small number of stem cells can be enough to heal large defects or for the treatment of several diseases.

Aims: To know the potential therapeutic usage of stem cells collected from the dental pulp; to know in which age group it is possible to carry out the collection; to determine the preference factors of cryopreservation of stem cells coming from the dental pulp; advantages and disadvantages of collection and usage of these cells; to know the process of collecting the teeth to cryopreserve at the Dentist surgery; to meet the expectations of the duration of these cells to use them with benefits.

Methods: Bibliographical research methodology. Bibliographical research was carried out between April, 2015 and December, 2015 on the Pubmed, Scielo and ScienceDirect scientific databases. The research was selected in the period between 2006 and 2015.

Conclusion: By preserving stem cells we can maximize their capacity and take advantage of the recent therapeutic developments and scientific advances. Dentists have a leading role when it comes to passing information to their patients as there are promising prospects concerning the use of that tissue usually discarded.

Key – words: "Stem Cells", "Multipotent stem Cells", "Cryopreservation", "Dental Pulp", "Regenerative medicine".

CAPÍTULO I - CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA DENTÁRIA

1. INTRODUÇÃO

A incidência de doenças degenerativas e a velhice da população cresce com a idade, pelo que pode prever-se que a necessidade de opções viáveis e melhoradas de tratamento para estas doenças tenda a aumentar⁽¹⁾.

As Células Estaminais (CE) são células-mãe que fazem parte da constituição intrínseca do Ser Humano. Estas são indiferenciadas e capazes de se auto-regenerarem, multiplicarem e de se diferenciarem em células mais especializadas, tais como, células do sangue, músculo, coração, cérebro, ossos e pele. Também são responsáveis pela substituição regular das células e/ou tecidos do nosso corpo ao longo dos tempos^(1,2).

As CE podem ser induzidas numa via de diferenciação e, em seguida, cultivadas para se tornarem células específicas de um tecido ou de um órgão com as funcionalidades do mesmo. Podem ser distinguidas em diferentes tipos de células estaminais dependendo dos tipos de células a que podem dar origem:

- Células Estaminais Totipotentes: permitem o desenvolvimento de um indivíduo completo;
- Células Estaminais Pluripotentes: capazes de formar todos os tecidos do organismo;
- Células Estaminais Multipotentes: presentes nos tecidos fetais e adultos que se podem diferenciar em vários tipos de células da mesma família;
- Células Estaminais Unipotentes: só se podem diferenciar em apenas um tipo de células⁽²⁾.

Existem diferentes fontes de CE como o sangue do cordão umbilical, o tecido do cordão umbilical, o fluido amniótico, a medula óssea, o tecido adiposo, o cérebro e os dentes⁽¹⁾. Podem ser de origem Embrionária ou Adulta⁽³⁾. Estas células encontram-se agrupadas de acordo com a sua origem e capacidade de diferenciação, em Hematopoiéticas e Mesenquimais⁽¹⁾.

A Polpa Dentária é em muitos aspetos, um dos tecidos adultos mais importantes como parte de uma conservação, a longo prazo, de CE⁽²⁾. Os dentes decíduos acabarão por ser perdidos naturalmente. Estes dentes apresentam a vantagem de terem maiores taxas de proliferação e diferenciação⁽⁴⁾ e permitem o seu acesso através de invasão mínima⁽⁵⁾. Encontram-se prontamente disponíveis à criopreservação para o tratamento futuro de doenças, quando comparados aos dentes permanentes⁽⁶⁾. Já os terceiros molares são frequentemente extraídos por razões terapêuticas ou outras. Quando possível, a sua polpa pode ser recuperada e guardada através da criopreservação, pois estes dentes são considerados uma boa fonte tardia de CE para o reparo e regeneração tecidular⁽⁷⁾.

A criopreservação é apresentada como uma alternativa para manter a vitalidade das células, com o seu armazenamento a longo prazo e em segurança, para a sua aplicação clínica, assim que seja necessária⁽⁴⁾. Estudos recentes sugerem que o armazenamento prolongado, através da criopreservação dos tecidos dentários, em Nitrogénio Líquido, para uso futuro, é viável. Sendo assim, já começam a existir os primeiros laboratórios para esse fim^(4,5).

Com tudo o que se sabe hoje sobre CE e sobre os tecidos da estrutura dentária, os Médicos Dentistas estão numa posição de passarem a informação e consciencializarem os seus pacientes para esta possibilidade⁽¹⁾.

