



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ORGANÓIDES: O FUTURO DA MEDICINA DENTÁRIA
REGENERATIVA?**

Trabalho submetido por
Raquel Soares Malveiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ORGANÓIDES: O FUTURO DA MEDICINA DENTÁRIA
REGENERATIVA?**

Trabalho submetido por
Raquel Soares Malveiro
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas

e coorientado por
Mestre Paulo Mascarenhas

setembro de 2021

Dedicatória

Aos meus pais, Sandra e Luís
Às minhas irmãs, Laura e Matilde
Ao meu amor, Leo

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito, para ser insignificante.”

Charles Chaplin

Agradecimentos

Durante toda a vida ouvi dizer que quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado chega certamente mais longe. Por isso, deixo os meus sinceros agradecimentos:

À minha orientadora, a Prof. Doutora Maria Alzira Cavacas, por toda a compreensão, paciência e disponibilidade durante a realização deste trabalho. Sem o seu rigor e exigência, assim como a sua sinceridade e amizade, não teria chegado a tão bom porto.

Ao meu coorientador, Mestre Paulo Mascarenhas, por ter estado sempre presente e disponível para ajudar, mas também pela sua boa disposição e atitude positiva.

À minha família, que tornou possível a concretização deste sonho e que sempre me apoiou e encorajou a ser uma pessoa melhor. As palavras são poucas para expressar o meu agradecimento.

Ao meu amor e amigo, Leonel, pelo apoio incondicional nos bons e maus momentos e ajuda crucial.

Às minhas colegas de box e amigas, Beatriz e Susana, pela amizade, pelo apoio, pelo carinho e pela força ao longo deste último ano.

À Associação Académica do Instituto Universitário Egas Moniz. A ti que viraste casa. A ti que me deste uma família. A ti que me tiraste horas de sono. A ti que tantos sorrisos e bons momentos me proporcionaste. Contigo, cresci e aprendi. Obrigada a ti, AAIUEM.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz por me ter acolhido durante estes últimos 5 anos de intensa aprendizagem tanto a nível profissional como a nível pessoal. Para sempre uma segunda casa. Obrigada, Egas Moniz!

Resumo

Introdução: Ao longo dos últimos anos têm sido realizados diversos procedimentos experimentais para avaliar a viabilidade da utilização de estruturas biológicas tridimensionais, complexas e auto-organizadas, recriando a arquitetura e a função de órgãos nativos *in vivo*, na região oral e maxilofacial. Recentemente foram feitos avanços na construção e aplicabilidade de organóides orais para o desenvolvimento de dentes, glândulas salivares, epitélio lingual e botões gustativos.

Objetivos: Esta revisão pretende fornecer uma visão geral e resumida da informação presente na literatura existente, a respeito da aplicabilidade terapêutica, no futuro, de organóides na cavidade oral.

Materiais e Métodos: Bases de dados de literatura científica como o *PubMed*, *B-on*, *Scopus* e *Web of Science* foram sistematicamente pesquisadas e selecionados os artigos que abordavam a viabilidade do uso de organóides para regeneração oral. Foram incluídos artigos, em inglês, dos últimos 10 anos, que referenciassem a utilização da técnica organóide. Foram ainda incluídos artigos obtidos a partir de uma pesquisa manual. Os artigos foram agrupados em três categorias: organóides do gérmen dentário, organóides das glândulas salivares, organóides do epitélio lingual e botões gustativos.

Resultados: Foram feitas contribuições significativas para a Medicina Dentária, originando inúmeras publicações sobre o tema. Escolhemos os estudos que reportam maiores progressos e maior aplicabilidade clínica. Estes ensaios permitiram a formação de organóides dentários com tecido mineralizado diferenciado, organóides salivares complexos e organóides com capacidade diferencial de gerar células recetoras de sabor.

Conclusões: Foi evidenciado o potencial dos organóides orais no desenvolvimento dentário, na regeneração de patologias na glândula salivar e terapêutica de precisão no tratamento do cancro da língua. Estas descobertas demonstram que esta técnica organóide é um novo paradigma para o estudo do desenvolvimento, patologia e regeneração do tecido oral e maxilofacial.

Relevância Clínica: Verifica-se uma grande necessidade de procura de estratégias biológicas, alternativas às estratégias artificiais, comumente utilizadas em Medicina Dentária.

Palavras-chave: organóides, glândula salivar, dente, língua

Abstract

Introduction: Over the last few years, several experimental procedures have been carried out to assess the viability of using self-organized complex three-dimensional structures, recreating the architecture and function of native organs in vivo, in the oral and maxillofacial region. Incredible discoveries have recently been made in the construction and applicability of oral organoids to the tooth, salivary glands, tongue and taste buds.

Objectives: This review intends to provide an overview of the existing literature regarding the future applicability of oral organoids.

Materials and Methods: Scientific literature databases such as PubMed, B-on, Scopus and Web of Science were systematically searched and articles that addressed the viability of using organoids for oral regeneration were selected. Articles in English from the last 10 years that referred to the use of the organoid technique were included. Articles obtained from a manual search were also included. The articles were grouped into three categories: tooth germ organoids, salivary gland organoids, lingual epithelial organoids and taste buds.

Results: Significant contributions were made to Dentistry, leading to numerous publications on the subject. We chose the studies that report the greatest progress and greatest clinical applicability. These essays allowed the formation of dental organoids with differentiated mineralized tissue, complex salivary organoids and organoids with differential capacity to generate flavor receptor cells.

Conclusions: The potential of oral organoids in dental development, in the regeneration of pathologies in the salivary gland and in precision therapy in the treatment of tongue cancer was evidenced. These findings demonstrate that this organoid technique is a new paradigm for studying the development, pathology and regeneration of oral and maxillofacial tissue.

Clinical Relevance: there is a great need to search for biological strategies, alternatives to artificial strategies, commonly used in Dentistry.

Keywords: organoids, salivary gland, tooth, tongue

Índice geral

I.	Introdução	13
1.	Métodos de cultura	15
1.1.	Culturas 2D	15
1.2.	Culturas 3D	15
1.2.1.	Esferóides	16
1.2.2.	Organóides	17
1.2.2.1.	Organóides Orais	18
2.	Componentes básicos dos organóides	18
2.1.	Células-tronco	18
2.1.1.	Células-tronco adultas/ células progenitoras (ASCs)	19
2.1.2.	Células-tronco pluripotentes (PSCs).....	20
3.	Estruturas de suporte ou <i>scaffolds</i>	20
3.1.	Tipos de Materiais	22
3.1.1.	Materiais Naturais	22
3.1.2.	Materiais Sintéticos	23
3.1.3.	Sem estrutura de suporte- Levitação magnética	23
4.	Órgão dentário/ Dente	24
5.	Glândula Salivar.....	26
6.	Epitélio Lingual e botões gustativos das papilas linguais	28
7.	Objetivos	29
II.	Materiais e métodos	31
1.	Definição da pergunta de pesquisa / Design do estudo	31
2.	Estratégias de Pesquisa Sistemática	31
3.	Critérios de Inclusão e Exclusão	32
4.	Seleção de Estudos	32

5. Recolha e Processamento de dados.....	33
6. Avaliação da qualidade dos estudos e Avaliação do Risco de Enviesamento	33
III. Resultados	35
1. Resultados da estratégia de pesquisa.....	35
2. Síntese qualitativa da Evidência.....	35
2.1. Tabelas da revisão sistemática.....	37
2.2. Resumo das estratégias de construção de organóides orais.....	53
2.3. Resultados da Avaliação do Risco de Enviesamento	54
IV. Discussão	59
V. Conclusão e Perspetivas futuras.....	71
VI. Bibliografia	73

Índice de figuras

Figura 1- Métodos de cultura 2D e 3D (Adaptado de Tanaka & Mishima, 2020).....	16
Figura 2- Resumo das estratégias de construção de organóides orais (Modificado de Gao <i>et al.</i> , 2021).	24
Figura 3- Fluxograma de acordo com as <i>guidelines</i> PRISMA.....	36
Figura 4- Diagrama esquemático da construção de organóides do germén dentário (Modificado de Gao <i>et al.</i> , 2021).	53
Figura 5- Diagrama esquemático da construção de organóides da glândula salivar (Adaptado de Gao <i>et al.</i> , 2021).....	53
Figura 6- Diagrama esquemático da construção de organóides do epitélio lingual e botões gustativos (Modificado de Gao <i>et al.</i> , 2021).....	54
Figura 7- Gráfico <i>traffic light plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide do gérmen dentário.	55
Figura 8- Gráfico <i>summary plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide do gérmen dentário.	55
Figura 9- Gráfico <i>traffic light plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide da glândula salivar.	56
Figura 10- Gráfico <i>summary plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide da glândula salivar.	57
Figura 11- Gráfico <i>traffic light plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide do epitélio lingual e botões gustativos das papilas linguais	57
Figura 12- Gráfico <i>summary plot</i> (<i>RobVis tool</i>) para análise do risco de enviesamento organóide do epitélio lingual e papilas gustativas.	58

Índice de tabelas

Tabela 1 - Critérios de inclusão e exclusão aplicados na pesquisa para a revisão sistemática.	32
Tabela 2 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide do gérmen dentário.	37
Tabela 3 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide da glândula salivar.	40
Tabela 4 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide do epitélio lingual e dos botões gustativos.	48

Lista de siglas

2D: bidimensional

3D: tridimensional

ADP: adenosina difosfato

ASCs: células-tronco adultas

ATP: adenosina trifosfato

BMP4: proteína morfogénica óssea 4

CK14/K14/KRT14: queratina 14

CK5/K5/KRT5: queratina 5

CV: papilas circunvaladas

DE: células epiteliais dentárias

DESCs: células-tronco epiteliais dentárias

DM: células mesenquimais dentárias

DMEM: meio de Eagle modificado de Dulbecco

DMSCs: células-tronco mesenquimais dentárias

DPSCs: células-tronco da polpa dentária

ECM: matriz extracelular

ECSs: células-tronco embrionárias

EGF: fator de crescimento epidérmico

FF: papilas fungiformes

FGF10: fator de crescimento de fibroblastos 10

FGF2: fator de crescimento de fibroblastos 4

FGF7: fator de crescimento de fibroblastos 7

FGFs: fator de crescimento de fibroblastos

FL: papilas foliadas

GS: glândula salivar

HA: ácido hialurónico

hDFSC: células-tronco do folículo dentário

hDPSCs: células-tronco da polpa dentária humana

IGF1: fator de crescimento semelhante à insulina-1

iPSCs: células-tronco pluripotentes induzidas

LDN-193189: inibidor de BMP

LECS: células-tronco epiteliais linguais

PCL: policaprolactona

PGA: ácido poliglicólico

PLA: ácido polilático

PLGA: ácido poli (lático-co-glicólico)

PSCs: células-tronco pluripotentes

SB-431542: Inibidor de fator de crescimento transformador β

SGSCs: células-tronco da glândula salivar

SMG: glândula submandibular

TGF- β : fator de crescimento transformador

I. Introdução

A saúde oral pode ser comprometida por diversos problemas com origem dentária. A perda de dentes devido à cárie dentária, doença periodontal e lesão traumática, causam problemas orais como perda de função mastigatória e alterações na fonética (Oshima & Tsuji, 2014). Também as glândulas salivares têm uma função imperativa na manutenção da saúde oral (Lombaert *et al.*, 2017), a hipofunção da glândula salivar e a consequente xerostomia, podem ser induzidas por doenças autoimunes e pela radioterapia da cabeça e do pescoço. Podendo mesmo ter efeitos prejudiciais na cavidade oral, incluindo infecções, edema e dor da mucosa, alteração do paladar e perda de dentes (Ferreira *et al.*, 2019). Tal como a perda de peças dentárias e disfunção salivar, defeitos no epitélio lingual, causados por cancro ou trauma, podem afetar gravemente a qualidade de vida.

