

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

**Ana Isabel Entenza Soage**, estudante do Curso de Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste Relatório de Estágio intitulado: **Bioengenharia de Tecidos na Regeneração periodontal**. Confirmando que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio. Mas declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciados ou redigidos com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Relatório apresentado no Instituto Universitário de Ciências da Saúde.

Orientador: Professora Doutora Cristina Trigo Cabral.



## ACEITAÇÃO DO ORIENTADOR

Eu, **Cristina Trigo Cabral**, com a categoria profissional de Professora Auxiliar do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador do Relatório Final de Estágio intitulado **Bioengenharia de tecidos na regeneração periodontal**, da Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, **Ana Isabel Entenza Soage**, 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, 5 de julho de 2018

O Orientador



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela oportunidade de ter chegado até aqui, pela sua confiança e o seu amor incondicional. Ao meu irmão um exemplo de segurança, constância e superação.

Aos meus avós, pelo seu apoio e pelas suas doces palavras que nunca faltaram.

A minha orientadora, Professora Doutora Cristina Cabral, pelo seu tempo, disponibilidade e pela sua paciência, foi um prazer para mim tê-la como professora e como orientadora.

A todos os docentes da Instituição de ensino, que contribuíram para o enriquecimento dos meus conhecimentos durante este percurso.

A Rita, pela sua ajuda neste trabalho, por ser o meu ombro amigo durante todos estes anos.

A Mariana e a Luciana, pela sua amizade, pela sua ajuda ao longo do meu percurso e sobretudo pelas aulas de português.

Aos meus colegas e amigos, por permitir-me aprender mais da vida ao seu lado, em especial á Pauline, por tantas noites de estudo sem descanso, por partilhar e enriquecer cada troço, cada conquista e cada experiência.

Ao meu amor, pela sua infinita paciência e carinho, e sobretudo pelo seu apoio, por muitos anos mais.

*"Para ir adonde no se sabe, hay que ir por donde no se sabe"*

*San Juan de La Cruz*

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP: Proteína morfogenética óssea

BMSSCs: Células estaminais do estroma da medula óssea

C.M: Célula mãe

DSCs: "stem cells" dentárias

DFSCs: Células mãe do folículo dentário

DPPSCs: Células mãe pluripotentes da polpa dentária

DPSCs: Células mãe da polpa dentária

EMD: Proteínas de matriz do esmalte

ES: Linha celular embrionária humana

FGF: Fatores de crescimento de fibroblastos

GFSCs: Células mãe da mucosa oral

GTR: Regeneração tecidular guiada

MSC: Célula mãe mesenquimal

MSCs: Células estaminais mesenquimatosas

OFD: Debridamento por retalho aberto

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

PDL: Ligamento periodontal

PDLSC: Células mãe do ligamento periodontal

PRP: Plasma rico em plaquetas

SCAP: Células mãe da papila dentária

SHED: Células mãe de dentes decíduos esfoliados humanos

HGF: Fator de crescimento de hepatócito

IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina

## ÍNDICE GERAL

### CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO.....	3
2. OBJETIVOS.....	4
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	5
4. DISCUSSÃO.....	5
• 4.1. "Steam Cells" .....	6
○ 4.1.1. Tipos de "Steam Cells" .....	6
4.1.1.1. Clasificação das "steam cells" segundo a sua potencialidade.....	6
4.1.1.2. Clasificação das "steam cells" segundo a sua origem.....	7
○ 4.1.2. Tipos de "steam cells" dentárias (DSCs).....	9
○ 4.1.3. "Steam Cells" na regeneração periodontal.....	11
• 4.2. Matrizes/"Scaffolds" na engenharia de tecidos.....	12
○ 4.2.1. Características e funções das matrizes/"scaffolds" .....	13
○ 4.2.2. "Tecnología Cell Sheet" .....	14
○ 4.2.3. Biomateriais em bioengenharia periodontal.....	14
○ 4.2.4. Matrizes Multifásicas em bioengenharia periodontal.....	15
4.2.4.1. Tipos de matrizes multifásicas.....	16
• 4.3. Moléculas bioativas, fatores de crescimento e terapia genética na regeneração periodontal.....	19
○ 4.3.1. Tipos de fatores de crescimento.....	20
○ 4.3.2. Terapia genética na regeneração periodontal.....	23

- 4.4. Aplicações da bioengenharia de tecidos na prática clínica para a regeneração periodontal..... 24
  - 4.4.1. Regeneração Tecidual Guiada..... 24
  - 4.4.2. Proteínas da Matriz de Esmalte..... 24
  - 4.4.3. Plasma rico em Plaquetas..... 25
  - 4.4.4. Terapêutica de Proteínas Recombinantes..... 25
  
- 5. CONCLUSÃO..... 27
  
- 6. BIBLIOGRAFIA..... 29

## CAPÍTULO II

- 1. RELATÓRIO DAS ATIVIDADES PRÁTICAS DAS DISCIPLINAS DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO..... 33
  - 1.1. Estágio em Saúde Oral e Comunitária..... 33
  - 1.2. Estágio em Clínica Geral Dentária..... 34
  - 1.3. Estágio em Clínica Hospitalar..... 35
  - 1.4. Considerações finais sobre os estágios..... 35



## RESUMO

Com o passo dos anos, os periodontologistas têm procurado diferentes abordagens para reparar as diversas situações que surgem na perda do suporte periodontal. Estas terapias incluem uma variedade de procedimentos cirúrgicos e uso de determinados materiais.

Na atualidade, a regeneração periodontal considera-se biologicamente possível, mas clinicamente imprevisível. Como resultado da investigação, tem surgido uma série de técnicas clínicas que permitem o uso da engenharia de tecidos com o objetivo de conseguir uma regeneração e reparação mais adequada dos defeitos periodontais.

A bioengenharia de tecidos é um campo interdisciplinar que combina os princípios da Engenharia e da Biologia para o desenvolvimento de substitutos biológicos que possam restaurar ou melhorar a função de órgãos e tecidos.

Esta abordagem baseia-se em 3 componentes principais, "stem cells", "scaffolds" e fatores de crescimento. Todos estes elementos foram integrados dentro da investigação na área da periodontologia, ampliando novas perspectivas e caminhos na medicina regenerativa.

Palavras-chave: Engenharia tecidual, regeneração periodontal, matrizes, células mãe mesenquimais, biomateriais.

Key-words: Tissue engineering, periodontal regeneration, stem cells, scaffolds, biomaterials.

## ABSTRACT

Over the years, periodontists have sought different approaches to repair the various situations that arise in the loss of periodontal support. These therapies include a variety of surgical procedures and use of certain materials.

At present, periodontal regeneration is considered biologically possible, but clinically unpredictable. As a result of the investigation, a number of clinical techniques have emerged that allow the use of tissue engineering in order to achieve a more adequate regeneration and repair of periodontal defects.

Tissue bioengineering is an interdisciplinary field combining the principles of Engineering and Biology for the development of biological substitutes that can restore or enhance the function of organs and tissues.

This approach is based on 3 main components, "stem cells", "scaffolds" and growth factors. All these elements were integrated within the research in the area of periodontology, expanding new perspectives and paths in regenerative medicine.

## CAPÍTULO I

### 1. INTRODUÇÃO

As limitações clínicas das técnicas atuais na regeneração periodontal promovem a procura de novas tecnologias que ultrapassem a eficácia e previsibilidade dos tratamentos convencionais.

O reconhecimento de que os tecidos periodontais possuem a capacidade, para a reparação/regeneração tem promovido importantes esforços que se centram na compreensão das bases biológicas desta atividade e utilizam o conhecimento acumulado para criar uma tecnologia que promova previsível e funcionalmente a regeneração periodontal, quer dizer, a restauração de todos os componentes do periodonto e o restabelecimento das suas conexões apropriadas.

O termo "Engenharia de Tecidos" foi criado na *National Science Foundation* (NSF) de bioengenharia, em Washington DC, no ano 1987. A engenharia de tecidos é um termo muitas vezes usado em conjunto com a medicina regenerativa, unifica os campos das ciências da vida e da biotecnologia da engenharia, visa conseguir um processo de regeneração através do controlo do meio biológico e do desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido.<sup>1,2</sup>

A engenharia de tecidos envolve uma tríade composta por "stem cells" progenitoras, matrizes ou "scaffolds" para crescimento celular e fatores de crescimento, esta tríada encontra-se representada na figura 1.