2. OBJETIVOS

Os propósitos deste estudo:

- Conhecer os usos terapêuticos possíveis das células estaminais recolhidas na polpa dentária;
- Conhecer em que faixa etária é possível realizar a recolha das células estaminais da polpa dentária;
- Determinar os fatores de preferência de criopreservação das células estaminais provenientes da polpa dentária e não de outra fonte;
- Saber quais as vantagens e inconvenientes da recolha e uso destas células;
- Conhecer o processo de recolha dos dentes a criopreservar no consultório Médico Dentário;
- Conhecer as expectativas da duração possível do uso destas células com proveito.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Metodologia de Revisão Bibliográfica

Foi realizada pesquisa bibliográfica, entre Abril de 2015 e Dezembro de 2015, nas bases de dados científicas Pubmed e ScienceDirect. A pesquisa foi selecionada no período compreendido entre 2006 e 2015. **Palavras – Chave:** "Células-tronco", "Células tronco multipotentes", " Criopreservação", "Polpa dentária", "Medicina regenerativa". Foram também usados artigos citados no livro "Células Tronco – da coleta aos protocolos terapêuticos" da editora Atheneu - Autores: Celso Massumoto, Sally Mizukami Massumoto, Autor: Celso Massumoto, Sally Mizukami Massumoto, Carlos Alexandre Ayoub, Nelson Foresto Lizier; Páginas:402 Formato:17x24cm; Edição:1ªEdição; Ano de lançamento: 2014.

4. DISCUSSÃO

O uso de CE representa um dos mais importantes marcos da ciência médica no que respeita ao tratamento de doenças e ao desenvolvimento da bio-engenharia de células e tecidos^(1,2). As CE possuem capacidade de induzir a regeneração tecidual e, portanto, apresentam potencial terapêutico. Assim como a medula óssea e o cordão umbilical, a polpa dentária é uma das fontes disponíveis de CE⁽³⁾.

As CE podem ser usadas de forma isolada ou em associação com biomateriais, para regenerar o tecido danificado, resultado de danos ou lesões que ocorrem ao longo da vida. Isto não se verifica com o uso de medicamentos, que apenas reduzem a probabilidade de uma doença ocorrer, limitam a sua progressão ou gerem os seus sinais e sintomas^(1,2).

As CE são células que se encontram agrupadas de acordo com a sua origem e capacidade de diferenciação em:

- **Hematopoiéticas** – células que estão presentes no sangue do cordão umbilical e que podem ser transformadas em células do sangue, como por exemplo, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos;
- **Mesenquimais** – células formadoras de tecido, que se podem encontrar em elevadas concentrações nos tecidos sólidos, tais como, no tecido do cordão umbilical, tecido adiposo e dentes⁽¹⁾.

4.1 Tipos de Células Estaminais

4.1.1 Células Estaminais Embrionárias (CEE)

São células derivadas a partir das células da massa celular interna do blastocisto durante o desenvolvimento embrionário. Estas células têm a capacidade de se diferenciarem em vários tipos de células da mesma família e, por isso, denominadas multipotentes. Também são aptas a se auto-replicarem por numerosas gerações.

Uma desvantagem potencial das CEE é a capacidade destas se diferenciarem em qualquer linhagem de células e proliferarem indefinidamente. O Teratoma observado clinicamente é um tumor que exemplifica um crescimento de CEE num “tecido diferente e

indesejado”. Outra desvantagem é que estas células só podem ser obtidas a partir de embriões e, portanto, estão associadas a questões éticas^(1,3).

4.1.2 Células Estaminais Adultas (CEA)

São células que se incluem no cordão umbilical, fluido amniótico, medula óssea, tecido adiposo, pâncreas, cérebro e dentes. Estas células apresentam a vantagem de não estarem sujeitas à controvérsia ética e moral como acontece com as CEE, pois podem ser obtidas do próprio paciente.^(1,3,8) São células autólogas, apresentando desta forma, outra vantagem importante, uma vez que, não desencadeiam rejeição imunológica e respondem aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro^(1,3).

Assim sendo, estas células reduzem o risco de rejeição e, desde que correctamente manipuladas, é reduzido o risco de infeção cruzada a partir de tecido homogéneo transplantado. Além disso, receptores de transplantes autólogos de CE não exigem a utilização de medicamentos imunossupressores para combater a rejeição⁽¹⁾.

As CEA são consideradas recursos promissores para a bioengenharia tecidual. São células multipotentes com fácil expansão *in vitro* e potenciais de proliferação, plasticidade e diferenciação para adipócitos, osteoblastos, condrócitos, hepatócitos e células neurais.⁽⁸⁾

4.1.3 Células Pluripotentes Induzidas (CPI)

São Células Estaminais Adultas ou Somáticas, recentemente descobertas, que foram induzidas a comportar-se como Células Estaminais Embrionárias. Têm a capacidade de gerar uma grande quantidade de CE autólogas tornando-se uma fonte de regeneração para tecidos específicos⁽¹⁾.