O objetivo da medicina regenerativa é substituir ou restaurar células, tecidos e estruturas que sejam perdidas ou danificadas, após patologias, lesões ou envelhecimento (Ikeda *et al.*, 2009). Na sua grande maioria a área de engenharia dos tecidos e medicina regenerativa são complementares. Podendo-se considerar que a engenharia dos tecidos providencia as ferramentas necessárias para a prática da medicina regenerativa (Yelick & Sharpe, 2019). A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa incluem a engenharia simultânea coordenada de tecidos (muscular, ósseo e vaso-nervoso) de forma a facilitar a criação bem-sucedida de tecidos funcionais da bioengenharia (Yelick & Sharpe, 2019).

A terapia regenerativa para reparo do tecido dentário e substituição dentária completa é atualmente considerada como um novo conceito terapêutico com potencial para a recuperação total da função dentária (Oshima & Tsuji, 2014).

Neste momento, os tratamentos dentários convencionais baseiam-se na utilização de materiais artificiais, como pontes dentárias fixas, próteses removíveis e implantes dentários, materiais esses que têm sido amplamente utilizados para restaurar a função oral, após a perda de um ou mais dentes. Embora estas terapias artificiais sejam comumente utilizadas para reabilitação de espaços edêntulos, são menos conservadoras,

mostram menos biocompatibilidade e falha em restaurar a função biológica e fisiológica natural (Oshima & Tsuji, 2014; Jamal, 2016).

Relativamente à disfunção das glândulas salivares, são usadas terapias convencionais com saliva artificial ou estimulantes colinérgicos da saliva, porém não são considerados eficazes a longo prazo, sendo necessário um tratamento mais permanente para a sensação de boca seca (Ferreira *et al.*, 2019).

As abordagens atualmente utilizadas para desenvolver futuras terapias regenerativas são influenciadas pela nossa compreensão do desenvolvimento embrionário, biologia das células-tronco e tecnologia da engenharia de tecidos (Ikeda *et al.*, 2009).

Todos os seres vivos são configurados pelo seu próprio sistema hierárquico, desde o nível subcelular ao nível sistémico. Muitas ferramentas de pesquisa têm sido desenvolvidas para mimetizar essa hierarquia do organismo, abordando questões específicas, como desenvolvimento e patogénese.

A função de um tecido é determinada pelas suas composições celulares e não celulares. Num sistema de cultura de células que se assemelha às condições *in vivo*, as células podem replicar os seus comportamentos e respostas no corpo (Jeong *et al.*, 2020).

Recentemente, foi proposto um novo conceito terapêutico em que é gerado um órgão a partir do gérmen de um órgão desenvolvido por bioengenharia, reproduzindo o seu processo normal de desenvolvimento (Ikeda *et al.*, 2009). Essas estruturas semelhantes a órgãos inteiros, denominadas organóides, foram geradas a partir de células-tronco por meio de sistemas de cultura tridimensionais *in vitro* (Lancaster, Knoblich, 2014). O sucesso dessa terapia, depende inteiramente da qualidade da emulação do processo inicial, para o desenvolvimento do órgão. O conhecimento sobre os processos moleculares, interação célula-célula e matriz-célula, bem como os requisitos espaço temporais, devem ser traduzidos para o desenvolvimento organóide (Rosowski *et al.*, 2019).

Intracelularmente, cascatas de sinalização complexas e multifatoriais são induzidas devido à forma celular alterada, tamanho da célula e transdução de estímulos mecânicos. Por sua vez, estas cascatas de sinalização, quando ativadas, desencadeiam a

indução de um conjunto específico de genes de tecido, seguido por diferenciação celular e compromisso com o destino (Jeong *et al.*, 2020).

Portanto, existem três elementos essenciais na construção de organóides orais: células, matriz e estratégias de construção (Gao *et al.*, 2021).

1. Métodos de cultura

Os sistemas de cultura são ferramentas indispensáveis para o estudo e pesquisa clínica, uma vez que, permitem mimetizar as condições *in vivo*, a partir do cultivo de células em condições específicas, propícias ao seu desenvolvimento *in vitro* (Tanaka & Mishima, 2020).

No que diz respeito aos métodos de cultura, podem classificar-se em culturas bidimensionais (2D) e culturas tridimensionais (3D), conforme se descreve sucintamente abaixo:

1.1. Culturas 2D

As culturas de células bidimensionais estão em uso há muito tempo. Culturas de células 2D de células primárias, bem como linhas de células estabelecidas, são úteis para a compreensão da biologia celular, mecanismos de doença e medicina regenerativa (Tanaka & Mishima, 2020). No entanto, é difícil, para estas culturas recapitularem exatamente as funções celulares *in vivo*, incluindo diferenciação celular, proliferação, motilidade e metabolismo, porque são incapazes de reproduzir as interações entre células e células com matriz, como *in vivo* (Tanaka & Mishima, 2020). Neste tipo de cultura, as células são cultivadas numa única camada (monocamada), em superfícies planas, como o prato de cultura, obtendo nutrientes e oxigénio do ambiente circundante, alcançando um crescimento uniforme e homogéneo (Duval *et al.* 2017).

1.2. Culturas 3D

Havendo necessidade de culturas que mimetizassem as interações celulares, *in vivo*, surgiram as culturas tridimensionais, que vieram substituir as culturas bidimensionais, uma vez que apresentavam mais vantagens relativamente a estas (Tanaka & Mishima, 2020). Neste tipo de cultura, é utilizada uma matriz tridimensional

personalizada, de forma a imitar o ambiente nativo das células. Assim, as células crescem, proliferam e diferenciam-se, como se estivessem no seu ambiente natural (Tanaka & Mishima, 2020).

As técnicas de cultura tridimensionais foram aprimoradas e vários métodos surgiram, como a técnica esferóide e a técnica organóide (**Figura 1**) (Tanaka & Mishima, 2020).

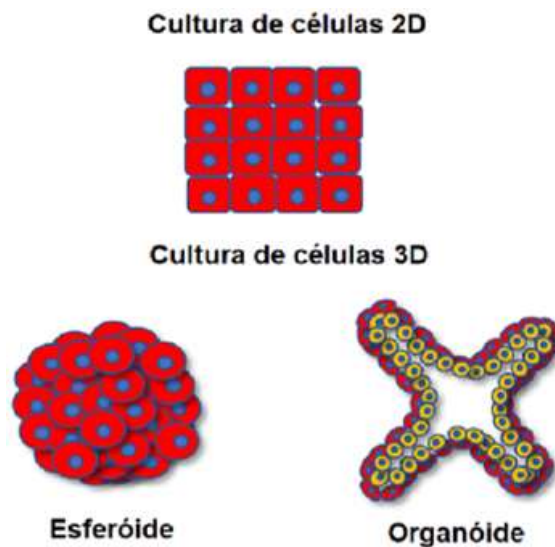


Figura 1- Métodos de cultura 2D e 3D (Adaptado de Tanaka & Mishima, 2020).

1.2.1. Esferóides

Os esferóides consistem num agregado de células que se originou a partir de linhas celulares estabelecidas ou células primárias de espécimes normais ou tumorais (Sutherland *et al.*, 1971). No entanto, especialmente em tecidos normais, frequentemente carecem de células-tronco ou progenitoras, acrescentando-se ainda a particularidade de ser difícil o seu cultivo a longo prazo (Yin *et al.*, 2016).

Salisferas são esferóides que têm capacidade de gerar organóides, quando colocados em matrigel (Cho *et al.*, 2021).

1.2.2. Organóides

O início do aumento significativo do número de artigos sobre organóides, deu-se por volta de 2011 (Simian & Bissel, 2017). A definição fornecida por Shamir e Ewald (2014), foi a mais inclusiva e precisa, uma vez que incluiu as diferentes definições às quais a palavra “organóide” foi associada. Este é então definido como uma estrutura gerada a partir de células-tronco embrionárias ou induzidas (Shamir & Ewald, 2014).

Vários tipos de modelos organóides foram estabelecidos como estômago (Barker *et al.*, 2010), pâncreas (Boj *et al.*, 2015), próstata (Karthaus *et al.*, 2014), fígado (Huch *et al.*, 2013a; Huch *et al.*, 2013b), copo ótico (Eiraku *et al.*, 2011), cérebro (Lancaster *et al.*, 2013), glândula salivar (Maiments *et al.*, 2016), germen dentário (Athanassiou-Papaefthymiou *et al.*, 2015), epitélio lingual (Hisha *et al.*, 2013) e botões gustativos (Aihara *et al.*, 2015). A maioria dos organóides foi direcionada a mimetizar órgãos com origem endodérmica ou ectodérmica (Jeong *et al.*, 2020).

Atualmente, um organóide é definido como uma estrutura tridimensional complexa desenvolvida a partir de células somáticas, células-tronco adultas/ células progenitoras (ASCs), células-tronco pluripotentes (PSCs), incluindo células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), ou linhas celulares específicas, que exibem arquiteturas e funcionalidades semelhantes aos órgãos *in vivo* (Clevers, 2016; Yin *et al.*, 2016). Em condições específicas de cultura, as células-tronco auto-organizam-se espontaneamente em tipos de células funcionais devidamente diferenciadas, que se assemelham ao modelo *in vivo* e recapitulam pelo menos, algumas funções do órgão oral (Gao *et al.*, 2021), formando estruturas que se assemelham a mini-órgãos (Lancaster & Knoblich, 2014). Os organóides podem dar origem a linhagens celulares do tecido nativo, imitando as interações célula-célula e célula-matriz (Clevers, 2016). Este tipo de estruturas são mais representativas da fisiologia *in vivo*, comparativamente com método convencional bidimensional (2D). Os organóides fornecem um sistema mais estável, passível de cultivo a longo-prazo e manipulação de componentes de nicho, vias de sinalização, edição de genoma (Clevers, 2016). Por isso, são considerados uma ponte entre as culturas de células 2D e os modelos *in vivo*.