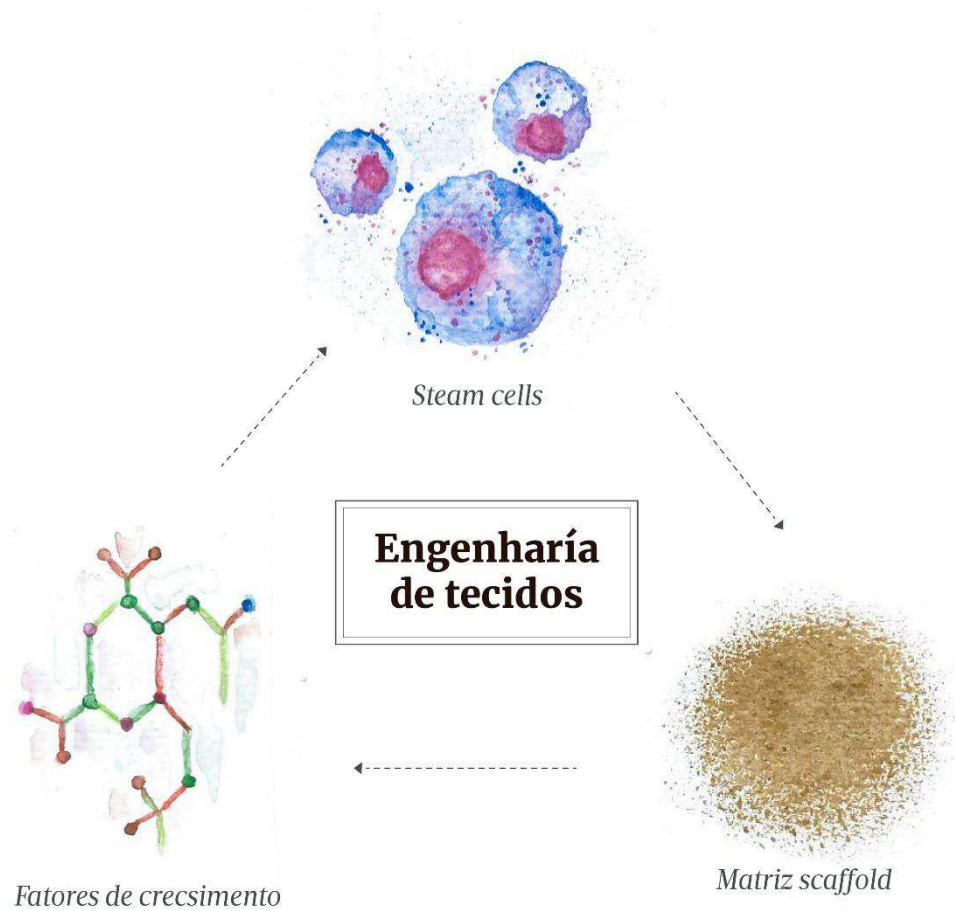


Fig.1-Tríade que envolve a engenharia de tecidos.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo desta revisão da literatura é reunir a informação mais relevante e atual no campo da engenharia de tecidos relacionada diretamente com a regeneração periodontal.

Neste estudo, pretende-se analisar os principais elementos que compõem a tríada da engenharia de tecidos ("stem cells", "scaffolds" e fatores de crescimento). Abordar as técnicas utilizadas na terapia e os principais materiais que promovem a recuperação dos tecidos, com o correspondente estudo do seu comportamento fisiológico e embrionário. Por último pretende-se reunir os avanços mais recentes na terapia regenerativa e as suas aplicações clínicas na atualidade.

### 3. METODOLOGÍA

A pesquisa bibliográfica foi realizada através do acesso online às bases de dados; *PubMed* (39 artigos), *Google Academic* (12 artigos) e *Researchgate* (41 artigos e 3 livros) com as "Key-words: Tissue engineering, periodontal regeneration, stem cells, scaffolds, biomaterials."

A pesquisa foi iniciada em novembro de 2017 e os artigos escolhidos foram publicados nos últimos 11 anos, desde 2006 até ao corrente ano 2018. Foram encontrados um total de 92 artigos e 4 livros, foram lidos os resumos dos artigos, cujos títulos estavam relacionados com o tema de trabalho.

Os critérios de inclusão foram os seguintes; a língua do artigo limitou-se especificamente à língua inglesa, portuguesa e espanhola. Fazendo referência à data de publicação dos artigos, foram seleccionados aqueles com as datas mais recentes, com o objetivo de reunir uma informação mais atual, cabe destacar que alguns artigos importantes e muito relevantes tinham datas mais antigas (um artigo do ano 1995). Por último baseei-me na relação dos mesmos com a medicina dentária, devido à quantidade de artigos que falam da medicina geral, uma grande quantidade centrava-se muito brevemente na área da medicina dentária, neste critério de inclusão a "key-word: periodontal regeneration" foi chave na pesquisa.

Foram assim seleccionados e analisados um total de 30 artigos e 2 livros.

### 4. DISCUSSÃO

#### 4.1. "STEM CELLS"

O termo "stem cell" apareceu pela primeira vez na literatura durante o século XIX. Como muitos outros termos na área da biologia, o conceito de célula mãe ampliou-se muito devido à identificação de novos locais e funções no organismo.

Quando se fala de "stem cell/células tronco/células mãe" faz-se referência a uma célula clonogénica (capaz de gerar um clone) e indiferenciada, que possui a capacidade de autorenovação e diferenciação em múltiplas linhas celulares.

Uma “stem cell” tem capacidade de propagar-se e de “gerar” “stem cells” adicionais, isto permite que uma população das mesmas possa diferenciar-se e comprometer-se na maturação através de múltiplas linhas celulares que acabam por produzir uma gama de tipos de células especializadas.

Nas condições adequadas estas células podem dividir-se indefinidamente, conservando sempre uma população estável de células mãe, com as condições e os estímulos adequados estas células podem seguir duas vias, ou submeter-se a autorenovação ou entrar no processo de diferenciação.<sup>1,2</sup>

#### 4.1.1 TIPOS DE “STEM CELLS”

Existem duas classificações para as “stem cells”, dependendo da sua potencialidade ou da sua origem.

##### 4.1.1.1. CLASSIFICAÇÃO DAS “STEM CELLS” SEGUNDO A SUA POTENCIALIDADE

A classificação das “stem cells” segundo a sua potencialidade é a seguinte:

1. TOTIPOTENTES, são um dos tipos mais importantes de “stem cells” devido ao seu potencial de transformar-se em qualquer célula que se encontre no corpo humano, podem dar origem a todos os tecidos embrionários. Fazem parte, o zigoto ou os tecidos extraembrionários que formam a placenta.<sup>2,3</sup>
2. PLURIPOTENTES, células embrionárias dos blastócitos, podem dar lugar a três tipos de camadas germinais no corpo (ectoderma, mesoderma e endoderma), como por exemplo as células que se encontram na massa dos blastócitos.<sup>2,3</sup>
3. MULTIPOTENTES, são células não especializadas que tem a capacidade para autorenovar-se e diferenciar-se em células especializadas com funções específicas. As “stem cells” adultas multipotentes são consideradas pelo seu potencial de especialização, que se limita a uma ou mais linhas celulares procedentes da mesma

camada embrionária. Alguns exemplos são as células da medula óssea, células neuronais e células sanguíneas.<sup>2,3</sup>

A Figura 2 esquematiza a classificação das “stem cells” acorde com a sua potencialidade.

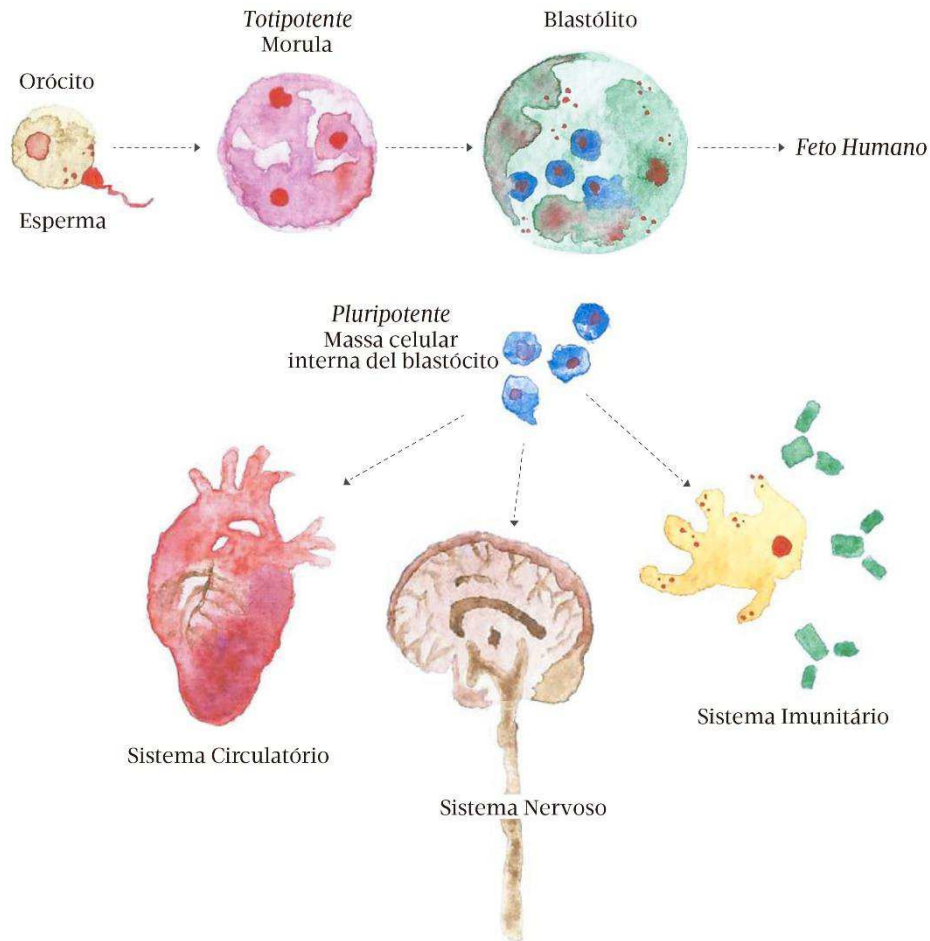


Fig.2 - Processo de diferenciação das “stem cells” segundo a sua potencialidade. Imagem adaptada de Jones M, The source of pluripotent stems cells from developing embryos.<sup>31</sup>

#### 4.1.1.2. CLASSIFICAÇÃO DAS “STEM CELLS” SEGUNDO A SUA ORIGEM

Dependendo da sua origem, as “stem cells” podem ser divididas em duas categorias:

##### A. “STEM CELLS” EMBRIONÁRIAS

No ano 1998, Thomson e colaboradores obtiveram a primeira linha celular embrionária humana (ES) a partir da massa celular interna de embriões em fase de blastocistos de 4 a 7 dias, doados por casais que foram submetidos a tratamentos de fertilidade.<sup>3</sup>

As células embrionárias são células pluripotentes com capacidade e potencial de diferenciar-se em qualquer tecido celular das três camadas embrionárias.