4.1.4 Células Estaminais derivadas do Líquido Amniótico

As Células Estaminais derivadas do Líquido Amniótico podem ser isoladas a partir de aspirados da amniocentese durante a triagem genética. Um número cada vez maior de estudos demonstraram que estas células têm uma capacidade notável para proliferar e diferenciarem-se em múltiplas linhagens, tais como, condrócitos, adipócitos, osteoblastos, miócitos, células endoteliais. O seu potencial terapêutico ainda não foi devidamente avaliado. As Células Estaminais Amnióticas podem ser obtidas apenas a partir do fluido amniótico e, portanto, encontram-se sujeitas a limitações no tempo⁽¹⁾.

4.1.5 Células Estaminais derivadas do Cordão Umbilical

As CE do Sangue do Cordão Umbilical são células com um potencial elevado devido à capacidade de auto-replicação e diferenciação em multilinhagens. Estas podem diferenciar-se em vários tipos de células como: células do fígado, células músculo-esquelético, tecido neuronal, pâncreas, células do tecido imunológico e células estaminais mesenquimais. Apresentam o inconveniente da colheita se efectuar apenas aquando do nascimento⁽¹⁾.

4.1.6 Células Estaminais derivadas da Medula Óssea

Estas células são as CE mais disponíveis comercialmente. São células que tanto podem ser hematopoiéticas como mesenquimais. Conseguem gerar osso, cartilagem, outros tecidos conjuntivos e gordura. Podem ser isoladas a partir do aspirado da medula óssea ou, então, a partir da recolha de células estaminais do sangue periférico, após estimulação química da medula óssea, por meio de uma injeção subcutânea⁽¹⁾.

A medula óssea é ainda considerada uma fonte privilegiada de Células Estaminais Mesenquimais (CEM). No entanto, as CEM derivadas da medula óssea apresentam algumas limitações na engenharia de tecidos à base de células para utilização clínica. As suas principais limitações são a disponibilidade reduzida e a colheita necessária de grandes volumes de medula óssea humana, o que é relativamente difícil. Além disso, as CE derivadas da medula óssea contêm células com poucas passagens iniciais que podem resultar em heterogeneidade celular⁽⁶⁾. A aspiração de medula óssea representa um método extremamente invasivo sobre os doadores. Com estas limitações significativas existe a necessidade de procurar recursos alternativos com abordagens acessíveis e menos invasivas. Novas populações CEM foram identificadas a partir de várias fontes, tais como, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e polpa dentária⁽⁹⁾.

4.1.7 Células Estaminais derivadas do Tecido Adiposo

As CE derivadas do Tecido Adiposo, normalmente, são isoladas a partir de lipoaspiração ou dos aspirados da lipoaspiração. Apresentam-se de forma diferenciada como adipócitos, condrócitos, miócitos, osteoblastos e células neuronais. Têm como

vantagem o tecido adiposo ser abundante e acessível. A sua capacidade restauradora comparada com outras CE ainda não está bem estabelecida⁽¹⁾.

A Medula Óssea e o Tecido Adiposo são fontes convencionais de CEM, todavia, os protocolos invasores de colheita das células, as dificuldades nos procedimentos de isolamento, o uso frequente de anestesia, o risco de morbidade no local da colheita e a possível contaminação, estimulam a busca de tecidos alternativos^(9,10).

As CEM apresentam um alto potencial de utilização na Medicina Regenerativa pela sua elevada proliferação e capacidade de diferenciação. A procura de fontes alternativas de células estaminais adultas com protocolos de colheita menos invasivos, levou os tecidos dentários a serem amplamente estudados nesse sentido, nos últimos tempos⁽¹⁰⁾.

4.2 Células Estaminais da Polpa Dentária (CEPD)

Existem dois tipos de dentição com diferença cronológica na vida de um ser Humano: a dentição decídua e a dentição permanente. Dos tecidos dentários, a Polpa Dentária desempenha um importante papel no abrigo de CEM⁽⁶⁾.

As células embrionárias migram das cristas neurais para reforçar a cabeça e o pescoço com células mesenquimais, tornando-se determinantes no desenvolvimento dessa área do corpo humano. Durante a sexta semana de embriogénese o ectoderma que cobre o estomodeu começa a diferenciar-se, originando as lâminas dentárias. Interações recíprocas entre camadas da ectoderme e mesoderme levam a que uma destas estruturas ectodérmicas ovóides grossas desenvolva os germes dentários, onde as células, pertencentes à crista neural, se diferenciam no germe dentário, contendo a papila dentária e o folículo. Portanto, a polpa dentária é feita de componentes ecto-mesenquimais, contendo células derivadas da crista neural, que exibem capacidades de plasticidade e multipotência⁽¹¹⁾.