Estas estruturas fornecem recursos adicionais comparativamente com os esferóides, por serem capazes de se auto-organizarem, de exibirem uma arquitetura similar com a do tecido de origem e de exercerem funções específicas do tecido (Yin *et al.*, 2016).

Recentemente, têm sido aplicados na nova geração de terapia regenerativa, desenvolvimento e modelagem de doenças, e testes a fármacos (Clevers, 2016;). Além disso, podem tornar possível a substituição de órgãos inteiros (Clevers, 2016).

1.2.2.1. Organóides Orais

Tendo em conta o que foi referido anteriormente, os organóides orais são estruturas tridimensionais complexas que se desenvolvem a partir de células-tronco, por meio de um processo de auto-organização e recriação de arquiteturas e funcionalidades semelhantes a órgãos e tecidos *in vivo*, na região maxilofacial (Gao *et al.*, 2021). Vários organóides orais, incluindo organóides do gérmen dentário, organóides das glândulas salivares, organóides do epitélio lingual e organóides do botão gustativo foram construídos. Esses organóides geralmente, mantêm as principais funções e as estruturas características do órgão correspondente, até certo ponto (Gao *et al.*, 2021).

Até agora, têm sido aplicados no estudo dos mecanismos de desenvolvimento dentário, patologia e regeneração da glândula salivar e terapêutica de precisão para o cancro da língua.

2. Componentes básicos dos organóides

2.1. Células-tronco

As células-tronco são definidas como as células com capacidade única de auto-renovação e diferenciação, permitindo a formação de células diferenciadas (Clevers, 2015).

Os organóides orais podem ser derivados de dois tipos principais de células-tronco: células-tronco adultas (ASCs) e células-tronco pluripotentes (PSCs) que se dividem em células-tronco embrionárias (ESCs) e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs), tal como referido anteriormente.

A formação de um organóide baseada na utilização de células-tronco pluripotentes replica, principalmente, o processo de desenvolvimento do órgão. Estas células são induzidas a diferenciarem-se em linhagens específicas, na presença de fatores de transcrição específicos (Eiraku *et al.*, 2011; Lancaster *et al.*, 2013). Em contrapartida, no processo de formação organóide baseado em células-tronco adultas, os componentes do nicho das células-tronco são aproveitados, englobando uma série de sinais bioquímicos e biofísicos (Barker *et al.*, 2010; Huch *et al.*, 2013b).

Normalmente, as células exibem uma capacidade intrínseca de se agregarem em estruturas complexas quando colocadas num ambiente tridimensional, na presença de fatores de crescimento e pequenas moléculas (Gao *et al.*, 2021).

Quando cultivadas em microambiente adequado, as células-tronco adultas e as células-tronco pluripotentes, apresentam fortes habilidades de se diferenciarem em linhagens específicas e de se auto-organizarem em estruturas de certos órgãos (Gao *et al.*, 2021).

2.1.1. Células-tronco adultas / células progenitoras (ASCs)

ASC, células-tronco adultas, são definidas como células com capacidade intrínseca de se auto-renovarem e de se diferenciarem nos tipos de células presentes nos tecidos onde estão inseridas, mantendo a sua estabilidade genómica (Huch *et al.*, 2015), desempenhando assim um papel fundamental na homeostase e / ou reparo do tecido (Jeong *et al.*, 2020).

As células-tronco da polpa dentária (DPSCs) são um exemplo de ASCs com capacidade para construção de organóides do germen dentário (Athanasiou-Papaefhymiou *et al.*, 2015; Jeong *et al.*, 2020; Rosowski *et al.*, 2019) e de organóides da glândula salivar (Adine *et al.*, 2018; Urkasemsin *et al.*, 2020). A linha celular SIMS, proveniente de células da glândula salivar submandibular de camundongo adulto imortalizado, também se pode diferenciar em populações únicas de células acinares, mioepiteliais e ductais sob várias condições de diferenciação (Athwal & Lombaert, 2019).

As células-tronco Lgr5+ (Aihara *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2019; Qin *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2020; Schechtman *et al.*, 2021; Takai *et al.*, 2019) e Lgr6+ (Lin *et al.*, 2021) provenientes das papilas circunvaladas demonstraram gerar organóides com células gustativas diferenciadas. Recentemente, células Bmi1+ isoladas da camada basal do epitélio lingual foram usadas para estabelecer organóides do epitélio lingual, considerados um tipo de células-tronco epiteliais linguais (LECs) (Hisha & Ueno, 2019; Hisha *et al.*, 2013).

A vantagem do uso deste tipo de células, é que são específicas para tecidos e tendem a diferenciar-se em certos tipos de células. Portanto, podem gerar espontaneamente organóides específicos, em condições de cultura que mimetizam o ambiente molecular, no tecido adulto (Bartfeld & Clevers, 2017).

2.1.2. Células-tronco pluripotentes (PSCs)

O uso de PSCs, células-tronco pluripotentes, para a formação de organóides orais, apresenta vantagens, tais como, elevada capacidade de diferenciação e auto-renovação (Gao *et al.*, 2021). Estas células podem ser induzidas a diferenciar-se em várias linhagens de células somáticas que mimetizam os sinais de padronização e posicionamento durante a embriogénese (Takeo & Tsuji, 2018).

3. Estruturas de suporte ou *scaffolds*

Recentemente, muitos investigadores têm aplicado esforços adicionais no âmbito da Medicina Regenerativa e da Medicina Dentária com o intuito de desenvolver materiais e designs ideais de matrizes biodegradáveis que forneçam apoio à formação do órgão desejado e/ou tecidos de interesse, de tamanho e forma específicos.

Estruturas de suporte ou *scaffolds* são estruturas tridimensionais formadas por biomateriais, usadas na engenharia dos tecidos (O'Brien, 2011). Apresentam um papel fundamental no suporte, uma vez que funcionam como uma matriz extracelular artificial que permite a adesão, proliferação e diferenciação celular ao longo do desenvolvimento

do novo tecido e para além disso, fornecem estrutura e funcionalidade apropriada aos tecidos (Bártolo *et al.*, 2008), mesmo após a implantação.

Na utilização e construção de uma estrutura de suporte, existem algumas condições que devem ser reunidas, tais como, biocompatibilidade (Mikos & Temenoff, 2000), tanto para as células cultivadas como para o tecido onde será implantada, deve ser biodegradável, ou seja, à medida que as células proliferam e produzem a sua própria matriz extracelular, o *scaffold* deve ser substituído e por último, devem ser levadas em consideração, as suas propriedades mecânicas (rigidez e flexibilidade, área de superfície) que devem ser tidas em conta consoante o local em que seja implantado (O'Brien, 2011).

A presença de poros e de interligações, permite não só criar condições nutricionais adequadas (nutrientes e oxigénio), eliminação de resíduos ou metabolitos, como também de migração e proliferação celular, vascularização e organização espacial adequada (O'Brien, 2011).

Para simular a matriz extracelular (ECM) nativa, várias estruturas de suporte, incluindo estruturas 3D, feitas de materiais naturais e sintéticos, bem como substratos de ECM produzidos a partir de matrizes acelulares, têm sido usadas na construção organóide (**Figura 2**) (Gao *et al.*, 2021). São uma abordagem inovadora da bioengenharia, que tem como objetivo principal formar uma estrutura tridimensional com uma morfologia específica propícia para as células desejadas serem semeadas (Jamal, 2016).

Embora apresentem benefícios, uma vez que, atuam como guias no crescimento celular, apresentam algumas desvantagens. Em primeiro lugar, atuam como um obstáculo na interação epitelial-mesenquimal. Em segundo lugar, alguns destas estruturas, tais como o colagénio e o PLGA, podem atrasar o mecanismo de resposta imune. Por último, demonstram uma vascularização deficiente, quando utilizado *in vivo* (Jamal, 2016).

Tal como referido anteriormente, os biomateriais encontram-se divididos em: derivados naturais e polímeros sintéticos (Jamal, 2016).

3.1. Tipos de Materiais

3.1.1. Materiais Naturais

Diversos derivados naturais têm sido empregues na construção de *scaffolds*: colagénio, alginato, fibrina, quitina, quitosano, glicosaminoglicanos e matrizes acelulares (O'Brien, 2011). Com os avanços das técnicas de bioengenharia, uma outra alternativa foi proposta, à aplicação de matrizes convencionais, a utilização de *scaffolds* derivados de tecidos acelulares (Gao *et al.*, 2014).

A maioria dos sistemas de cultura 3D relatados utilizam substratos de derivados não humanos, como o matrigel, o que limita seu potencial para uso clínico. O matrigel é uma matriz extracelular natural gerada por células de sarcoma de rato e rico em fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular, como laminina-1, colagénio IV e proteoglicanos de sulfato de heparina (Patel & Alahmad, 2016). Este, é um componente organóide básico amplamente utilizado para imitar a membrana basal natural, induzindo a diferenciação de células-tronco/progenitoras e o crescimento de tipos de células já diferenciadas, causando a polarização de células embutidas ou sobre ele (Ciano *et al.*, 2014). O matrigel e gel de colagénio têm sido usados para construir organóides orais, principalmente porque fornecem um ambiente tridimensional propício à formação de estruturas complexas (Monteiro & Yelick, 2017).

Os polímeros naturais apresentam várias vantagens, principalmente ao nível da atividade biológica, ao nível da promoção da adesão, da proliferação celular e pelo facto de serem biodegradáveis (O'Brien, 2011). Contudo, também exibem desvantagens: uma vez que se trata de polímeros provenientes de fontes biológicas, a obtenção em grandes quantidades é um desafio (Mikos & Temenoff, 2000), a complexidade dos seus componentes, torna difícil controlar com precisão as condições da cultura e a sua reprodutibilidade (Yin *et al.*, 2016), apresentam fracas propriedades mecânicas (O'Brien, 2011) e podem desencadear uma resposta imunológica.

3.1.2. Materiais Sintéticos

Como alternativa, vários materiais sintéticos têm sido usados na construção de organóides, as suas propriedades bioquímicas e bioativas podem ser facilmente modificadas para diferentes tipos de células-tronco.