Até à data, o uso de células tronco embrionárias para terapias clínicas é considerado como novo. Atualmente, as células ES humanas não foram testadas quanto à sua capacidade de participar do desenvolvimento embrionário humano *in vivo* ou contribuir com linhas germinativas, já que este desenvolvimento foi prejudicado por causa de razões éticas.<sup>3</sup>

#### B. "STEM CELLS" ADULTAS E CÉLULAS ESTAMINAIS MESENQUIMAIS

As "stem cells" adultas, também conhecidas como células estaminais somáticas, são células indiferenciadas encontradas em tecidos e órgãos especializados.

Comparadas com a natureza pluripotente e quase imortal das células estaminais embrionárias, as células estaminais adultas são mais maduras, com uma vida definida e apenas uma capacidade de diferenciação multipotente.

Parece que todos os tecidos especializados com capacidade de renovação ao longo da vida contêm células estaminais adultas em um número muito pequeno que provavelmente ajudam a reabastecer a perda celular durante o processo natural de envelhecimento ou lesão nos tecidos.

As células estaminais hematopoéticas da medula óssea foram o primeiro tipo de células estaminais adultas a ser identificado. Ao longo dos anos, essas células foram amplamente estudadas e atualmente são usadas terapeuticamente. Outra população de células tronco não hematopoéticas adultas também reside no microambiente da medula óssea.

Estas são denominadas células estaminais do estroma da medula óssea (BMSSCs) ou células estaminais mesenquimatosas (MSCs) e suas propriedades biológicas são menos compreendidas.<sup>3</sup>

Nos últimos anos, as MSCs humanas foram identificadas em muitos tecidos em todo o corpo adulto. No entanto, a fonte primária de MSCs é a medula óssea onde existem em baixa



frequência (1 por 34.000 células nucleadas), as quais diminuem com a idade. Populações de células tipo MSC também foram identificadas em outros tecidos, incluindo tecido adiposo, músculos, sangue periférico, pâncreas fetal e fígado.<sup>3,4</sup>

A natureza heterogênea dessas células é destacada em estudos clonais que demonstram diferenças funcionais entre MSCs, com base nos seus potenciais proliferativos e capacidades de desenvolvimento *in vitro* e *in vivo*.

Particularmente a característica distintiva das MSCs é a sua capacidade de formar colônias (são clonogênicas), além disso, também as suas condições de produção não-especializadas, já que podem diferenciar-se de muitas outras, incluindo osteoblastos, adipócitos, estroma mielossupressor, condrócitos e células neuronais.

A capacidade dos MSCs para dar origem a múltiplos tipos de células especializadas, juntamente com a sua distribuição extensiva em muitos tecidos adultos (incluindo os tecidos dentários) tornaram-nas um alvo atraente para uso em regeneração periodontal.<sup>4</sup>

#### 4.1.2.. "STEAM CELLS" DENTÁRIAS (DSCs):

As "steam cells" dentárias (DSCs) são populações semelhantes a MSC com capacidade de auto-renovação e potencial de multidiferenciação. As MSCs dentárias podem ser isoladas de diferentes tecidos de origem dentário, os quais são observados na figura 3.

- As *células-tronco da polpa dentária (DPSCs)* foram as primeiras células tronco dentárias humanas isoladas. Foram extraídas do tecido de polpas dentárias de terceiros molares, e depois caracterizadas em relação às células tronco mesenquimais da medula óssea.
- Mais tarde, foram descobertos outros tipos de DSCs, como *as células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (SHED)*, estas células são capazes de se diferenciar numa variedade de tipos celulares numa maior extensão que as DPSCs. A capacidade das SHED de diferenciar-se em células angiogênicas para a indução de estas células é considerado importante na regeneração de tecido conjuntivo.

- As *células-tronco da papila apical (SCAP)*, são células que residem na papila de dentes permanentes com raízes maduras, apenas presente durante o desenvolvimento da raiz.
- As *células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs)* estão associadas a regeneração e homeostasia devido a presença de células estaminais multipotentes. Podem obter-se através do isolamento de raízes de dentes extraídos.
- As *células precursoras do folículo dental (DFPCs)* são células progenitoras mesenquimais, isoladas a partir do folículo dentário de terceiros molares humanos, podem gerar um tecido semelhante ao ligamento periodontal, o que implica que podem ser úteis para a terapia periodontal regenerativa.
- As *células estaminais do tecido gengival (GFSCs)* são células da gengiva e mucosa alveolar. Estas células são altamente proliferativas e contêm células mãe. A sua capacidade antiinflamatória permite que melhore o seu papel na regeneração.

No entanto, resta determinar qual é a fonte de células-tronco mesenquimais dentárias mais adequada para a terapia regenerativa. Esta perspectiva representa um passo a frente no desenvolvimento de uma terapia biológica mais previsível para o periodonto.<sup>1,5,6</sup>

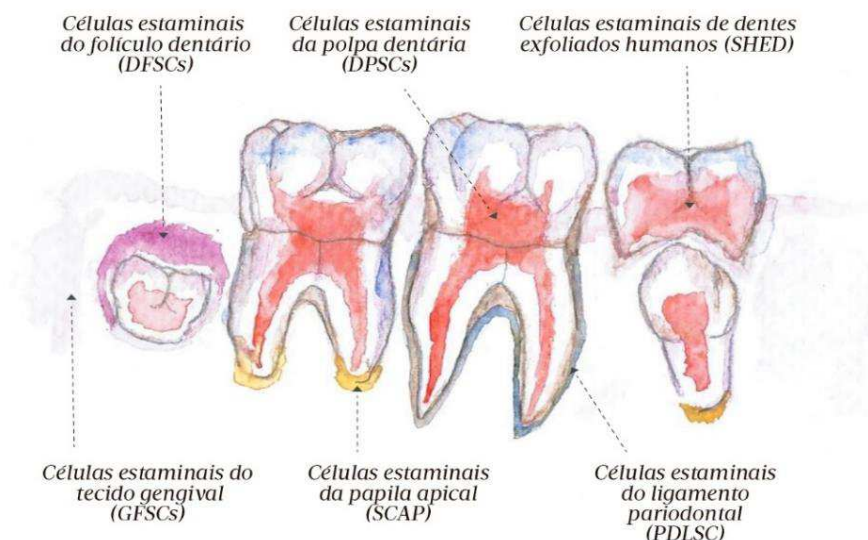


Fig.3. - Origem dos diferentes tipos de DSCs. Imagem adaptada de Paul T. Sharpe<sup>32</sup>

Estes cinco tipos de DSCs têm uma multipotência de diferenciação, tais como osteogênicos, odontogênicos, dentinogênicos, cimentogênicos, adipogênicos, condrogênicos, miogênicos e neurogênicos. Além disso, os DSCs parecem manter propriedades multipotentes após a criopreservação a curto e longo prazo.<sup>6,7</sup>

#### 4.1.3. "STEAM CELLS" NA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

A medicina regenerativa substitui ou regenera células, tecidos ou órgãos humanos, para restaurar ou estabelecer a função normal do organismo.

A engenharia de tecidos, como já foi dito anteriormente, envolve uma tríada composta por "stem cells" progenitoras, matrizes/"scaffolds" para crescimento celular e fatores de crescimento.

O sucesso clínico da bioengenharia depende da compreensão de como controlar influências desfavoráveis durante a regeneração, como os eventos inflamatórios crônicos, o controle de infecções bacterianas e a redução da lesão tecidual durante qualquer intervenção cirúrgica reparadora.<sup>8</sup>

Na atualidade, os MSCs são o foco de estudos intensivos a nível mundial, analisá-los e compreendê-los permitiria desenvolver terapias com base em células mãe para tratar várias doenças, mas é preciso uma investigação mais profunda com o objetivo de determinar a eficácia das células estaminais expandidas *ex vivo* na regeneração periodontal.

As "stem cells" têm a notável capacidade de administrar citocinas localmente, promovendo processos regenerativos e proporcionando o equilíbrio entre degeneração tecidual e regeneração. Além disso, as células-mãe também podem atuar com efeito parácrino, o qual é o mecanismo predominante responsável para a potenciação da reparação das feridas. Ditos efeitos parácrinos podem dividir-se em tróficos, imunomoduladores, anti-cicatrizantes e quimioatraentes.

Os PDLSCs apresentam capacidade para formar estruturas semelhantes ao cemento radicular e ao ligamento periodontal. No entanto, essas células são heterogêneas devido à sua capacidade de proliferar e se diferenciar nas células formadoras de tecido periodontal,

são necessários mais estudos para investigar como as células-tronco atuam no processo de regeneração.