A derivação das Células Estaminais Dentárias a partir da crista neural torna possível que as CEPD se possam diferenciar numa gama de tipos celulares, como, as células da glia, neurónios, osso, tendão, melanócito, condrócitos, células endócrinas e tecido adiposo^(6,12).

A Polpa Dentária dos dentes é considerada uma fonte particularmente boa de CEM. Essa polpa pode ser obtida a partir de dentes decíduos extraídos, ou após a erupção serial decídua normal, dos dentes permanentes.

A última década assistiu a muitos estudos sobre as CEM da polpa dentária, e esta possibilidade está a tornar-se cada vez mais praticável⁽⁶⁾. Desde o ano 2000, diferentes populações de células estaminais foram isoladas de diversos tipos de dentes: decíduos, permanentes e supranumerários⁽¹³⁾. Existem células estaminais dentárias de 5 tipos:

- (1) Células Estaminais pós-natais da Polpa Dentária;
- (2) Células Estaminais dos Dentes decíduos;
- (3) Células Estaminais do Ligamento Periodontal;
- (4) Células Estaminais da Célula da Papila Apical;
- (5) Células Estaminais do Folículo dos dentes impactados⁽²⁾.

4.2.1 Facilidade de acesso

O isolamento de CEPD é um procedimento simples, dado que este é feito a partir da peça dentária extraída⁽¹⁰⁾. A colheita resulta num trauma mínimo, o que é visto como vantagem⁽¹⁾.

Os dentes decíduos, além de serem de acesso fácil, não são órgãos vitais permanentes^(3,5), o que faz deles um atractivo para testes de segurança e viabilidade terapêutica dessas células⁽³⁾. Outra vantagem é o facto de estas células estarem facilmente disponíveis após a colheita⁽¹⁾.

A esfoliação dos dentes decíduos ocorre por entre os 6 e os 12 anos de idade. É durante este intervalo de tempo que a colheita deve ser efetuada. O uso de CE, provenientes desta fonte, são consideradas promissoras para a terapia regenerativa. Estes dentes contêm CE pós-natais originais que, após a esfoliação, podem ser armazenadas para serem usadas, caso necessário, no futuro. Estas células têm capacidade de se auto-renovarem e multiplicarem apresentando função imunomoduladora. As CE pós-natais são promissoras para a cura de diversas doenças, tais como, leucemia, anemia aplástica e doenças auto-imunes. As CE dos dentes decíduos têm vindo a demonstrar capacidade de manter as suas propriedades após a criopreservação por longo prazo⁽⁹⁾.

O terceiro molar ou siso, o último dente a erupcionar, é visto como um recurso tardio para quem quer obter CEPD em abundância. É um tecido adulto, mas jovem. Por essa razão acredita-se que pode ter CE passíveis de serem usadas para futuros fins regenerativos, por ser se encontrar numa fase inicial do seu desenvolvimento em comparação com a medula óssea de adultos. Mais recentemente, as novas populações de CEM foram obtidas a partir da raiz, em desenvolvimento, do terceiro molar não erupcionado. Estas células não só proliferam mais significativamente do que as da polpa dentária madura, mas, também, têm uma capacidade maior de diferenciação tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas características confirmam que os tecidos em fases mais primitivas de desenvolvimento podem ser uma melhor fonte de células para a engenharia de tecidos⁽⁸⁾.

Nos dias de hoje, durante o tratamento ortodôntico, normalmente realizado na adolescência, ocorre a extração deste dente (antes ou durante) e, nesta fase, os dentes decíduos já foram perdidos. Esta é então vista como uma nova oportunidade para se fazer a recolha, pois não evoca quaisquer controvérsias éticas^(8,10).

O germe do 3º molar começa o seu desenvolvimento em torno do sexto ano de vida. Até esse momento, os tecidos embrionários da lâmina dentária permanecem em repouso e indiferenciados na mandíbula da criança. Embora a mineralização da coroa comece durante o oitavo ano de vida, muitas vezes, as raízes dos terceiros molares ainda estão incompletas aos 18 anos. Isto significa que a estrutura dos dentes ainda é imatura nessa idade e que uma grande quantidade de células indiferenciadas, residente na “zona rica da célula” da polpa do germe dentário, são necessários para o desenvolvimento⁽¹¹⁾. Estes dentes podem ser criopreservados durante um longo período, sem perder a sua capacidade de diferenciação⁽¹⁰⁾.