Os materiais sintéticos mais usados na construção de *scaffolds* são os poliésteres alifáticos lineares, compostos como o ácido poliglicólico (PGA), policaprolactona (PCL), ácido polilático (PLA) e o seu copolímero, ácido poli (lático-co-glicólico) (PLGA). Por exemplo, o poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), embora tenha uma estrutura bastante porosa, tem sido utilizado na construção de organóides do gérmen dentário, de forma a facilitar a interação DE-DM (Cai *et al.*, 2017).

Os hidrogéis sintéticos de PLGA e ácido hialurónico (HA) têm sido usados para a formação de organóides da glândula salivar, uma vez que promovem a formação de estruturas interconectadas e ramificadas (Ozdemir *et al.*, 2016).

Os polímeros sintéticos apresentam características tais como: adaptação da sua arquitetura, a possibilidade de controlar a sua degradação (O'Brien, 2011), capacidade de produção em massa (Mikos & Temenoff, 2000) e, devido à sua natureza, o potencial de desencadear uma resposta imunológica e de existir transmissão de agentes patogénicos é reduzida (O'Brien, 2011).

No geral, diferentes materiais, oferecem diferentes vantagens, na construção de organóides orais. Até agora, nenhuma matriz fornecia condições adequadas para replicar o processo da organogénese oral.

3.1.3. Sem estrutura de suporte- Levitação magnética

A maioria dos sistemas de cultura 3D utiliza matrizes de derivados não humanos e outros, apresentam vários desafios técnicos, que limitam o seu potencial para uso clínico. Para superar estas dificuldades, culturas de levitação de células foram recentemente desenvolvidas, para produzir culturas 3D sem substrato, permitindo a

formação de um organóide consistente (Adine *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Urkasemsin *et al.*, 2020).

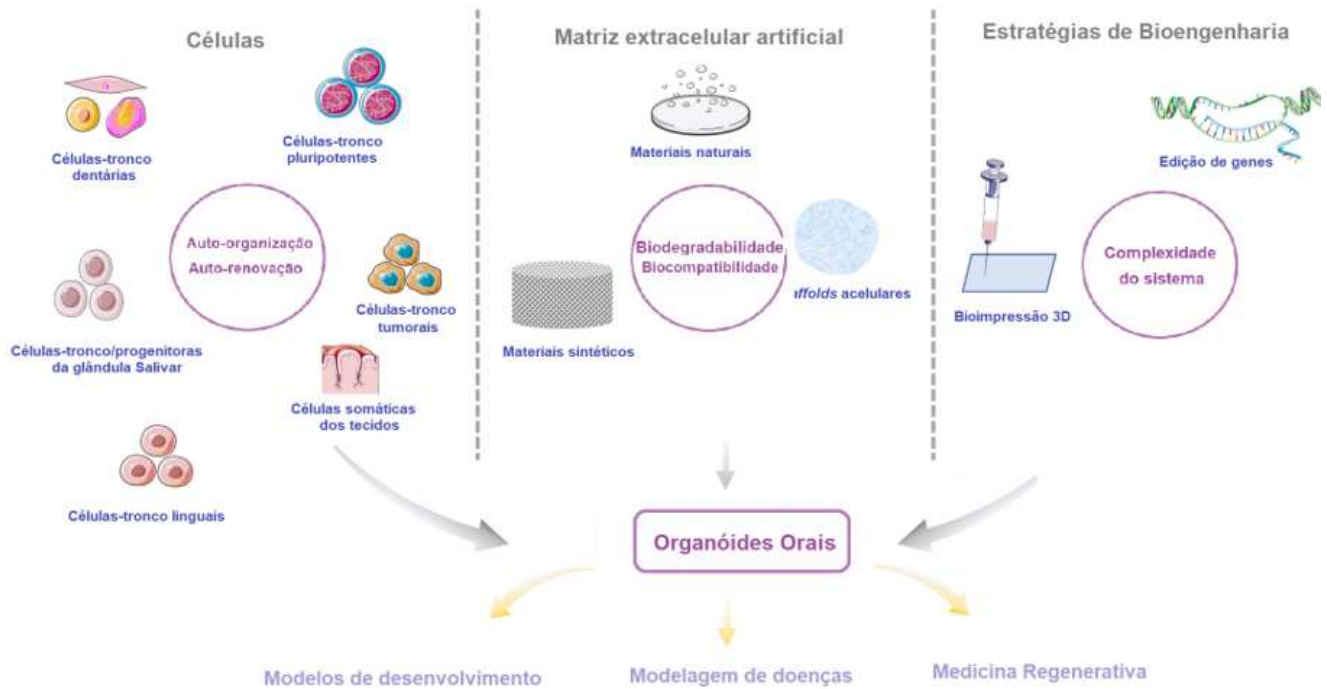


Figura 2- Resumo das estratégias de construção de organóides orais (Modificado de Gao *et al.*, 2021).

4. Órgão dentário/ Dente

O dente propriamente dito consiste no esmalte, que se caracteriza por ser um tecido duro, inerte e acelular, com origem epitelial e na dentina, um tecido conjuntivo laxo, menos mineralizado, mais resiliente e vital (Nanci, 2012). Estes dois tecidos cobrem e protegem a polpa dentária, rica em tecido conjuntivo, vasos e nervos. Os dentes estão implantados nos ossos maxilares pelos tecidos de suporte: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Nanci, 2012). O esmalte é um tecido mineralizado único que é produzido apenas uma vez, durante o desenvolvimento da coroa do dente, e a capacidade de regenerar o esmalte é perdida nos humanos (Binder *et al.*, 2020). Após o nascimento, as células-tronco permanecem em nichos específicos dos órgãos e fornecem a potencial fonte de reparação e regeneração.

No dente e nos tecidos de suporte dentário, vários tipos de células-tronco foram identificadas, incluindo células-tronco da polpa-dentária (DPSCs) (Zheng *et al.*, 2019),

células-tronco do ligamento periodontal (Lei *et al.*, 2014), células-tronco da papila apical (Nada & Backly, 2018) e células do folículo dentário (Zhou *et al.*, 2019). Entre eles, as DPSCs de linhagens de células mesenquimais que residem na polpa e apresentam grande potencial de diferenciação, capazes de se diferenciar em odontoblastos formadores de dentina (Zheng *et al.*, 2019).

Existem basicamente duas abordagens diferentes na literatura para a bioengenharia de um órgão dentário: A primeira abordagem é realizada associando células-tronco epiteliais dentárias (DESCs) e células-tronco mesenquimais dentárias (DMSCs) *in vitro*, que levam à formação de um primórdio dentário (explante), que pode ser implantado no osso alveolar, terminar o seu desenvolvimento e formar um dente funcional (Ikeda *et al.*, 2009). Define-se explante como “um fragmento celular de tecido de um determinado órgão, usado para iniciar culturas, *in vitro*” (Grant *et al.*, 2013). A segunda abordagem é feita implantando no osso alveolar, uma estrutura degradável pré-fabricada que se assemelha à morfologia do dente semeado com DESCs e DMSCs, que eventualmente dará origem a um dente funcional (Young *et al.*, 2002). Este, deve ser um órgão totalmente funcional, com capacidade mastigatória, colaboração biológica com os tecidos do ligamento periodontal, bem como a capacidade de responder a estímulos nocivos no compartimento maxilofacial (Yelick & Sharpe, 2019). Uma das preocupações óbvias na terapia regenerativa dentária é se o transplante do primórdio do germe dentário, produzido por bioengenharia, colocado na área edêntula do paciente, irá erupcionar com sucesso e ocluir apropriadamente com os dentes opostos.

Diferentes estratégias de construção de organóides do gérmen dentário têm sido implementadas ao longo dos últimos anos, com o objetivo de regenerar estruturas constituintes do dente, como tecido duro, tecido pulpar, vasos sanguíneos e fibras nervosas. A interação entre as células epiteliais derivadas do gérmen do dente (DE) e células mesenquimais dentárias (DM), aparentam ser o ponto-chave para o seu desenvolvimento (Gao *et al.*, 2021).

Também as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) podem ser facilmente obtidas como ASCs em tecidos de polpa dentária (Sharpe, 2016) e usadas para simular mesênquima e construir organóides de germe dentário (Rosowski *et al.* 2019).

5. Glândula Salivar

Existem três glândulas salivares principais ou major (glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais) e 100-1000 glândulas salivares minor. As glândulas são órgãos excretores complexos compostos por células acinares produtoras de saliva, células mioepiteliais que facilitam a expulsão da saliva e células ductais através das quais, a saliva é secretada para a cavidade oral (Pringle *et al.*, 2013). Misturado com as células ductais residem as células-tronco da glândula salivar (SGSCs), que expressam c-Kit, CD49f, CD133, CD24 e marcadores de superfície celular CD29 (Nanduri *et al.*, 2011). As unidades secretoras são compostas por células epiteliais, e mesenquimais em interação que se unem durante os estágios de desenvolvimento, semelhante a outros órgãos ramificados (Hosseini *et al.*, 2018).

A glândula salivar, tal como muitos outros órgãos, sofre morfogénese ramificada para gerar um órgão arborizado com uma grande área de superfície e num espaço relativamente pequeno. As células progenitoras epiteliais sofrem morfogénese ramificada e diferenciação para produzir um órgão adulto funcional (Hosseini *et al.*, 2018). Estes processos são controlados pela ação de vários fatores de crescimento tais como, o fator de crescimento epidérmico (EGF), os fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e o fator de crescimento transformador β (TGF- β), que podem induzir a diferenciação das células, bem como alterações nas propriedades de ECM e na sua composição (como colagénio, laminina e fibronectina) (Yang & Young, 2008).

A saliva desempenha um papel importante na homeostase oral, neutralizando o pH, lubrificando a cavidade oral, protegendo a mucosa oral de estímulos nocivos (bactérias e vírus, etc) e auxiliando na digestão de alimentos (Diaz-Arnold & Marek, 2002). A hipossalivação da glândula salivar acompanhada de sensação subjetiva de boca seca (ou xerostomia), é uma condição clínica em que a produção de saliva é bastante reduzida, causando desconforto durante a mastigação, fonação, cárie dentária e comprometimento de microbiomas orais (Jensen *et al.*, 2010). A radioterapia da cabeça e pescoço (Jensen *et al.*, 2010) e outras condições sistémicas comuns, incluindo doenças autoimunes (síndrome de Sjogren, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e doença

granulomatosa), metabólicas (diabetes mellitus não controlada) e doenças do sangue (anemia), podem resultar em xerostomia. Nos pacientes com hipossalivação, o alívio da sua sintomatologia é difícil de alcançar, uma vez que, se trata de um dano irreversível nos compartimentos epiteliais secretores e neuronais (Ferreira *et al.*, 2016). Esta condição apresenta efeitos prejudiciais orais ao longo da vida, incluindo infecções, edema da mucosa, dor, sensação de sabor alterada, podendo mesmo levar indiretamente à perda de dentes (Diaz-Arnold & Marek, 2002).