Outras populações de células, como BMSSCs, SHEDs e células precursoras do folículo dental humano de dentes do siso DFPCs podem ser, no futuro, modificadas geneticamente *in vitro*, para que possam se diferenciar em células do tecido periodontal antes de serem transplantadas *in vivo*.

Abordagens subsequentes de engenharia de tecidos podem então ser desenvolvidas usando essas células progenitoras dentro de uma estrutura de matriz, juntamente com a introdução de várias moléculas de sinalização em uma sequência temporal e espacial ordenada.<sup>8,9</sup>

## 4.2. MATRIZES / “SCAFFOLDS” NA ENGENHARIA DE TECIDOS

O termo “scaffold” serve para referir-se a um biomaterial que funciona como estrutura de suporte. As matrizes ou “scaffolds” são estruturas biocompatíveis que permitem a adesão celular e que induzem os processos de proliferação e diferenciação sem desencadear nenhuma resposta de inflamação ou rejeição do corpo/organismo.

Esta matriz é utilizada como uma plataforma biológica que facilita a correção e a restauração apropriada das características fisiológicas/histológicas de tecidos lesados durante o processo de regeneração. É uma abordagem revolucionária emergente na medicina, já que fornece tecido vivo, estimulando o processo de cura natural do corpo e ativa a capacidade do corpo de reparar e regenerar.

Um “scaffold” 3D bioativo adequado é fundamental na engenharia de tecidos, e portanto, para a regeneração periodontal. Este “scaffold” consiste numa estrutura artificial capaz de suportar a formação de tecido em três dimensões, com um revestimento de materiais bioativos, de modo a permitir uma melhor interação com o organismo e promover a adesão celular, são usados para entregar células, fármacos e genes no corpo. Desempenha um papel muito importante no processo de regeneração dos tecidos.<sup>10</sup>

### 4.2.1. CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES DE UMA MATRIZ

O “scaffold” permite reforçar estruturalmente o defeito para manter a forma do mesmo, tem como função estabelecer uma barreira com o objetivo de evitar a infiltração dos tecidos circundantes que podem impedir o processo de regeneração.

Antes da sua absorção o “scaffold” pode servir como matriz para a adesão celular endógena e exógena, e também serve para facilitar a regulação de certos processos celulares, inclusive a mitose, a síntese e a migração celular.<sup>11</sup>

Na figura 4 se recolhem os principais requisitos que tem que ter uma matriz.<sup>11</sup>

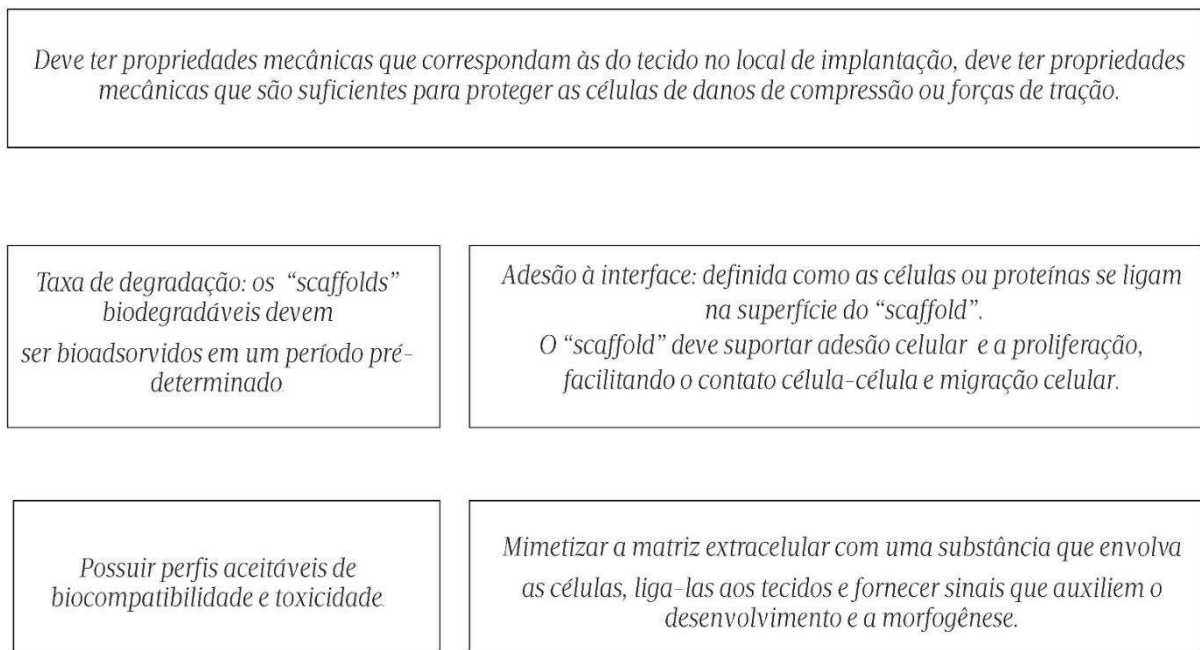


Fig 4. - Características de uma matriz.

#### 4.2.2. TECNOLOGIA “CELL SHEET”

“Poly (N-isopropylacrylamide) (PIPAAm)” é um polímero sintético sensível a temperatura que permitirá a adesão celular ou o desapego sobre a sua superfície dependendo da temperatura do ambiente.

Esta tecnologia é uma nova abordagem que traz certas vantagens em relação ao processo regenerativo.

A técnica de folhas celulares ou "*cell sheet*", foi utilizada pela primeira vez num ensaio clínico para reconstrução da córnea em 2003. Desde então, vários ensaios clínicos foram realizados.

A tecnologia chave da "Folha de Células" consiste em um polímero sintético que reacciona à temperatura (poli-isopropilacrilamida), cujas características mudam de hidrofóbica para hidrofílica, alterando a temperatura. Este processo permite a colheita das lâminas celulares, evitando enzimas proteolíticas (como a tripsina), preservando assim a estrutura das proteínas da membrana celular que medeiam a adesão, principalmente a laminina 5 e a E-caderina.

Este polímero inteligente é covalentemente enxertado na superfície das placas de cultura celulares, onde as células podem ser colocadas em proliferação. A redução da temperatura abaixo de 32° C faz com que essa superfície se hidrate; portanto, as células confluentes desprendem-se da superfície como uma folha. Este processo permite a colheita das lâminas celulares, evitando enzimas proteolíticas (como a tripsina), preservando assim a estrutura das proteínas da membrana celular que medeiam a adesão, principalmente a laminina 5 e a E-caderina.

A tecnologia "Cell Sheet" está a ser utilizada em ambientes clínicos, porque a estabilidade das células no local do transplante é relativamente alta em comparação com a injeção de células.

Embora a espessura das folhas celulares seja inferior a 50 µm, a tecnologia de multicamadas das folhas celulares pode permitir que a produção de um volume e resistência suficientes seja de valor clínico. De fato, o tecido prevascularizado foi criado com sucesso *in vitro*<sup>12,13</sup>

Embora haja uma limitação da fonte celular, as células-mãe embrionárias e as células-mãe pluripotentes induzidas têm um potencial para superar o problema do número insuficiente de células para procedimentos regenerativos.<sup>13</sup>

#### 4.2.3. BIOMATERIAIS EM BIOINGENHARIA PERIODONTAL

Entre os biomateriais mais utilizados foram os polímeros naturais (cerâmicos e combinações dos anteriores) ou os polímeros sintéticos (como "Polyglycolic Acid" (PGA), "Polylactic Acid" (PLA), entre muitos outros).

- A. POLÍMEROS NATURAIS; Colágeno, Fibrina, Alginato, Gelatina, Chitosán.
- B. POLÍMEROS SINTÉTICOS; PLGA, Polietilenglicol, Policaprolactona.
- C. CERÁMICOS; Fosfatos cálcicos, Sulfatos cálcicos, Cristais bioativos.
- D. HÍBRIDOS.

Na seleção de biomateriais, a adesão celular é um requisito básico para estimular a proliferação celular *in vitro*. Embora muitos biomateriais sejam projetados para inibir a proliferação e estimular diferenciação de células, devido à maturação do tecido, este é um dos principais objetivos dos "scaffolds" para engenharia de tecidos.

Estes materiais devem ser biodegradáveis, permitindo uma substituição gradual por tecido regenerado, livre de doença transmissível e imunologicamente inerte. Não pode induzir uma resposta inflamatória exagerada.<sup>14</sup>

Existem várias técnicas que tem sido usadas para processar bio-polímeros degradáveis em estruturas porosas 3-D. Os métodos convencionais incluem filtros de fibra, colageneo de fibras, moldagem por fusão, fundição por solvente / lixiviação de partículas, formação de espuma em gás / lixiviação de partículas, separação de fases e processamento por alta pressão.

A eletrofição também foi utilizada na produção de uma matriz nanofibrosa 3D, e as tecnologias de prototipagem rápida permitiram o fabrico de forma livre, sólida e direta de um modelo de projeto assistido por computador CAD/CAM.<sup>15</sup>

#### 4.2.4. MATRIZES MULTIFÁSICAS EM BIOENGENHARIA PERIODONTAL

Os "scaffolds" multifásicos devem desempenhar várias funções, o apoio a colonização celular, migração, crescimento e diferenciação. Um fator importante é o requisito para facilitar a revascularização na engenharia de tecidos após a implantação *in vivo*. Nos "scaffolds" também devem considerar-se as propriedades físico-químicas, a morfologia e a cinética de degradação.