A remoção cirúrgica do terceiro molar nesta fase é relativamente fácil e menos traumática, porque a coroa está formada e as raízes que podem complicar o processo de remoção ainda não estão formadas. Além disso, a colheita dos tecidos moles desejados pode ter de ser feito com uma sonda, no máximo, enquanto que a obtenção da polpa madura da câmara do dente (após a formação das raízes), requer corte da coroa com brocas dentárias, o que pode por si só, ser prejudicial para as células⁽⁸⁾.

4.2.2 Faixa Etária ideal para a recolha dos dentes a criopreservar

Não existem regras que determinem a melhor fase de desenvolvimento do dente para a colheita de células da polpa. Os dentes podem ser colhidos em pacientes de várias idades e, portanto, em vários estágios de desenvolvimento⁽⁷⁾. Ainda assim, os dentes decíduos extraídos oferecem vantagens adicionais em relação a outros dentes como fonte de CE. Tem sido notório, que as CE extraídas dos dentes decíduos reproduzem-se mais rapidamente,^(1,6) produzindo, assim, mais e maiores colónias comparativamente aos dentes permanentes⁽⁶⁾. Por essa razão, apresentam um potencial regenerativo e de proliferação maior⁽³⁾. Acredita-se que tal facto se deve porque elas são menos maduras, logo, mais jovens, que outras CE do nosso corpo⁽¹⁾.

4.2.3 Protocolo de recolha dos dentes no Consultório Médico Dentário

O isolamento das CEPD humana deve ser realizado pelo menos 120h após a extracção do dente, ou seja, 5 dias.

A Future Health Biobank é um banco de células estaminais dentárias pioneiro na criopreservação. Encontra-se sediado em Londres, mas também existe na Suíça e em Portugal. Desenvolveu a tecnologia, conhecimento e cuidados para manter as células estaminais dos dentes seguras, saudáveis e prontas a utilizar para o caso de um dia serem necessárias. O processo é simples, basta pedir o kit de recolha e marcar com o Médico Dentista uma consulta para avaliar e extrair o melhor dente a criopreservar. Em consultório seguem-se os seguintes passos:

- Extração do dente;
- Preparação do kit de recolha;
- Colocação do dente no receptáculo;
- Preencher e assinar toda a documentação.

O transporte do consultório até ao laboratório requer condições que não afecte a viabilidade celular⁽⁷⁾.

Uma vez recebido o dente, os técnicos avaliam a sua qualidade para assegurar que o dente é saudável e que contém polpa dentária viável para extração de CE. As CEPD são de seguida extraídas e separadas de todas as restantes partes do dente. As CE isoladas

são semeadas num frasco de cultura e o seu crescimento é monitorizado para confirmar o sucesso da cultura.

Uma vez separadas as CEPD, são colocadas em frascos criogénicos únicos e codificados. De seguida são colocadas numa caixa criogénica para proteção extra. A caixa criogénica é então colocada num tanque de armazenamento contendo azoto líquido em estado a vapor.

5. CRIOPRESERVAÇÃO

Criopreservar, significa preservar a baixa temperatura.

A criogenia é a ciência que estuda o comportamento dos tecidos a muito baixas temperaturas, até -196°C por um período longo de tempo. Através da criopreservação as CE mantêm-se viáveis para poderem, em caso de necessidade, ser aplicadas no tratamento de determinadas patologias⁽¹⁾.

Na criopreservação as lesões provocadas pela congelação são o problema mais grave que a medicina enfrenta. Estas são causadas por alterações da pressão osmótica, do metabolismo oxidativo e a formação de cristais de gelo. O estado redox intracelular é um fator que pode influenciar a capacidade de sobrevivência das células após a sua criopreservação^(14,15).

As células devem ser rapidamente arrefecidas para temperaturas abaixo de zero, tão baixas como -196°C , para parar qualquer actividade celular ou bioquímica. A congelação rápida é necessária para evitar a formação de gelo em torno ou no interior das células e para impedir a desidratação, uma vez que estes causariam dano celular e morte^(1,16).

No caso das CEPD o tecido é colhido, isolado e cultivado em meio isento de soro. A diferenciação é induzida e as células são transplantadas, quer isoladamente ou com outros biomateriais, dependendo da aplicação à qual se destina^(1,17).

5.1 Expectativa de Criopreservação em condições favoráveis para uso no futuro

As CE isoladas podem ser criopreservadas até seis meses com uma qualidade máxima, uma vez que elas apresentam uma funcionalidade bastante semelhante à inicial.

No entanto, a taxa de sobrevivência das células diminui quando criopreservadas durante períodos mais longos de tempo. Acontecimentos fotofísicos provocados pela radiação de fundo ionizante promovem a formação de radicais livres e a produção de breaks em macromoléculas mesmo em sistemas aquosos congelados a -196°C . Contudo, as células podem ser armazenadas com segurança por muitos anos ou mesmo décadas em nitrogénio líquido ⁽¹⁸⁾.