Estudos recentes demonstraram que o transplante de células-tronco/ progenitoras epiteliais autólogas derivadas de GS podem promover a regeneração das glândulas salivares e restauração funcional (Lombaert *et al.*, 2017). Mesmo que as células-tronco epiteliais derivadas de GS autólogas sejam uma fonte celular ideal para reparo/ regeneração de glândulas danificadas (Maimets *et al.*, 2016; Nanduri *et al.*, 2014; Pringle *et al.*, 2016), o número limitado de células, particularmente em pacientes idosos ou comprometidos, e a dificuldade de cultura e expansão, *ex vivo*, constituem algumas das principais limitações desta terapia. Estudos anteriores demonstraram que, as células-tronco não salivares, particularmente diferentes tipos de células não epiteliais, incluindo células-tronco embrionárias (ESCs), células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) e células-tronco mesenquimais (MSCs), também exibem efeitos benéficos sobre reparação/ regeneração de tecido danificado (Lombaert *et al.*, 2017). Estas células-tronco não epiteliais demonstraram diferenciar-se em células acinares estruturais e funcionais quando co-cultivadas com células da GS, *in vitro*, ou após transplante para um tecido danificado (Lin *et al.*, 2011), e, portanto, substituir parcialmente as células da GS danificadas ou perdidas.

Recentemente, a engenharia de tecidos de GS com o uso combinado de células-tronco/ progenitoras, *scaffolds* biológicos ou sintéticos biocompatíveis/ biodegradáveis tridimensionais e fatores de crescimento foram relatados como uma potencial abordagem terapêutica para reparo /regeneração de GS hipofuncional (Lombaert *et al.*, 2017). Têm sido propostos vários modelos de auto-organização recém-estabelecidos de células da glândula submandibular (SMG), que levam à formação de uma estrutura semelhante, organizada, a partir de esferóides e organóides (Ferreira *et al.*, 2016; Pringle *et al.*, 2016).

6. Epitélio Lingual e botões gustativos das papilas linguais

A língua é um importante órgão digestivo e sensorial que tem múltiplas funções, sendo determinante na ingestão dos alimentos e no paladar. A superfície da língua é coberta por camadas de células epiteliais escamosas estratificadas. O epitélio dorsal lingual contém 4 tipos de papilas: filiformes, fungiformes, foliadas e circunvaladas. As papilas gustativas são consideradas órgãos independentes da língua (Gao *et al.*, 2021). Os botões gustativos são aglomerados de células sensoriais polarizadas incorporadas em três das papilas gustativas, nomeadamente papilas circunvaladas (CV) e foliadas (FL) na região posterior da língua, bem como papilas fungiformes (FF) na região anterior da língua (Barlow, 2015).

Com base na classificação morfológica e funcional, existem três tipos principais de células gustativas numa única papila gustativa (Yarmolinsky *et al.*, 2009). O Tipo I são células gustativas indiferenciadas e imaturas, marcadas por NTPDase2 que converte ATP em ADP, pois o ATP de células recetoras gustativas ativa recetores purinérgicos em aferentes sensoriais gustativos (Vandenbeuch *et al.*, 2013). As células do tipo II expressam os recetores gustativos acoplados à proteína G, detetando sinais doces, “umami” (saborosos/deliciosos) e amargos, levando à libertação de ATP quando estimuladas (Taruno *et al.*, 2013). As células gustativas do tipo III são responsáveis pela transdução de estímulos de sal e ácido e fazem contatos sinápticos convencionais nas fibras nervosas aferentes (Huang *et al.*, 2006).

Ainda não está clara a localização das células-tronco epiteliais linguais (LECs), no entanto, acredita-se que estejam localizadas na camada basal do epitélio lingual (Hisha *et al.*, 2013). Recentemente, células Bmi1-positivas isoladas da camada basal do epitélio lingual têm sido usadas para estabelecer organóides do epitélio lingual, que são considerados um tipo de células-tronco epiteliais linguais (LESCs) (Hisha *et al.* 2016).

7. Objetivos

O objetivo desta revisão sistemática é avaliar a evidência científica publicada sobre a utilização da técnica organóide na regeneração/ recuperação de tecidos orais lesados ou perdidos. Para a realização deste trabalho, foram reunidos estudos *in vitro*, relativos a estratégias de construção de organóides orais. Pretende-se, portanto, responder à questão: serão os “Organóides: o futuro da Medicina Dentária regenerativa?”.

II. Materiais e métodos

1. Definição da pergunta de pesquisa / Design do estudo

De acordo com as *Guidelines* do PRISMA, formulou-se a seguinte pergunta de investigação, usando a nomenclatura PICO:

- **P** (população): ensaio celular *in vitro*;
- **I** (Intervenção/ exposição): desenvolvimento/ regeneração e avaliação de órgão/estrutura da cavidade oral;
- **C** (Comparação): estrutura/ órgão natural;
- **O** (*Outcome*): sucesso/ insucesso da intervenção;

2. Estratégias de Pesquisa Sistemática

A pesquisa sistemática foi realizada com recurso a quatro bases de dados digitais e universais: *B-on*, *PubMed*, *Web of Science* e *Scopus*.

As palavras-chave: “organoids”, “bioengineering”, “cell culture”, “salivary gland”, “tooth” e “tongue”, foram individualmente combinadas entre si com o intuito de se obter uma melhor perceção dos estudos pertinentes para a revisão sistemática da literatura.

Nas bases de dados utilizadas, aplicaram-se os operadores booleanos, tais como *AND* e *OR*, de forma a obter as combinações necessárias para a pesquisa objetivada (Cochrane Effective Practice and Organisation of Care, 2017).

Aplicaram-se as seguintes chaves de pesquisa:

- No *PubMed*: “=((organoids [MeSH] OR bioengineering [MeSH] OR cell culture) AND (salivary gland [MeSH] OR tooth [MeSH] OR tongue [MeSH]))” e adicionaram-se filtros como “Full text” e “2011-2021” e “english”, de forma a reduzir o número de artigos obtidos;
- No *B-on*: “(organoids OR bioengineering) AND (salivary gland OR tooth OR tongue)” e aplicaram-se os seguintes filtros “2011-2021”,

“English”, “Odontologia”, “Aplicar palavras relacionadas”, “Pesquisar também no texto integral dos artigos” e “texto integral”;

- No *Web of Science*: “TS=((organoids OR bioengineering OR cell culture) AND (salivary gland OR tooth OR tongue))” e os filtros aplicados foram “2011-2021”, “English”, “DENTISTRY ORAL SURGERY MEDICINE”, “CELL BIOLOGY” e “CELL TISSUE ENGINEERING”;
- No *Scopus*: “((organoids OR bioengineering OR cell culture) AND (salivary gland OR tooth OR tongue))” e os filtros aplicados foram “2011-2021”, “English” e “Dentistry”.

Também foi realizada a pesquisa manual de referências bibliográficas dos artigos revistos de forma a identificar potenciais artigos, não abrangidos pela estratégia de pesquisa previamente enunciada.

3. Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram definidos critérios de inclusão e exclusão, de maneira a realizar a pesquisa sistemática e responder à pergunta formulada. Encontram-se especificados na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Critérios de inclusão e exclusão aplicados na pesquisa para a revisão sistemática.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Estudos <i>in vitro</i>	Revisões narrativas ou sistemáticas Estudos que não referenciassem, especificamente, a utilização da técnica organóide, a partir de várias linhagens celulares, em Medicina Dentária

4. Seleção de Estudos

Depois de realizada a pesquisa sistemática, foi efetuada uma triagem criteriosa que incluiu apenas os artigos que respeitavam os critérios de inclusão, referenciados

anteriormente. Posteriormente, foram removidos os duplicados com recurso a um gestor de referências (Zotero, versão 5.0.95.1) e analisaram-se os títulos e respetivos resumos e realizada a leitura integral dos artigos, em caso de inclusão. Simultaneamente, foi realizada uma pesquisa manual na bibliografia dos artigos incluídos. Foram apenas revistos os artigos escritos em inglês, tendo a pesquisa ficado restrita a publicações dos últimos dez anos (2011-2021). Aqueles artigos que não se encontravam dentro dos critérios estipulados, foram excluídos.

5. Recolha e Processamento de dados

Três revisores independentes avaliaram os títulos e os resumos dos estudos e foram coletados dados do texto integral dos artigos incluídos. Os dados retirados foram os seguintes: autor(es), ano do estudo, tipo de célula, *scaffold*, método de cultura, resultados, marcadores e técnica, pontes fortes e limitações do estudo. Discordâncias durante a seleção do estudo, extração de dados e a avaliação da qualidade foram resolvidas por discussão entre os revisores.

6. Avaliação da qualidade dos estudos e Avaliação do Risco de Enviesamento

De forma a avaliar o risco de viés, foi utilizada a ferramenta *Quality assessment tools for in-vitro studies (version 2)* (Cramond *et al.*, 2016), constituída por 17 perguntas, agrupadas em sete domínios (D1, D2, D3, D4, D5, D6 e D7), que se encontram no **Anexo II**. Cada uma destas perguntas foi classificada como “Sim” (*Yes*), “Não” (*No*) e “Não está claro” (*Unclear*), sendo que o “Sim” (*Yes*) é considerado baixo risco de viés, “Não” (*No*) é considerado de alto risco de viés e “Não está claro” (*Unclear*) corresponderia a risco de viés intermédio. Considera-se que o risco de enviesamento é alto na coluna *overall* quando existem dois ou mais resultados classificados com “não” (*no*).

Sempre que existe um estudo classificado com “*No Information*” em um ou mais resultados, é classificado na coluna do *overall* como “Incerto”. Os resultados obtidos a partir destas perguntas, foram seguidamente colocados sobre forma de gráfico de barras empilhadas (*summary plot*) e tabela de dupla entrada (*Traffic light plot*), realizados nos programas *Microsoft Excel* e *Robvis* (McGuinness & Higgins, 2020).

III. Resultados

1. Resultados da estratégia de pesquisa

Tal como descrito na **Figura 3**, foram identificados 3797 resultados, referente a pesquisas efetuadas nas bases de dados universais previamente selecionadas, tendo obtido os seguintes resultados *PubMed* (n= 718), *B-on* (n= 1447), *Web of Science* (n= 1301) e *Scopus* (n= 331). Posteriormente, os resultados foram exportados para o Zotero, onde os duplicados foram removidos, restando 3210 artigos. Depois da leitura do título e do resumo dos artigos, foram incluídas 85 referências. Seguindo os critérios de inclusão e exclusão, 51 estudos tiveram que ser excluídos, levando a um total de 34 incluídos. Depois de revista a bibliografia dos artigos incluídos, foram adicionados 5 artigos manualmente, perfazendo o total de 39 artigos que foram revistos, sintetizados ao longo do trabalho.