Independentemente do material ou da anatomia espacial utilizados nas técnicas tradicionais de fabrico de matrizes, estas não representam adequadamente a complexidade dos múltiplos tecidos constituintes do periodonto e não reproduzem adequadamente a anatomia da área do defeito.

O tamanho externo e a forma da construção são importantes, especialmente se o “scaffold” se personaliza para um paciente individual. Os prototipos clinicamente exitosos deveriam estimular e apoiar o início e a continuação do crescimento interno do tecido, assim como a posterior remodelação e maturação ao proporcionar uma rigidez ótima e formas geométricas externas e internas.

Estes prototipos precisam de ser fabricados para replicar exatamente a anatomia e forma da área do defeito para permitir o subministro de células e a neovascularização enquanto se mantem o espaço para o tecido e posterior regeneração.<sup>15,16</sup>

Por isso, são necessárias novas perspectivas que permitam sintetizar matrizes avançadas, as quais consigam cumprir as necessidades da adaptação biológica, funcional e espacial. Nestas situações, foi proposto que a integração do tecido *in vivo* poderia ser conseguida utilizando um desenho de matriz “avançado” que facilitara a regeneração da arquitetura original do tecido mole/duro. O desenho e a fabrico por (CAD/CAM) revolucionou o processamento das matrizes 3D para bioengenharia de tecidos. Mediante “softwares” específicos e técnicas de impressão tridimensional é possível criar “matrizes multifásicas” com características predeterminadas que reproduzem fielmente a geometria e a composição desejadas.

Além disso, é importante perceber que o crescimento do tecido não equivale a maturação e remodelação do tecido, e um defeito preenchido com tecido imaturo não deve ser considerado “regenerado”. Assim, muitas estratégias baseadas no “scaffold” falharam no passado, pois a degradação apareceu mais rápido do que a remodelação ou maturação tecidual. É importante que o “scaffold” permaneça intato enquanto o tecido matura nos poros da matriz.<sup>16</sup>

As matrizes multifásicas podem trabalhar em conjunto com abordagens regenerativas periodontais já utilizadas, como regeneração tecidual guiada (GTR) e moléculas bioativas, bem como abordagens baseadas em células progenitoras, para otimizar os resultados



regenerativos. Em resumo, as principais considerações para os “scaffolds multifásicos” na bioengenharia de tecidos periodontais estão apresentadas na figura 5.

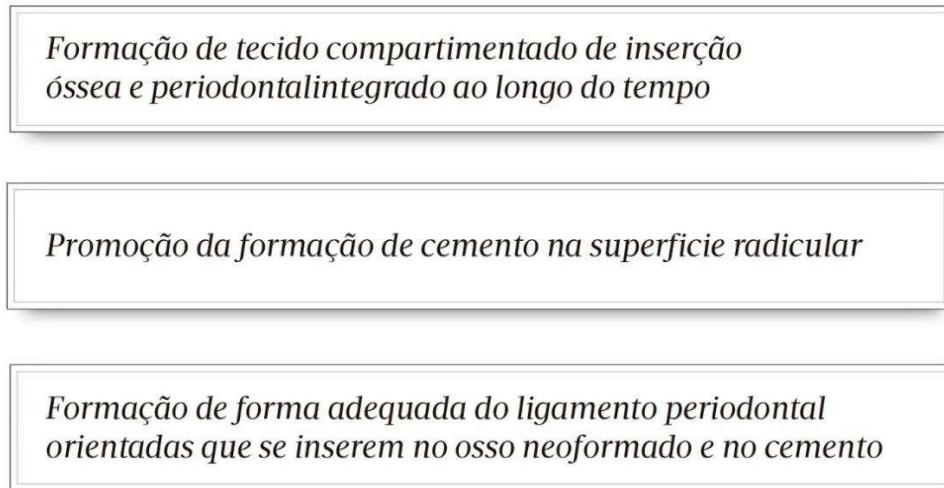


Fig 5. - Características dos “scaffolds multifásicos” para a bioengenharia periodontal.

#### 4.2.4.1. TIPOS DE MATRIZES MULTIFÁSICAS

##### ➤ MEMBRANA GBR MODIFICADA COM COMPARTIMENTO ÓSSEO

Estrutura semi-rígida de *biomaterial PLGA (ácido polilactídeo-co-glicolídeo) + CaP (fosfato de cálcio)*, dita membrana tem uma barreira externa contínua obtida por fundição de um solvente e um componente topograficamente complexo e poroso, fabricado por vazamento de solvente/lixiviação de açúcar. Esta abordagem baseia-se na osteocondutividade do material de fosfato de cálcio e nas propriedades de manutenção do espaço da estrutura PLGA porosa para produzir a regeneração periodontal.

Depois de diversos estudos (experimentais em animais) os autores observaram que a estrutura de PLGA + CaP de camada dupla tinha as propriedades favoráveis para impedir o colapso do tecido no defeito e reter o coágulo sanguíneo por todo o defeito bucal.

Esta abordagem de construção bicamada representa uma modificação da técnica GTR tradicional, em que a estrutura atua tanto como uma barreira quanto um mantenedor de espaço, mas apesar desses resultados iniciais promissores, os autores observaram que o periodonto não estava bem regenerado nas regiões mais coronais do defeito.<sup>17,18</sup>

Desta forma chegou-se a hipótese de que a propriedade de manutenção do espaço da construção de camada dupla diminuiu com o tempo, à medida que a matriz se degrada gradualmente. Isto permitiu descobrir e confirmar a importância da seleção apropriada do material, foi demonstrado que um polímero que sofre degradação *in vivo* mais lenta, pode ser mais adequado para a regeneração periodontal<sup>17,18</sup>

Mais recentemente, uma abordagem similar de “membrana bicamada” foi relatada, consiste em uma matriz fabricada com uma combinação de amidas e um polímero de degradação mais lenta (policaprolactona [PCL]).

Semelhante a outras estratégias utilizadas, a fase externa da construção bicamada foi projetada como uma membrana oclusiva para impedir que o tecido mole circundante invadisse o defeito periodontal, enquanto a fase interna era fabricada por fiação húmida, criando uma estrutura altamente porosa com tamanho de poro macroscópico adequado para regeneração óssea.

Embora este suporte de camada dupla não tenha sido utilizado num modelo *in vivo*, a avaliação *in vitro* demonstrou que o compartimento ósseo suportava a proliferação celular e os genes relacionados com a formação de osso foram regulados positivamente quando o esqueleto estava funcionalizado com grupos silanol.<sup>18</sup>

#### ➤ MATRIZES BIFÁSICAS COMPARTIMENTALIZADAS

A regeneração do periodonto envolve que o ligamento periodontal neoformado, presente uma orientação específica das suas fibras, que se encontre incorporado ao osso alveolar e ao cimento e que realize a sua função biomecânica de forma adequada.

Para reproduzir esta complexa organização biológica, foram desenvolvidos modelos de matrizes multifásicas para terapia celular com sistemas de compartimentos específicos para o ligamento periodontal e para o osso.<sup>18</sup>

Uma das técnicas neste tipo de matrizes, consistia na utilização de construções de ácido PCL-poliglicólico para controlar a orientação das fibras e facilitar a morfogênese do complexo de tecido periodontal.

Essa abordagem utilizou uma arquitetura de matriz multicompartimental usando o projeto de matriz computarizada e o fabrico por impressão de cera tridimensional. Nestes estudos, os "scaffolds" foram semeados com células transduzidas com a proteína morfogenética óssea murina codificadora de adenovírus recombinante 7 (AdBMP-7).<sup>18</sup>

➤ MATRIZES BIFÁSICAS COMPARTIMENTALIZADAS COM "FOLHAS CELULARES" (CELL SHEETS).

Na abordagem deste tipo de matrizes, o compartimento ósseo foi confeccionado através da modelagem de deposição fundida que foi utilizada para regeneração óssea, embora para uma aplicação diferente.

O compartimento periodontal foi composto por uma membrana de solução eletromagnética, com o objetivo de facilitar a "liberação" de lâminas celulares PDL, permitindo assim obter uma ancoragem adicional e suporte para aumentar a estabilidade das células. Este aumento na estabilidade biomecânica do tecido diminui o risco de comprometer a regeneração do complexo periodontal.

Em resumo, o uso de matrizes bifásicas permitiu corrigir alguns dos problemas da utilização da tecnologia de "folhas celulares", melhorando o manuseamento e incrementando a sua estabilidade biomecânica sobre a dentina da superfície radicular.<sup>12,20</sup>

➤ MATRIZES TRIFÁSICAS COMPARTIMENTALIZADAS.

Este tipo de matrizes imitam a estrutura dos três componentes que formam o aparelho de inserção periodontal, através de biomateriais compostos PCL-hidroxiapatita, com uma microarquitetura específica de micro canais de distinto diâmetro para cada um dos três compartimentos.

Em cada um dos compartimentos, colocou-se um tipo de célula mesenquimal e se incorporou uma proteína específica para induzir a diferenciação em osso, cemento e ligamento periodontal. A implantação subcutânea da matriz em ratos imunodeprimidos manifestou a formação das três microestruturas periodontais diferenciadas com fibras de Sharpey polarizadas e inseridas no tecido cementóide e tecido osteóide neoformado.<sup>18,19</sup>

### 4.3. MOLÉCULAS BIOATIVAS, FATORES DE CRESCIMENTO E TERAPIA GENÉTICA NA REGENERAÇÃO PERIODONTAL.

As moléculas bioativas, os fatores de crescimento junto com a terapia genética constituem a última parte da tríade na bioengenharia de tecidos. Existem diferentes formas para conseguir a liberação de moléculas que estimulam o processo regenerativo.