Foi relatado que as CEPD e os seus osteoblastos, células diferenciadas, após 2 anos de criopreservação, são capazes de rapidamente reiniciar a proliferação e a produção de tecido ósseo (in vitro) e a remodelação do osso lamelar adulto (in vivo) de um modo semelhante ao de células frescas⁽⁸⁾.

O resultado do estudo⁽⁹⁾ indica que a criopreservação, de longo prazo da polpa dentária dos dentes humanos decíduos, apresenta um grande potencial favorável para o uso futuro em aplicações clínicas⁽⁹⁾.

6. APLICAÇÕES MÉDICAS

As CEPD são naturalmente capazes de realizar reparação e regeneração de tecidos, como: músculos, tendões, cartilagem, osso e neurónios. Pela sua origem no tubo neural, a polpa dentária apresenta CE muito eficientes no tratamento de patologias do foro neurológico. Pesquisas mostram a eficácia do uso das CE da polpa do dente decíduo para a reversão de doenças degenerativas como Parkinson, Esclerose Múltipla, Diabetes, Cancro, Lesões da Espinal Medula, Alzheimer, Lúpus, AVC, Infarto do Miocárdio e restauração da Córnea⁽¹⁾.

Atualmente cerca de 1 milhão de pessoas nos Estados Unidos é afectado pela patologia de Parkinson e a insuficiência cardíaca afecta mais de 5 milhões de pessoas. As células mesenquimais de origem dentária são capazes de se diferenciarem em epitélio vascular e células neurais substituindo as células mortas e contrariando a degradação dos sistemas. Existem pacientes que já foram tratados com CEM em situações de enfarte cardíaco para regenerar o músculo cardíaco⁽¹⁾, pelo que a aquisição de uma fonte confiável de células para o reparo do tecido é um grande desafio para o campo da medicina regenerativa⁽¹⁹⁾.

As CE dentárias isoladas a partir da polpa dentária têm sido estudadas e acredita-se que possuam capacidades como imunorregulação e imunossupressão. CEM dentárias têm potencial de regeneração de tecidos após danos induzidos pela radioterapia no tratamento do cancro⁽¹⁾. CEM apresentam propriedades anti- apoptóticas, de imunomodulação e efeitos angiogénicos o que faz delas células com capacidade reparadora⁽¹⁰⁾. A manipulação clínica de DNA de CE também está a levar ao desenvolvimento de terapias genéticas⁽¹⁾.

8. CONCLUSÃO

As células estaminais são células com grande poder de multiplicação e diferenciação. Nos últimos tempos tem crescendo a investigação com o intuito de se averiguar a possibilidade do seu uso no tratamento de diversos tipos de patologias.

A criopreservação permite que as células estaminais após recolhidas possam ser armazenadas e usadas quando necessárias. Ao preservarmos as células estaminais conservamos a sua capacidade de diferenciação e reprodução, para futuras necessidades terapêuticas.

As células da polpa dentária são Células Mesenquimais derivadas da crista neural e por essa razão são consideradas importantes para o tratamento de doenças, sobretudo neurológicas, como Parkinson, Alzheimer e Esclerose Múltipla.

Os dentes decíduos da criança perdidos, entre os seis e os doze anos de idade, representam um local de colheita preferencial para a criopreservação de Células Estaminais Mesenquimais.