2. Síntese qualitativa da Evidência

Os 39 artigos que se encontravam de acordo com os critérios de inclusão, foram divididos em três grupos distintos de utilização da técnica organóide, na cavidade oral: organóides do germén dentário (n= 6), organóides da glândula salivar (n=21), organóides do epitélio lingual e botões gustativos (n=12). Os estudos e as suas características encontram-se especificadas na **Tabela 2**, **Tabela 3** e **Tabela 4**.

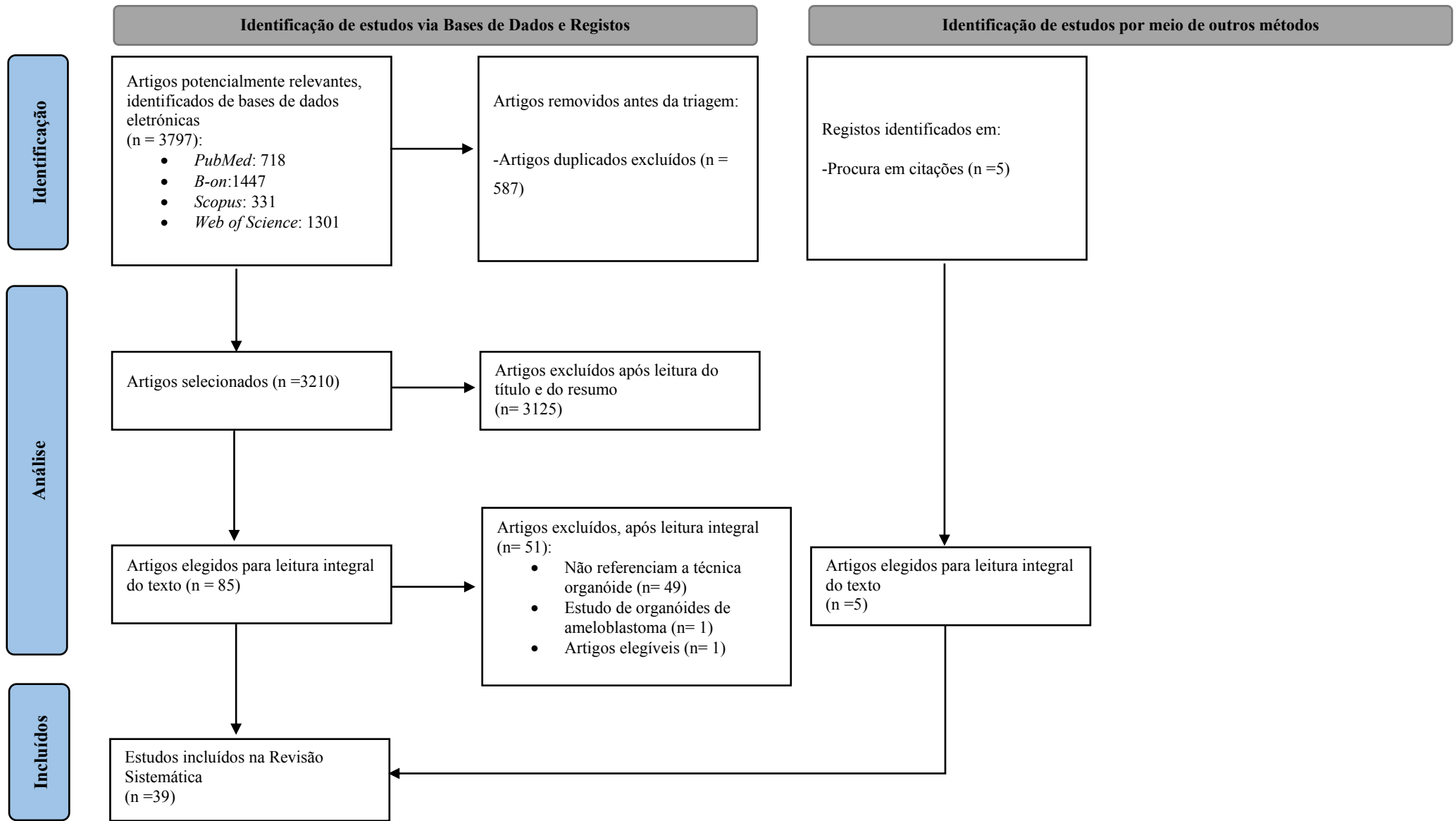


Figura 3- Fluxograma de acordo com as *guidelines* PRISMA.

2.1. Tabelas da revisão sistemática

Tabela 2 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide do gérmen dentário.

Resumo das várias estratégias de construção organóide do gérmen dentário							
Referência	Tipo de célula	Scaffold	Método de cultura	Resultados	Marcadores e técnica	Pontos fortes	Limitações
Athanassiou-Papaefthymiou <i>et al.</i> , 2015	células integrina- $\alpha 6$ + ve hERM e células estaminais mesenquimais da polpa	Matrigel / PLGA	As células hERM integrina- $\alpha 6$ + ve foram expandidas e inseridas numa cultura 3D definida. Foi realizado o seu co-transplante subcutâneo, com células estaminais mesenquimais da polpa, em PLGA.	Formação ossículos heterotópicos totalmente mineralizados, <i>in vivo</i> que apresentavam dentina, esmalte, cimento e osso.	ICC: OCT4, NANOG, SOX2, LGR5 e RING1B; TEM: mostrou depósitos minerais característicos de dentina, cimento, esmalte e osso, bem como vesículas secretoras, mineralização de áreas ricas em fibras de colagénio, espículas acelulares dentro do tecido mineralizado e estruturas trabeculares do osso	Constitui um avanço em direção ao sucesso da engenharia de tecidos, levando à formação de um tecido mineralizado complexo, a partir da utilização de células progenitoras epiteliais e mesenquimais, que medeiam o desenvolvimento dentário	Não refere
Bazina <i>et al.</i> , 2021	Queratinócitos orais murinos imortalizados	Não foi utilizado	As células IMOK foram tratadas com TGF- $\beta 1$, cresceram numa cultura 3D definida, na presença de serotonina. Após a mineralização, os cristais recém-formados foram densificados sob pressão e vácuo	Formação de organóides que estabeleceram uma matriz rica em amelogenina. Os cristais depois de densificados, produziram um material semelhante ao esmalte, que demonstrou alinhamento paralelo de cristais de hidroxiapatite, semelhantes a prismas de esmalte com propriedades mecânicas comparáveis ao esmalte dentário como translucidez de luz	ICC: o ligante 5-HT da serotonina foi localizado próximo ao esmalte do gérmen dos molares em desenvolvimento, e o recetor HTRb2, foi identificado em ameloblastos, dentro do esmalte; observação de esmalte biomimético, rico em amelogenina	A serotonina é indutora no desenvolvimento de um material biomimético semelhante ao esmalte a partir de queratinócitos epiteliais orais reprogramados, <i>in vitro</i> . A facilidade de colheita de células somáticas adultas, oferece oportunidades empolgantes para enfrentar os desafios regenerativos ligados à perda de esmalte	Não refere
Binder <i>et al.</i> , 2020	Células-tronco epiteliais e mesenquimais de	Matrigel	Suspensão única de células epiteliais, suplementada por Shh, cultivada em condições não aderentes. Co-cultura 3D de	As células formaram esferas de tamanho variável, incluindo esferas maiores semelhantes a organóides e	PCM: as células geraram esferas com compartimentos mesenquimais e epiteliais claramente distinguidos dentro das esferas. Foram detetadas	Permitiu o fornecimento das etapas necessárias para a formação de esmalte, que até agora	Não refere

	camundongos adultos		células epiteliais e mesenquimais adultas	esferas menores altamente celulares. A co-cultura de células-tronco epiteliais e mesenquimais demonstrou que pode ser usada para gerar ameloblastos <i>in vitro</i> e geraram um novo modelo de repórter transgênico, Enamelin-tdTomato, que permite a identificação de ameloblastos diferenciados, em tecidos vivos	células produtoras de amelogenina no compartimento epitelial, pré-ameloblastos. Uma faixa de coloração com laminina sugeriu a formação de membrana basal ao redor das células epiteliais; ICC: EpCAM+, Amelogenina, SOX2+ e laminina		ainda não tinha sido produzido <i>in vitro</i> , a partir de células-tronco
Jeong <i>et al.</i> , 2020	hDPSCs	Matrigel	Método de cultura flutuante para células da linhagem mesenquimal, em diferentes condições de cultivo	Formaram-se condensados esféricos, que se diferenciaram e geraram organóides semelhantes à dentina-polpa. Após aplicação de Biodentine®, o organóide apresentou agregação celular mais rápida, apresentado um formato irregular e cor mais densa, quando comparado sem aplicação	micro-CT: mineralização no grupo ODM11; EM: Visualização de matriz calcificada na superfície do organóide com presença de um túbulo e de odontoblastos <i>like-cells</i> com uma forma alongada, com estruturas celulares (N, G, RER, M), na zona periférica. Na presença de Biodentine®: Coloração H&E: ODM11- aumento da formação de colagénio; IF: ODM11- DMP-1+ e PHEX+	A estrutura organóide obtida apresentou células viáveis de serem reconstruídas, após dissociação	Não se pode definir com certeza, a aplicabilidade dos organóides semelhantes à polpa dentária, na regeneração de tecido dentinário e pulpar, porque não se verificou o seu efeito <i>in vivo</i>
Rosowski <i>et al.</i> , 2019	hDPSCs e queratinócitos da gengiva humana	Não foi utilizado	Suspensão única de células epiteliais, numa proporção de 1:4, em relação ao número inicial de células, usado para condensação mesenquimal, cultivadas sob condições não aderentes, num meio apropriado para ambos os tipos de células	Formação de um organóide de um gérmen dentário semelhante ao equivalente humano, <i>in vivo</i> , reproduzindo as interações recíprocas comuns do desenvolvimento do dente	Coloração H&E: agrupamento de células dentro do condensado mesenquimal: centro acelular, mas rico em matriz extracelular, camada média com colagénio tipo IV e tipo I e vimentina e disposição em coluna, das células epiteliais internas, indicando a formação de uma camada basal epitelial. A camada externa com CK8/18+ e CK15+. Transcriptoma: SNAI1+ e SNAI2+	Células facilmente obtidas dos dentes do siso e da gengiva	Não foi transferido <i>in vivo</i> , pelo que o resultado da regeneração após transplante é incerto
Wang <i>et al.</i> , 2019	Células mesenquimais e células epiteliais do GD de um	Não refere	As células mesenquimais e as células epiteliais foram semeadas separadamente em poços de fixação ultrabaixa. Os dois tipos de esferóides celulares formados,	Inicialmente formaram-se esferóides de células epiteliais (esfera Ep) e esferóides de células mesenquimais (esfera Me). Quando em contacto,	IF: eGFP+	Um animal grande como o porco, parece ser um modelo promissor para estudar patologias humanas e terapias pré-	Não refere

molar (em fase inicial de sino-E50, fase de sino-E60 e fase secretora-E70)	foram misturados numa cultura em suspensão e transferidos para um meio de cultura próprio, para promover a interação dos agregados celulares.	levaram à formação de um organóide Ep-Me	clínicas devido à sua comparabilidade com humanos em muitos aspetos
--	---	--	---