Os agentes atuam como “moléculas de sinalização” as quais interacionam com a matriz extracelular e com determinados receptores da superfície celular que estão envolvidos na expressão genética e na proliferação e diferenciação celular. As moléculas de sinalização são proteínas que podem agir local ou sistemicamente para fomentar o crescimento e a função das células de diferentes formas.

Os dois tipos de moléculas sinalizadoras mais importantes são os fatores de crescimento e os morfogênicos, que atuam alterando o fenótipo celular, provocando a diferenciação de células estaminais em células formadoras de osso um processo conhecido como osteoindução.<sup>20</sup>

Essas citocinas têm efeitos pleotrópicos, algumas das quais incluem:

- Mitogênico (proliferativo)
- Quimiotático (estimular a migração dirigida de células)
- Efeitos angiogênicos (estimulam a formação de novos vasos sanguíneos).

Os fatores de crescimento atuam nos receptores da membrana celular externa de uma célula-alvo, fornecem assim um sinal para as células mesenquimais e epiteliais locais, que provoca processos celulares como migração, divisão e aumento da síntese de matriz.<sup>20</sup>

#### 4.3.1. FATORES DE CRESCIMENTO.

O fator de crescimento que mais atenção recebeu na cicatrização de feridas de tecidos duros e moles é o fator de crescimento derivado de plaquetas, mas existem vários fatores potenciais de crescimento.

#### ❖ FATOR DE CRESCIMENTO DERIVADO DE PLAQUETAS

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é a hormona natural de cicatrização. É produzido de forma natural pelo organismo em locais de tecido mole e lesão óssea. Foi descoberto por Lynch e colegas no final dos anos 80.<sup>20</sup>

O PDGF secretado pelas plaquetas desempenha um papel importante na fase inicial do processo de cicatrização, já que fomenta a revascularização. Uma pequena proporção de PDGF no coágulo, é suficiente para gerar atividade de diferenciação, mitótica e cicatrização.<sup>20</sup>

Alguns autores aplicaram PDGF-BB (fator de crescimento derivado de plaquetas com dois ligandos BB) para promover a migração e proliferação de fibroblastos no ligamento periodontal. Demonstraram que o PDGF tem a capacidade de estimular a formação óssea e a regeneração periodontal *in vivo* e indicam que este fator de crescimento é promissor como um importante adjuvante para a cirurgia periodontal.<sup>21</sup>

#### ❖ FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é um agente quimiotático potente para as células endoteliais vasculares, que resulta no aumento da neovascularização.

Também estimula a mitose de muitas células *in vitro*, como fibroblastos, osteoblastos e condróblastos.

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 é encontrado com valores consideráveis nas plaquetas e é liberado durante a coagulação, juntamente com os outros fatores de crescimento.

Um grupo de autores demonstraram que o IGF-I *in vitro* aumentou substancialmente a sobrevivência celular no fibroblasto do ligamento periodontal em comparação aos fibroblastos gengivais pela regulação positiva das moléculas anti-apopticas e pela regulação negativa das moléculas pró-apoptóticas.<sup>20,21</sup>

#### ❖ FAMÍLIA DE FATORES DE CRESCIMENTO TRANSFORMADORES

Entre esses polipeptídeos/sinais, o fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF $\beta$ ) é particularmente importante. Os TGF- $\beta$  1–3 são fatores de crescimento multifuncionais eles

estão presentes apenas em mamíferos, principalmente secretados como complexos latentes e imediatamente armazenados na matriz extracelular.

O complexo TGF- $\beta$  funciona como um sensor molecular que responde a perturbações ambientais liberando um ligante ativo de TGF- $\beta$ , para promover ou inibir a proliferação. A ativação de TGF- $\beta$  no lugar certo na hora certa é necessário para recrutar células tronco para participar no processo de regeneração/remodelação dos tecidos.<sup>22</sup>

Mais concretamente, o processo de consolidação óssea é iniciado por uma única espécie molecular de proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), membros da superfamília do fator transformador do crescimento (TGF) -beta, como BMP-2 ou BMP-7, coloca em movimento uma cascata de eventos celulares resultando em diferenciação de células progenitoras em fenótipos envolvidos na regeneração periodontal.<sup>23</sup>

Dados atuais sugerem que BMP-2, BMP-4, BMP-7 (ie, proteína osteogênica-1, OP-1) e BMP-12 são indutores potentes da formação óssea durante a reconstrução mandibular, com OP-1 (ocasionalmente BMP-2 ) induzindo cementogênese substancial.

Considerando os resultados de estudos que indicam que a aplicação de BMP-2 humana recombinante em torno de um defeito periodontal induz a formação óssea, mas não a formação de cimento, o uso combinado de BMP-2 e BMP-7 pode ser adequado para regenerar dois tecidos: osso e cimento.<sup>23</sup>

#### ❖ FAMÍLIA DE FATORES DE CRESCIMENTO DE FIBROBLASTOS

Os fatores de crescimento de fibroblastos são os membros da família de fatores de crescimento de ligação heparina.

As duas formas mais cuidadosamente caracterizadas são: FGF básico (bFGF) e FGF ácido (aFGF).

Ambos aFGF e bFGF são proteínas de cadeia única que são derivadas proteoliticamente de diferentes moléculas precursoras para gerar proteínas biologicamente ativas de 15.000  $\mu$ , peso molecular.<sup>24</sup>

Promovem a proliferação e ligação de células endoteliais e células PDL no processo de cicatrização de feridas. Sabe-se que o FGF-2 atrai mais células epiteliais do que o FGF-1.

Num ensaio clínico randomizado recente foi avaliada a resposta terapêutica a doses variáveis de FGF-2 (bFGF). Eles demonstraram um aumento significativo na altura do osso alveolar ao usarem FGF-2 a 0,3%.

Num outro estudo foi examinada a eficiência da aplicação tópica de FGF-2 na regeneração periodontal em defeitos ósseos cirurgicamente criados. Os defeitos classe II de furca representados em primatas, permitiu concluir que uma aplicação tópica de FGF-2 pode aumentar consideravelmente a regeneração periodontal.<sup>24</sup>

#### ❖ FATOR DE CRESCIMENTO DE HEPATÓCITO

O fator de crescimento de hepatócito (HGF) é uma proteína segregada de ligação de glicosaminoglicano com sulfato de heparina. O HGF demonstrou ter efeitos mitogênicos nos osteoblastos; participando assim do processo de remodelação óssea.

Num estudo foram cultivados fibroblastos em meio de cultura celular contendo HGF, foi concluído que eles produziram uma boa proliferação celular e liberação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Os resultados sugerem que se pode fornecer uma nova ferramenta para o tratamento da recessão gengival.<sup>25</sup>

#### ❖ PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são os membros da superfamília do factor de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que desempenham um papel crucial no crescimento e diferenciação celular. Eles são um grupo de proteínas relacionadas que são conhecidas por possuírem a capacidade única de induzir a formação de cartilagem e osso.

As proteínas desencadeiam efeitos celulares por meio de receptores heterotetraméricos de serina/treonina quinase e proteínas de sinalização intracelular conhecidas como pequenas decapentaplégicas (Smads).

As BMPs, como PDGF, desempenham um papel na formação de vasos sanguíneos. Também desempenham um papel importante na atividade angiogênica regulando positivamente os peptídeos angiogênicos como o VEGF, podem se ligar às células endoteliais e estimular a migração e promover a formação de vasos sanguíneos.

A propriedade marcante do BMP é o fator de diferenciação. BMP pode diferenciar uma célula mesenquimal indiferenciada em um osteoblasto. Em contraste, o PDGF é um fator quimiotático e mitogênico para precursores semelhantes aos osteoblastos.<sup>25</sup>

#### 4.3.2. TERAPIA GENÉTICA NA REGENERAÇÃO PERIODONTAL

Atualmente tem surgido inúmeros trabalhos na liberação das moléculas de sinalização é a terapia genética, a qual se baseia na engenharia genética, que envolve técnicas moleculares para introduzir, suprimir ou manipular genes específicos, dirigindo as próprias células do indivíduo para produzir um agente terapêutico.

A terapia genética pretende otimizar a administração de agentes como os fatores de crescimento aos defeitos periodontais, de modo que as limitações associadas à aplicação tópica (por exemplo, curta duração de ação) possam ser superadas.<sup>25,26</sup>

Duas das estratégias principais (na terapia génica) “transgenes” em receptores humanos são:

- (1) Infusão directa do gene de interesse utilizando vectores virais ou não virais *in vivo*. Nesta abordagem, os plasmídeos de DNA são introduzidos diretamente em sítios desejados. Estes genes são recebidos pela célula hospedeira e começam a produzir a proteína codificada com fins terapêuticos.
  
- (2) Na abordagem *ex vivo*, uma população específica de células (por exemplo, células PDL) obtida a partir de tecidos, seguida de transferência de genes nestas células em condições *in vitro*. Estes genes codificados são posteriormente transferidos de volta para defeitos periodontais. Resultando assim, na manipulação genética seletiva do tipo celular desejado e na regeneração dos respectivos tecidos perdidos.