Os Médicos Dentistas devem informar os seus pacientes das vantagens da recolha e criopreservação das Células Estaminais da Polpa Dentária para que no futuro, em caso de doença, possam ser usadas, pelo dador ou por outro membro da família mais próximo, com intuito terapêutico.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Bash E, Mao JJ, DDS, Collins FM, BDS, MBA, et al. STEM CELLS: Sources, Therapies and the Dental Professional. PhD Propos. 2015;1.
2. Collart Dutilleul P-Y, Thonat C, Jacquemart P, Cuisinier F, Levallois B, Chaubron F. Les cellules souches de la pulpe dentaire : caractéristiques, cryopréservation et potentialités thérapeutiques. *L'Orthodontie Française* [Internet]. 2012;83(3):209–16. Available from: <http://www.orthodfr.org/10.1051/orthodfr/2012020>
3. Jesus AA De, Botelho M, Soares P, Soares AP, Nogueira RC. Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. *Dental Press J Orthod* [Internet]. 2011;16(6):111–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S2176-94512011000600017>
4. Sulfoxide D. Serum-Containing Medium Effect on Isolation Rate of Dental Pulp Cells from Cryopreserved Intact Deciduous Teeth. :345–9.
5. Chen Y, Huang AH, Chan AW, Shieh T, Lin L. Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2011;40(10):793–800. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1600-0714.2011.01040.x/asset/j.1600-0714.2011.01040.x.pdf?v=1&t=gyxjkjfo&s=3e73c54fce39d7d49098d62f3ee042c70f5e66e8>
6. Honda MJ, Toriumi T, Watanabe N. Mesenchymal Dental Stem Cells for Tissue Regeneration. *Oral Craniofac Tissue Eng*. 2011;451–60.
7. Ducret M, Fabre H, Degoul O, Atzeni G, McGuckin C, Forraz N, et al. Manufacturing of dental pulp cell-based products from human third molars: Current strategies and future investigations. *Front Physiol*. 2015;6(Aug).
8. Hadaegh Y, Niknam M, Attar A, Maharlooei MK, Tavangar MS, Aarabi AM, et al. Characterization of stem cells from the pulp of unerupted third molar tooth. *Indian J Dent Res* [Internet]. 2014;25(1):14–21. Available from: <http://www.ijdr.in/article.asp?issn=0970-9290;year=2014;volume=25;issue=1;spage=14;epage=21;aulast=Hadaegh>
9. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved Dental Pulp Tissues of Exfoliated Deciduous Teeth Is a Feasible Stem Cell Resource for Regenerative Medicine. *PLoS One*. 2012;7(12).
10. Dogan A, Yalvac ME, Yilmaz A, Rizvanov A, Sahin F. Effect of F68 on cryopreservation of mesenchymal stem cells derived from human tooth germ. *Appl Biochem Biotechnol* [Internet]. 2013;171:1819–31. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23999741
11. Tirino V, Paino F, d'Aquino R, Desiderio V, de Rosa A, Papaccio G. Methods for the Identification, Characterization and Banking of Human DPSCs: Current Strategies

and Perspectives. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(3):608–15.

12. Kerkis I, Caplan AI. Stem Cells in Dental Pulp of Deciduous Teeth. *TISSUE Eng*. 2012;18(2).
13. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*. 2000;97(25).
14. Ganesh P, Sunil Kumar B, Siddharth S. Autotransplantation of Cryopreserved Teeth: A Review. *Virtual J Orthod*.
15. Muhamad A-H, Azzaldeen A. Autotransplantation of Tooth in Mixed Dentition. *J Oral Heal Comm Dent*. 2013;285–92.
16. Price PJ, Cserepfalvi M. Pulp Viability and the Homotransplantation of Frozen Teeth. *J Dent Res*. 1972;39–44.
17. Kaku M, Shimasue H, Ohtani J, Kojima S, Sumi H, Shikata H, et al. A case of tooth autotransplantation after long-term cryopreservation using a programmed freezer with a magnetic field. *Angle Orthod*. 2015;85(3):518–24.
18. Ji EH, Song JS, Kim SO, Jeon M, Choi BJ, Lee JH. Viability of pulp stromal cells in cryopreserved deciduous teeth. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(1):67–74.
19. Papaccio G, Graziano A, d’Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-Term Cryopreservation of Dental Pulp Stem Cells (SBP-DPsCs) and Their Differentiated Osteoblasts: A Cell Source for Tissue Repair. *J Cell Physiol*. 2006;207(1):12–22.

CAPÍTULO II - RELATÓRIO DO ESTÁGIO

1. RELATÓRIOS

O estágio tem por finalidade proporcionar o contacto direto dos alunos com as unidades de saúde onde se diversifica e aumenta a sua experiência clínica na área da Medicina Dentária. De forma sustentada, este estágio possibilita aplicar e aprofundar conhecimentos obtidos no decorrer do curso, bem como fortalecer competências pessoais e profissionais no contacto direto com as práticas ligadas à Medicina Dentária, de forma a simplificar a transição supervisionada para a prática profissional.

1.1. Relatório das Atividades Práticas das Disciplinas de Estágio Supervisionado

O estágio está dividido em 3 áreas que permitiram aplicar e melhorar em termos práticos as bases teóricas adquiridas até ao momento. Os atos clínicos executados em cada um dos estágios encontram-se no anexo A.