Legenda: 5-HT, serotonina; DMEM, meio Eagle modificado de Dulbecco; EGF, fator de crescimento epidérmico; EM, microscopia eletrónica; FBS, soro fetal bovino; G, aparelho de golgi; GD, gérmen dentário; H&E, Hematoxilina/Eosina; hDPSCs, células da polpa dentária humana; hERM, células epiteliais humanas de Malassez; ICC, Coloração Imuno-histoquímica; IF, Imunofluorescência; IMOK, linha celular de queratinócitos orais murinos imortalizados; LACLS, alça cervical labial; M, mitocôndrias; MET, microscopia eletrónica de transmissão; micro-CT, micro-tomografia computadorizada; N, núcleo; PCM, microscópio de contraste de fase; PLGA, poli (ácido láctico-co-glicólico); qRT-PCR /PCR, reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real; RER, reticulo endoplasmático rugoso; TGF- β 1, fator de transformação de crescimento beta 1;

Tabela 3 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide da glândula salivar.

Resumo das várias estratégias de construção organóide da glândula salivar							
Referência	Tipo de célula	Scaffold	Método de cultura	Resultados	Marcadores e técnica	Pontos fortes	Limitações
Adine <i>et al.</i> 2018	hDPSC	Não foi utilizado	Bioimpressão magnética 3D com recurso a nanopartículas magnéticas que marcam as células e organizam-nas espacialmente em torno de pontos magnéticos. As células foram bioimpressas em esferas e cultivadas em meio de diferenciação epitelial suplementado com FGF10, de forma a recapitular a morfogênese epitelial SG e tratados com meios diferenciados neurogénicos (meio composto por DMEM enriquecido) de forma a recapitular a neurogênese	Esferóides diferenciados (organóides) com um compartimento epitelial polarizado semelhante a SG e propriedades funcionais neuroepiteliais, que podem permitir um fluxo unidirecional de saliva, mimetizando a SG normal. Também produziram α -amilase salivar após estimulação com FGF10, e mobilização de cálcio intracelular. Após o transplante de organóides da SG para área ductal excretora das glândulas em desenvolvimento, <i>ex-vivo</i> , os organóides resgataram significativamente o crescimento epitelial	Após suplementação com FGF10- IF: AQP5+, KRT5+, KRT4+ reduzido número de células PECAM-1/ CD31+. TEM: Células epiteliais com múltiplos grânulos secretores a interagir por meio de junções estreitas intercelulares e formação de lúmen	Os DPSCs são fáceis de obter; o uso de bioimpressão magnética tridimensional permite o arranjo espacial celular e a formação de esferóides em menos de 24h	A vascularização dos organóides é limitada
Athwal e Lombaert, 2019	linha celular SIMS, imortalizada de uma SMG de camundongo adulto	Matrigel	Mistura de Células/colagénio/matrigel cultivada em meio de diferenciação (Meio completo SIMS suplementada por EGF e FGF2)	Formação de um organóide da SG ao 5º dia de cultura, a partir de uma cultura simples	ICC: E-cad	A linha celular SIMS pode diferenciar-se em células acinares, mioepiteliais e ductais	Os componentes complexos do matrigel, dificultam o controlo das condições de cultura e podem reduzir a capacidade de reprodutibilidade
Cho <i>et al.</i> , 2021	Células epiteliais da SMG de murinos	Matrigel	Suspensão de célula única, onde foram removidos aglomerados de células específicos. As células foram incorporadas numa ECM suplementada, levando à formação de salisferas primárias que sofreram auto-renovação levando à formação de organóides. Foram desenvolvidos	Os organóides da SMG irradiada tornaram-se menores e mostraram menos ramificações, comparativamente aos organóides da SMG não irradiada. A presença de EGF promoveu o crescimento e inibiu a morte celular	Coloração H&E e PAS: preservação das estruturas acino-ductais no Grupo EGF+ comparativamente com o Grupo EGF-. MTC: Os grupos EGF+ exibiram menos periductais e peri-fibrose vascular do que o grupo EGF-. IF: aumento do nº de células KRT14 + e MIST1 +, no grupo EGF+ elevado,	A cultura organóide 3D pode ser usada para gerar um modelo de doença induzida por IR, para prever respostas a agentes terapêuticos radioprotetores.	Não refere

dois modelos de organóide da SMG de murino: um sujeito a radiação e outro não sujeito a radiação

apoptótica das células epiteliais salivares

comparativamente com os restantes grupos; a expressão de Ki67 em células progenitoras ductais KRT14 + e células pró-acinares AQP5 + aumentaram significativamente nos Grupos EGF+

Ferreira <i>et al.</i> , 2019	SGDCs de suínos	Não foi utilizado	Bioimpressão magnética 3D (levitação) com recurso a nanopartículas magnéticas (MNP) que marcam as células e organizam-nas espacialmente em torno de pontos magnéticos. As células foram bioimpressas em esferas e cultivadas em meio de diferenciação composto por DMEM	Agregados celulares levitados de múltiplas camadas, com mimetização dos compartimentos celulares das SG nativas e com função secretora específica, após estimulação colinérgica	BF: M3DL formou agregados de SGDC com uma morfologia esférica uniforme; IF: marcador de compartimentos epiteliais- NKCC1, CHR3, E-cad e EpCAM; marcadores ductais- KRT14, mioepiteliais- α SMA e neuronais- β 3-tubulina e ChAT	Ferramenta reprodutível e fácil de utilizar que permite a obtenção de organóides semelhantes a SG, num curto espaço de tempo	Necessidade de exploração das diferenças fenotípicas entre células primárias porcinas e humanas extraídas, bem como avaliar a eficácia dessas células na formação de organóides funcionais ou miniglândulas <i>in vitro</i>
Hosseini <i>et al.</i> , 2018	Células epiteliais e mesenquimais da SMG primária de camundongo E16	Matrigel	Aglomerados epiteliais E16 foram cultivados em co-cultura com mesênquima primário em meio simples (SM), meio mamário (MM) e numa mistura de 1:1	Aglomerados epiteliais cultivados num meio suplementado com FGF2, mas não com EGF, foram capazes de formar estruturas organóides salivares grandes e complexas exibindo estruturas semelhantes a AQP5 +, com um núcleo epitelial, parecido ao da SG nativa	Em ambos os ensaios, houve formação de organóides robustos com presença de AQP5 +, células mesenquimais bem organizadas em torno do epitélio, semelhante à arquitetura SMG nativa e Vimentina+. BF: a presença de Laminina-111, FGF2 e mesênquima, levou à expressão de AQP5, EpCAM e vimentina com DAPI	Não refere	FGF2 e laminina-111 estimula a ramificação e a diferenciação proacinar em organóides de glândulas salivares, na presença de mesênquima salivar E16
Hosseini <i>et al.</i> , 2019	Células epiteliais e células mesenquimais de SMG embrionárias de camundongo	Matrigel	Células são semeadas numa matriz 3D suplementada com FGF2	Construção de organóides salivares complexos que imitam a arquitetura do tecido nativo contendo células do mesênquima salivar que suportam a diferenciação celular, pró-acinar secretora, de células-tronco epiteliais salivares	ICC: EpCAM, AQP5, vimentina.	As células derivadas de SMG embrionário tem forte capacidade de auto-organização	Não refere
Koslow <i>et al.</i> , 2019	Células epiteliais de	Matrigel	Compararam a sobrevivência e o crescimento de aglomerados de	Formação de organóides salivares complexos com	ICC: organóides derivados de salisferas cultivadas em meio simp,	A expansão mediada por Y27632 de culturas de	Não refere

SMG adultas e mesênquima primário E16			células epiteliais isoladas de SMG em meio Simp, meio simp+Y27, meio Sali e meio Sali + Y27 e ainda num meio T0. Formaram-se salisferas que levaram à formação de organóides 3D, num meio simples com FGF2, mesênquima primário E16, ou ambos (Simp/Sali +/- Y27632 com Mes- ou Mes+). Compararam os organóides derivados de salisférios adultos ideais com os organóides proacinares, anteriormente gerados, a partir do tecido embrionário E16	diferenciação proacinar secretora	exibiram pouco AQP5, em meio Sali durante a fase salisférica exibiram um aumento modesto, mas significativo nos níveis de AQP5 quando cultivados com mesênquima FGF2 e E16, que foi ainda melhorado por Y27632. Em organóides derivados de salisferas cultivados em meio Sali, o tratamento com FGF2 aumentou a expressão de AQP5, enquanto em organóides derivados de salisferas cultivados em Sali + Y27632, FGF2 aumentou as células AQP5+. Os organóides derivados da salisférios adultos contêm células Kit+ e a diferenciação proacinar é dependente de FGF2 e mesênquima, a morfogênese e a diferenciação proacinar não são tão robustas quanto em organóides derivados de células embrionárias da glândula salivar	salisfério adulto facilita a formação de organóides salivares
---------------------------------------	--	--	--	-----------------------------------	--	---

Maimets <i>et al.</i> , 2016	células epiteliais EpCAM+ ductais das SG de camundongo	Matrigel	Suspensão de célula única com remoção de aglomerados de células específicas. As células foram subdivididas em três subpopulações: EpCAM+, EpAM +/-, EpCAM- e incorporadas numa ECM suplementada, onde foi adicionado Wnt3 e Rspo1 (WRY médio). Formaram-se salisferas primárias que foram novamente incorporadas numa ECM suplementada com meio enriquecido (EM), em combinação com DMSO (EM + DMSO) ou meio enriquecido com antagonistas de Wnt: IWR-1-endo (EM+ IWR-1), IWP-2 (EM+IWP-2) e sFRP-1 (EM+sFRP1). As salisferas primárias foram incorporadas em matrigel suplementado com meio WRY e sofreram auto-renovação	EpCAM+ geraram esferas que levaram à formação de estruturas semelhantes a organóides, denominadas mini-glândulas com eventos de brotação extensos. O transplante permitiu uma melhoria da morfologia geral e reaparecimento de tecido acinar funcional	ICC: estrutura lobular com lúmen distribuído uniformemente, ao longo de toda a mini-glândula, com CK18 + ductal, AQP5 + acinar, células mioepiteliais SMA- α + e células CK5+. EM: células acinares serosas, células acinares mucosas e células mioepiteliais que revestiram a membrana basal	Wnt têm um papel importante na auto-renovação de SGSC e promove a sua expansão, a longo prazo, na cultura. A expansão <i>in vitro</i> e o transplante de SGSCs, podem ser uma opção promissora para pacientes com hipofunção grave da glândula salivar	Necessidade de realização do mesmo estudo em humanos
------------------------------	--	----------	--	--	--	--	--