O uso de estratégias de entrega de genes *in vivo* e *ex vivo* via adenoviral codificam moléculas promotoras do crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7), os quais foram investigados por seu potencial na regeneração periodontal.<sup>25,26</sup>



As células podem oferecer uma alternativa aos métodos convencionais, porque as células-mãe têm o potencial de fornecer uma fonte sustentada de fatores de crescimento para a regeneração.

No entanto, muito trabalho ainda é necessário para otimizar o número de células que são transduzidas viralmente para expressar genes específicos, a fim de maximizar a duração e a extensão do gene.<sup>26</sup>

#### 4.4. APLICAÇÕES DA BIOENGENHARIA DE TECIDOS NA PRÁTICA CLÍNICA PARA A REGENERAÇÃO PERIODONTAL.

##### 4.4.1. REGENERAÇÃO TECIDULAR GUIADA

A GTR envolve a colocação de uma membrana sobre um defeito ósseo contido durante a cirurgia. A aplicação de membranas como barreira sobre a superfície de uma raiz desnudada e um defeito periodontal debridado, mostrou disposição espacial, exclusão de tecido conjuntivo gengival da superfície da raiz e repovoamento seletivo de células do ligamento periodontal. A GTR é considerada tecnicamente difícil de usar cirurgicamente, e há boas evidências de que os resultados do tratamento são sensíveis à técnica.

Vários estudos que demonstram os benefícios clínicos da utilização da membrana de regeneração tecidular guiada (GTR) isolada ou em combinação com outros materiais na regeneração.<sup>26,27</sup>

##### 4.4.2. PROTEÍNAS DE MATRIZ DE ESMALTE (EMD)

As proteínas de matriz do esmalte, que se conhecem comercialmente como Emdogain®, frequentemente são utilizadas para efetuar a regeneração periodontal. Emdogain®, é um extrato de matriz de esmalte imaturo, considera-se que favorece a indução de proliferação, migração, adesão, mineralização e diferenciação de células no tecido periodontal. EMD contém mais de 95% de amelogenina com pequenas quantidades de enamelinina e outras proteínas. Estudos recentes indicam que biologicamente os EMPs causam um aumento na ligação celular de células epiteliais, fibroblastos gengivais e fibroblastos PDL. Eles

umentam a expressão de fatores de transcrição que estão relacionados com a diferenciação de condroblastos e osteoblastos/cementoblastos.<sup>28</sup>

Em princípio, o EMD, que parece ser seguro, foi capaz de regenerar tecidos periodontais perdidos em locais previamente afetados com base em parâmetros clínicos e foi melhor do que o debridamento por retalho aberto (OFD) sozinho ou GTR. Combinado com materiais de aloenxerto, o EMD pode ser de benefício adicional, mas precisa ser mais investigado.

A única preocupação com o uso de EMD tem sido relacionada à sua aplicação e sua natureza viscosa, que pode não fornecer suporte suficiente para os tecidos moles; portanto, pode potencialmente limitar o espaço disponível para o processo de regeneração.<sup>28</sup>

#### 4.4.3. PLASMA RICO EM PLAQUETAS

O estudo dos fatores de crescimento junto com a descoberta da sua liberação por parte das plaquetas tem conduzido ao desenvolvimento de um concentrado de plaquetas autólogo, útil para estimular a proliferação e a diferenciação celular nos tecidos onde isto é requerido, tal e como acontece nas feridas e processos de regeneração dos tecidos, ou para lutar contra a involução celular que tem lugar com o envelhecimento .

O PRP é definido como uma fração do plasma obtido de sangue autólogo que tem uma concentração de plaquetas superior à do plasma em condições basais. O PRP contém não apenas um alto nível de plaquetas, mas também os fatores de crescimento ativamente secretados pelas plaquetas. Além disso, o PRP também é rico em proteínas que atuam no nível de adesão celular (fibrina, fibronectina e vitronectina), fornecendo assim o suporte estrutural necessário para a migração celular e para a proliferação e crescimento tridimensional. O PRP tem efeitos não só apenas diretamente nas células-alvo para fatores de crescimento, mas também como uma matriz extracelular para a estimulação do reparo e/ou regeneração tecidual de maneira global.<sup>29</sup>

#### 4.4.4. TERAPÊUTICA DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As proteínas constituem um grupo de moléculas-chave com muitas aplicações na engenharia de tecidos. O uso de proteínas provenientes de fontes naturais tem várias

limitações que são superadas pelo uso de proteínas recombinantes. Até agora, as formas recombinantes de muitas proteínas foram desenvolvidas para aplicações na engenharia de tecidos, incluindo proteínas estruturais, fatores de crescimento e citocinas. Essa tecnologia permitiu o desenvolvimento de proteínas projetadas, tais como fatores de crescimento com domínios de ligação da matriz, híbridos de proteínas estruturais com propriedades mecânicas melhoradas.

As proteínas recombinantes são produzidos *ex vivo* ou *in vivo*, por protocolos locais de terapia genética.

A tecnologia de proteínas recombinantes enriquece muito o campo da engenharia de tecidos. Portanto, é recomendado integrar esta tecnologia, em qualquer abordagem na engenharia de tecidos.<sup>30</sup>

## 5.CONCLUSÕES

A bioengenharia de tecidos tem ampliado a nossa visão, e por tanto, a esperança de alcançar o sonho; tornar a regeneração total do periodonto numa realidade.

Esta abordagem regenerativa tem sido durante muito tempo o objetivo idealista da terapia periodontal, já que requer a consideração de muitas características além do desenvolvimento do complexo periodontal.

A tríade que constitui a engenharia de tecidos ("stem cells", "scaffolds" e fatores de crescimento) deve atuar como uma "engrenagem", na qual, cada uma das componentes tem a sua função e a presença de uma falha, afetará a todo o processo regenerativo.

Nas técnicas e materiais utilizados, existem fatores importantes que temos de ter em consideração, como o estudo das células progenitoras apropriadas ou a compreensão dos processos biológicos nas moléculas de sinalização. Devemos destacar que a constituição de um "scaffold" numa sequência temporal e espacial ordenada é um objetivo que tem provocado muitas complicações, devido à complexidade e falta de previsibilidade na sua adaptação ao defeito, mas no qual se tem avançado muito nestes últimos anos.

Na atualidade não existe uma aplicação clínica "ideal", mais utilizada ou com maior previsibilidade que outra, todas as técnicas estudadas têm as suas vantagens e desvantagens, e como em qualquer terapia médica, cada uma de elas se adapta melhor a um caso específico.

Para conseguir o nosso objetivo, devemos acreditar no campo da engenharia de tecidos baseado em "stem cells" e adotar uma abordagem multidisciplinar na regeneração periodontal, não devemos deter-nos na procura permanente de tecnologias regenerativas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Chen, F. M., & Shi, S. *Periodontal Tissue Engineering. Principles of Tissue Engineering: Fourth Edition*. Elsevier. 2013; 72, 1507-1509.
2. Rodríguez, V.M. CÉLULAS MADRE: Conceptos generales y perspectivas de investigación. 2005; *Universitas Scientiarum, Vol. 10, No. 1*, 5-14
3. Pejčić, A., Kojović, D., Mirković, D., & Minić, I. Stem cells for periodontal regeneration. *Balkan Journal of Medical Genetics*: 2013, *BJMG*, 16(1), 8–9.
4. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2008;53(2):108–21.
5. Horst O, Chavez M, Jheon A, Desai T, Klein O. Stem Cell and Biomaterials Research in Dental Tissue Engineering and Regeneration. *Dental Clinics of North America*. 2012 56(3): 495-500.
6. Maxim MA, Soritau O, Baciut M, Bran S, Baciut G. The role of dental stem cells in regeneration. 2015;88(4):479–82.
7. Mangala P, Veena S, Krupashankar R, Kavitha A. Role of Dental Stem Cells in Regenerative Medicine. *International Journal of Science and Research (IJSR)*. 2016;5(1):1457-1464.
8. Volponi A, Sharpe P. The tooth – a treasure chest of stem cells. *BDJ*. 2013; 215(7): 354-358.
9. Prof. M., Siddharth, Shailesh Varshney, Prof. Amita Singla, Prof. Jagadeesh H.G. Stem Cells, A Window to Periodontal Regeneration. 2011; *Journal of Oral Health & Research*. 2011; 71-75.
10. Tarun G, Ajay B, Bhawna K, Sunil K, Ravi J, Bihani SGL. Scaffold: Tissue Engineering and regenerative medicine. *Int Res J Pharm Int Res J Pharm Issn*. 2011; 2 (212): 37–42.
11. Sokolsky-Papkov. M, Kapil. A, Olaye. A, Shakesheff K, J. Domb A. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2008) 187–206.
12. Carmagnola D, Tarce M, Dellavia C, Rimondini L, Varoni EM. Engineered scaffolds and cell-based therapy for periodontal regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2017; 15(4).
13. Iwata T, Yamato M, Washio K, Ando T, Okano T, Ishikawa I. Cell Sheets for Periodontal Tissue Engineering. *Curr Oral Heal Reports*. 2015; 2 (4): 252.