1.2. Estágio em Clínica Geral Dentária

O Estágio de Clínica Geral Dentária proporcionou-me uma maior interação com os pacientes e permitiu-me aprimorar a minha autonomia. A regente foi a Professora Doutora Filomena Salazar e foi monitorizado pela Professora Doutora Cristina Coelho. Realizou-se na Unidade Clínica de Gandra – Nova Saúde, no Instituto Universitário Ciências da Saúde. O estágio compreendeu 124 horas (4h semanais), realizado à 5ª feira à noite, entre 17/09/2015 e 16/06/2016. (tabela 1 do anexo A)

1.3. Estágio em Clínica Geral Dentária em regime de Voluntariado

O voluntariado de Clínica Geral Dentária, cuja regente foi a Professora Doutora Filomena Salazar e foi monitorizado por vários docentes do IUCS. Realizou-se na Unidade Clínica de Gandra, no Instituto Universitário Ciências da Saúde e decorreu entre 21/7/2015 e 24/07/2016. Este estágio proporcionou-me uma maior integração no ambiente clínico. (tabela 2 do anexo A)

1.4. Estágio Hospitalar

O Estágio Hospitalar foi muito rico e produtivo. Permitiu-me estar em contacto com uma realidade diferente, e proporcionou o desenvolvimento de uma maior destreza e rapidez na prática dos atos médico-dentários, devido ao elevado número de pacientes comparativamente à baixa carga horária. Foi sem dúvida o estágio mais dinâmico nesse sentido. Estimulou uma interação importante com pacientes com limitações cognitivas e/ou motoras, pacientes polimedicados e com patologias de várias especialidades médicas, tendo sido feita uma relação constante dos conceitos teóricos no decorrer da prática clínica. O regente foi o Prof. Dr. Luís Monteiro e foi monitorizado pela Mestre Rita Cerqueira. Realizou-se no Centro Hospitalar S. João de Valongo. Teve a duração de 119h horas (3,5h horas semanais), realizado à 3ªfeira de manhã entre 15/09/2015 a 14/06/2016. (tabela 3 do anexo A)

1.5. Estágio em Saúde Oral Comunitária

O Estágio em Saúde Oral Comunitária permitiu-me comunicar diretamente com crianças de forma a estimulá-las para a saúde e higiene oral. Foi monitorizado pelo regente Professor Dr. Paulo Rompante e teve como objetivo a implementação do Programa Nacional para a Promoção da Saúde Oral. Foi uma experiência bastante positiva na minha opinião. Considero que em conjunto com a minha binómia conseguimos passar a informação, ensinar e cativar as crianças para a importância da saúde e cuidados orais, da forma pretendida (através do nosso “Dentola” – imagem 1 do anexo A). Este Estágio realizou-se em escolas do concelho de Lordelo, durante 119 horas (3,5h semanais), à 4ª feira à tarde, no período compreendido entre 17/09/2015 e 15/06/2016. O plano de atividades de ESOC encontra-se nos anexos. (tabela 4 do anexo A)

ANEXO A

Este anexo inclui:

- ✓ Tabela dos atos clínicos do Estágio em Clínica Geral Dentária
- ✓ Tabela dos atos clínicos do Voluntariado em Clínica Geral Dentária
- ✓ Tabela dos atos clínicos do Estágio Hospitalar
- ✓ Plano de Atividades do Estágio Saúde Oral Comunitária
- ✓ Imagem – “O Dentola” (Actividade desenvolvida no âmbito do ESOC)

Estágio Clínica Geral Dentária

Procedimentos	Atos Clínicos
Triagem	5
Dentisteria	19
Endodontia	1
Destartarização	6
Exodontia	3
Outras	3
TOTAL	37

Tabela 1 - Atos Clínicos do Estágio em Clínica Geral Dentária

Estágio Voluntário de Verão

Procedimentos	Atos Clínicos
Dentisteria	1
Destartarização	1
Outras	1
TOTAL	3

Tabela 2 - Atos Clínicos de Estágio Voluntário de Verão

Estágio Clínica Hospitalar

Procedimentos	Atos Clínicos
Triagem	2
Dentisteria	27
Endodontia	11
Destartarização	24
Exodontia	46
Outros	11
TOTAL	121

Tabela 3 - Atos Clínicos do Estágio Hospitalar

Estágio Saúde Oral Comunitária

População-alvo	Proposta de ação
Crianças 0-5 anos	➤ Panfleto informativo para os pais quanto a cuidados na saúde oral.
Crianças 6-7 anos	➤ Apresentação de um jogo educativo e didático – “O Dentola” (Imagem 1) - com vista a despertar interesse quanto: -À higiene oral (escovagem dentária); -À patologia de cárie dentária;
Crianças 8-9 anos	-Às idas ao Médico Dentista para tratamento e prevenção de cárie dentária. ➤ Apresentação de um Power Point explicativo e ilustrativo dos cuidados com a saúde oral.
Crianças 8-9 anos	➤ Ainda: Jogo de perguntas com hipóteses de resposta, apresentado em Power Point, sobre o que foi ensinado no Power Point anterior, de forma a reforçar o que foi ensinado e perceber se a “mensagem” foi transmitida com sucesso, através de um pequeno debate.

Tabela 4 - Plano de Atividades do Estágio Saúde Oral Comunitária



Imagem 1 - "O Dentola"