14. Fa-Ming Chen, Hai-Hua Sun, Hong Lu, Qing Yu. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. 2012; (33): 6335.
15. Chung HJ, Park TG. Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59: 249–255.
16. Mishra M, Prachi M, Shambharkar V, Raut A. Scaffolds in Periodontal Regeneration. *J Pharm Biomed*. 2016; 11-14.
17. Chan Ho Park, Hector F. Rios, Andrei D. Taut, Miguel Padial-Molina, Colleen L. Flanagan, Sophia P. Pilipchuk, Scott J. Hollister, William V. Giannobile. Image-Based, Fiber Guiding Scaffolds: A Platform for Regenerating Tissue Interfaces. *Journal of Periodontology*. 2014; 850,852.
18. S. Ivanovski<sup>1\*</sup>, C. Vaquette<sup>2</sup>, S. Gronthos<sup>3</sup>, D.W. Hutmacher<sup>2</sup>, and P.M. Bartold<sup>4</sup>. Multiphasic scaffolds for periodontal tissue Engineering. *J Dent Res* 93(12) 2014, 1212-1221.
19. Chang H. Lee, Jeffrey Hajibandeh, Takahiro Suzuki, Andrew Fan, Peng Shang, Jeremy J. Mao. Three-Dimensional Printed Multiphase Scaffolds for Regeneration of Periodontium Complex. Center for Craniofacial Regeneration (CCR), Columbia University Medical Center, New York. 2014; 1344-1349.
20. Pandit N, Malik R, Philips D. Tissue engineering : A new vista in periodontal regeneration *Tissue engineering : A new vista in periodontal regeneration*. 2014; 328-334.
21. Cho Moon OL, Wen-Langhin AA, Genco Robert J. Platelet derived growth factor – modulated guided tissue regenerative therapy. *J Periodontology*. 1995; 1-9.
22. Xin Xu, Liwei Zheng, Quan Yuan, Gehua Zhen, Janet L. Crane, Xuedong Zhou and Xu Cao. Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis. *Bone research*; 2018; 2-21.
23. Tayalia P, Mooney DJ. Controlled growth factor delivery for tissue engineering. *Adv Mater* 2009; 3-17.
24. Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P. Growth factors in periodontal regeneration. *Int J Dent Hygiene*. 2009; 1-9.
25. Rajvir Malik. Tissue engineering: A new vista in periodontal regeneration. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 2011; 328-334.

26. Abbayya K, Zope SA, Naduwinmani S, Pisal A, Puthanakar N. Cell-and gene- based therapeutics for periodontal regeneration. *Int J Prev Med.* 2015; 1-6.
27. Hughes FJ, Ghuman M, Talal A. Periodontal regeneration: A challenge for the tissue engineer? *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med.* 2010; 1335-1342.
28. Sculean A, Willershausen B. The Application of Enamel Matrix Protein Derivative ( Emdogain ® ) in Regenerative Periodontal Therapy : Which Applications are. 2015; 223-227.
29. Rodríguez J, Angustias M, Gallego P. Cirugía Oral y Maxilofacial; Plasma rico en plaquetas: fundamentos biológicos y aplicaciones en cirugía maxilofacial y estética facial. 2011;4(1):8–17.
30. Farajollahi, Sepideh Hamzehlou, Ahmad Mehdipour, Ali Samadikuchaksaraei. Recombinant Proteins: Hopes for Tissue Engineering. *BiolImpacts*, 2012; 1-3.
31. Jones M. The source of pluripotent stems cells from developing embryos, 2006.
32. Sharpe P. Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 2016; 2275.

## CAPÍTULO II

## 1. RELATÓRIO DAS ATIVIDADES PRÁTICAS DAS DISCIPLINAS DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO

O Estágio no Mestrado Integrado em Medicina Dentária do Instituto Universitário de Ciências de Saúde do Norte (UCS\_N) no ano letivo 2017/2018 têm como objetivo a preparação do aluno para a prática clínica no futuro, mediante a aplicação dos conhecimentos teóricos que foram adquiridos ao longo do curso, tudo isto com a supervisão e colaboração dos docentes.

Os estágios supervisionados são: Estágio em Saúde Oral Comunitária, Estágio em Clínica Geral Dentária e Estágio em Clínica Hospitalar.

### 1.1 ESTÁGIO EM SAÚDE ORAL COMUNITÁRIA

O Estágio em Saúde Oral Comunitária decorreu desde setembro de 2017 a junho de 2018 tendo sido realizado às quartas-feiras, entre as 9h e 12:30h sob supervisão do Prof. Doutor Paulo Rompante.

O Estágio em Saúde Oral Comunitária (ESOC) é um espaço de criatividade, fomenta trabalho em equipo e permite também “perder o medo” no trato com as crianças.

As atividades do ESOC são desenvolvidas em duas etapas. A primeira etapa tem início do ano letivo 2017/2018 até à paragem letiva, de acordo com o calendário escolar, que ocorre em dezembro. Na primeira etapa o estágio foi lecionado no Instituto Universitário de Ciências da Saúde. As tarefas utilizam como base o Programa Nacional de Promoção de Saúde Oral (PNPSO) da Direção Geral da Saúde (DGS), do Ministério da Saúde de Portugal.

O aluno deve elaborar um plano de atividades no qual expressa a sua proposta relativa à forma de implementação do PNPSO, nomeadamente, a forma de intervenção que propõe na vertente educação para a saúde oral, a promoção da saúde oral, a motivação para a saúde oral e a prevenção das doenças orais, em cada um dos grupos incluídos no PNPSO: grávidas, adultos séniores, VIH + e indivíduos com Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida (SIDA), crianças 0-5 anos, crianças 6-7 anos, crianças 8-9 anos e adolescentes.

A segunda etapa começa em janeiro até ao final do ano letivo 2017/2018. Nesta etapa o aluno irá exercer as suas atividades em ambiente real de trabalho. O aluno vai colocar em prática a sua interpretação da forma como propõe implementar o PNPSO na sua vertente educação para a saúde oral, a promoção da saúde oral, a motivação para a saúde oral, prevenção das doenças orais e monitorização epidemiológica dos indicadores de saúde oral da Organização Mundial de Saúde (WHO).



As atividades do estágio estão descritas na tabela I. No total, o estágio teve a duração de 180 horas. A escola onde se realizou o trabalho foi: “Escola básica de Codiceira” em Alfena.

**Tabela I. Cronograma das atividades do Estágio em Saúde Oral Comunitária.**

Dia	Escola	Atividades
31 Janeiro	EB Codiceira	Apresentação do Cronograma e das atividades a desenvolver
7 Fevereiro	EB Codiceira	Educação para a Saúde Oral
14 Fevereiro		Feriado
21 Fevereiro	EB Codiceira	Implementação de Escovagem + Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
28 Fevereiro	EB Codiceira	Banda desenhada + Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
7 Março	EB Codiceira	Desenhos + Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
14 Março	EB Codiceira	Horário educativo e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos) + Entrega do 1º 1/3
21 Março	EB Codiceira	Escovagem na boca gigante e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
28 Março		Páscoa
4 Abril		Páscoa
11 Abril	EB Codiceira	Desenhos + Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
18 Abril	EB Codiceira	Quizz e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
23 Abril	EB Codiceira	Banda desenhada + Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos) + Entrega do 2º 1/3
25 Abril		Dia da Liberdade
2 Maio	EB Codiceira	Jogo educativos + levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
9 Maio		Queima das fitas
16 Maio	EB Codiceira	Quizz educativo e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
23 Maio	EB Codiceira	Entrega dos Diplomas e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos)
30 Maio	EB Codiceira	Entrega dos Diplomas e Levantamento epidemiológico T3 e T4 (3 alunos) + Entrega ultimo 1/3
6 Junho		Apresentação dos resultados
13 Junho		Apresentação dos resultados

## 1.2. ESTÁGIO EM CLÍNICA GERAL DENTÁRIA

O estágio em Clínica Geral Dentária decorreu na Unidade Clínica Nova Saúde (Gandra). O estágio teve como duração um total de 180 horas. A unidade curricular é regida pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Filomena Salazar, e foi supervisionado pelo Mestre. João Baptista, o Mestre Dr. Luís Santos e a Dra. Sonia Machado. Os atos clínicos realizados encontram-se na Tabela I. Este Estágio permite que o aluno ponha em prática os conceitos aprendidos durante o curso, com o propósito de elaborar um diagnóstico e plano de tratamento completo que engloba todas as áreas no âmbito da Medicina Dentária.

### 1.3. ESTÁGIO EM CLÍNICA HOSPITALAR

O Estágio em Clínica Hospitalar teve a duração de 180 horas e decorreu no hospital, Nossa Senhora da Conceição de Valongo (CHSJ, EPE) sobre a orientação da Dra. Ana Azevedo e a Prof.<sup>a</sup> Mestre Rita.

O total de atos clínicos efetuados estão descritos na Tabela II.

Este estágio foi sem dúvida o que me proporcionou mais agilidade, segurança, autonomia, responsabilidade e sobretudo capacidade de agir perante diversas situações clínicas.

**Tabela II. Atos clínicos realizados nos estágios**

Atos clínicos	Estágio em clínica geral	Estágio em clínica hospitalar	Total
Triagem	2	4	6
Dentisteria	9	49	58
Endodontia	1	13	14
Destartarização	5	34	39
Prótese fixa	0	0	0
Prótese Removível	0	0	0
Exodontia	7	53	60

### 1.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ESTÁGIOS

Os três estágios são uma parte fundamental da formação do aluno, foram imprescindíveis para pôr em prática os conceitos clínicos aprendidos durante o percurso escolar. São chave para começar a desenvolver as nossas competências em ambiente real de trabalho, aprender a atuar nas situações clínicas que se possam apresentar e permitem melhorar o trato com os pacientes.

Em conclusão, as três componentes são essenciais para o aluno, tanto nível pessoal como a nível profissional.