Nanduri <i>et al.</i> , 2014	células-tronco de GS murinas adultas	Gel de colagénio e matrigel	As células foram digeridas enzimaticamente, seguido de etapas para formação de esferas secundárias, auto-renovação por replicação contínua e ensaios de diferenciação em matrigel / colagénio suplementado com meio MM	Formação de esferas que sofreram mudanças morfológicas, levando ao desenvolvimento de estruturas semelhantes a organóides ductais e lobulares. As células expandidas foram capazes de formar mini-glândulas/ organóides contendo várias linhagens de células SG	Fotomicrografia: os organóides ductais continham lúmen e estavam rodeados por células CK7+ e CK18+. Os organóides lobulares eram desprovidos de extensões tubulares, mas continham estruturas compactas e redondas, semelhantes a lóbulos, que expressavam AQP5+	Células que expressam CD24+ e CD29+ podem ser isoladas e ser capazes de restaurar com eficiência a função SG danificada por radiação	Não refere
Orhon <i>et al.</i> , 2021	SGSCs de camundongos	Matrigel	SGs isoladas foram mecanicamente e enzimaticamente dissociadas, cultivadas numa ECM e incubados num meio de auto-renovação levando ao desenvolvimento de organóides primários e organóides secundários	Organóides Atg5 +/+ e Atg5 +/- mostraram um fluxo autofágico funcional, enquanto os derivados de atg5 -/- SGs embrionários exibiram um bloco de autofagia completo. Atg5 -/- camundongos mostraram um potencial de auto-renovação menor em comparação com células Atg5 +/+ e Atg5 +/- competentes para autofagia, após a dissociação inicial	IF/ ICC: LC3, SQSTM1, ATG16L1, AQP5 e BrdU	A autofagia está envolvida na manutenção e / ou diferenciação de várias células-tronco, <i>in vitro</i> . A autofagia basal é significativamente diferente entre as células-tronco e progenitoras <i>in vivo</i> e o fluxo autofágico basal dos SGSCs é significativamente aumentado após a indução da proliferação em ambas as culturas organóides 3D e SGs dos animais, após a lesão	Não refere
Pringle <i>et al.</i> , 2016	Células-tronco / progenitoras SG humanas	Matrigel e colagénio	SGs isoladas foram mecanicamente e enzimaticamente dissociadas, cultivadas numa ECM e incubados num meio de auto-renovação e diferenciação, e transplantados para camundongos irradiados	Formação de salisferas da SGs humana que contém células-tronco / progenitoras, levando à formação de organóides de várias linhagens, com capacidade de restaurar a produção de saliva e melhorar o potencial regenerativo de SGs irradiados	Coloração H&E: o organóide formado apresentou estruturas ductais e acinares; ICC: CK+ e AQP5 na zona central e CK- e AQP5+ na zona periférica do organóide e expressão de α -amy nas células periféricas; Após o transplante: ICC: PKH26 +, CK+ e AQP5+ e α -amy	Potencial terapêutico promissor de células-tronco / semelhantes a progenitoras hSG cultivadas a partir de material de biópsia para o tratamento de hipossalivação induzida por radiação	Necessidade de um transplante autólogo
Pringle <i>et al.</i> , 2018	SGSCs	Matrigel	As células foram isoladas de amostras da parótida, de pacientes classificados como tendo SS primária ou SS primária incompleta e sujeitas a ensaios de auto-	No controlo (saudável): houve formação de organóides maduros de SGSCs, que expressaram α -amy; no com SS primário: houve capacidade	PCR quantitativa e ICC de organóides SGSC de controle saudável expressam recetores para as citocinas pró-inflamatórias IFN α , TNF e IL-6	Fenótipo de envelhecimento como um potencial agente causador da falta de reparo de SG na SS primária	Não refere

			renovação e diferenciação	diminuída de formação de organóides maduros			
Serrano Martinez <i>et al.</i> , 2020	Células-tronco da PG de murino adulto	Matrigel	As células foram colocadas em meio definido, de forma a avaliar o potencial de auto-renovação e diferenciação. Células individuais foram irradiadas e plaqueadas num ensaio de sobrevivência de células-tronco clonogénicas 3D, para avaliar a resposta à radiação da PG e SMG	Formação de organóides em meio WRY. Os organóides da PG murina abrigam células-tronco com potencial de expansão e diferenciação de longo prazo. PG e SMG, <i>in vitro</i> , apresentaram radiosensibilidade celular semelhante. Wnt reconhecido como um dos principais impulsionadores da formação organóide	IF: β -cat, CK14, AQP5, CK8 e Amy. FACS: não detetou a presença de células CD24/ CD29	Células-tronco PG murinas foram facilmente obtidas	Não foram utilizadas células humanas e não foi realizado num modelo <i>in vivo</i>
Shin <i>et al.</i> , 2018a	Células-tronco da SG humana	Não foi utilizado	Duas etapas de preparação e diferenciação: 1) as células são pré-condicionadas para serem agregadas para formar esferóides 3D em micropoços com DMEM suplementado com 10% de FBS; 2) foi induzida a sua diferenciação e montagem em organóides, cultivando em meio hepato-STIM sem soro suplementado com EGF, em meios de cultura 2D e 3D (micropoços, matrigel e cultura flutuante)	Obtiveram-se mais esferóides com maior diâmetro e maior excreção de α -amy, em micropoços. Organóides fenotipicamente e funcionalmente relevantes para tecidos epiteliais das glândulas salivares. Os organóides enxertados com sucesso nas glândulas salivares recetoras apresentaram neovascularização e expressão de AQP5 e CK18	RT-PCR: POU5F1, NANOG, LGR5, THY1, mRNA de ITGB1, HAS e KRT5 mostrou um aumento dependente do tempo, o que indicou o início da função em SGSCs. IF: CK7, E-cad, ZO-1 e Amy. Análise de Western Blot: Amy, AQP5, E-cad, ZO-1, CK7, CK18, OCT4, SOX2, NANOG, LGR5, CD90 e KRT5; Medição de Ca ²⁺ intracelular: os organóides, cultivados nos micropoços, foram os que observaram maiores aumentos; Medição do pH intracelular (Cl ⁻ / HCO ₃ ⁻): aumentaram significativamente, nos organóides cultivados nos micropoços	Sistemas de cultura em micropoços não necessitam da adição de fatores de crescimento	Não foi determinada a sua real aplicabilidade na modelagem de doenças, testes de fármacos ou edição genética derivado de pacientes
Shin <i>et al.</i> , 2018b	clones de hPECs e células-tronco mesenquimais	Matrigel/ PLC	Sistema de cultura de micropoços nanofibrosos com micropadrões de hidrogel. As células foram colocadas em micropoços, lavadas, destacadas e neutralizadas com meio de cultura celular. As células dissociadas foram contadas, plaqueadas, cobertas por matrigel e cultivadas em meio de diferenciação. Co-cultura organotípica 3D e transplante <i>in vivo</i>	Formação de estruturas esferóides que posteriormente sofreram diferenciação, levando à formação de organóides da SG	IF: α -AMY, AQP5, TJP1 e E-cad. PCR: α -AMY e AQP5, TJP1 e CDH1. Western blotting: α -AMY, AQP5, TJP1 e E-cad. Após transplante: PCR: α -AMY, AQP5, POU5F1, SOX2, LGR5, THY1 e BDNF, GDNF, EGF, IGF1 e NGF	A cultura de esferóides 3D de SGSCs em micropoços nanofibrosos promove propriedades de células-tronco por meio da ativação da sinalização Wnt	Não refere

Sui <i>et al.</i> 2020	hSMGepiS/PCs e mesênquima de uma SG embrionária de camundongo E12.5	Matrigel	A suspensão de células foi injetada no matrigel suplementado com FGF10. Transplante heterotópico	hSMGepiS / PCs isolados podem ser cultivados a longo prazo com um genoma estável. Os organóides tratados com FGF10, exibiram maior expressão de marcadores específicos da SG, melhor arranjo espacial de células e elevada sensibilidade à estimulação por neurotransmissores. Após o transplante, as esferas celulares induzidas combinadas com o mesênquima da glândula salivar embrionária de camundongo, mostraram características de glândulas salivares maduras, morfologia natural e secreção de saliva	IF: K19, α -SMA, E-cad+, AQP5 +, Mist1 e α -AMY. Coloração de H&E: presença de estruturas do tipo acinar e do tipo ductal; Coloração de PAS e coloração de MTC: apresentaram uma estrutura intersticial com fibras de colagénio	FGF10 promoveu o desenvolvimento de organóides da SG derivados de hSMGepiS / PC com morfologia semelhante e resposta a neurotransmissores. SG quase fisiológica com estrutura correta e função secretora foi regenerada <i>in vivo</i> , a partir do mesênquima da SG embrionária de camundongo	Necessidade de FGF10 para o seu desenvolvimento
Takada <i>et al.</i> , 2021	células derivadas de ACC salivares humanas e de ACC derivados de PDX	Matrigel	A suspensão preparada foi colocada numa placa revestida por matrigel suplementada por EGF e incubada. O meio foi removido e os organóides primários foram revestidos com GFR. As células com o matrigel recolhido da placa, foram digeridas, pipetadas e colocadas em meio de diferenciação. Foi adicionado Y-27632 ao meio. Transplante ortotópico	Formação de organóides derivados de ACC humano, utilizado como modelo de tumor <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Esses organóides recapitularam as características histológicas e moleculares do tumor ACC original. Formação de organóides de PDX	O sucesso do transplante foi confirmado por coloração H&E e Microscopia de campo claro	Ferramenta útil como modelo pré-clínico, fornecendo luzes sobre a compreensão da biologia do tumor ACC, podendo proporcionar uma terapia personalizada para pacientes com essa doença ou outras doenças malignas, até agora inacessíveis de prever a eficácia de fármacos, devido à falta de modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Xenoinxerto ortotópico ACC exigiu um longo período para induzir a formação de um tumor com um determinado tamanho, sugerindo que este poderá não ser o sistema ideal para experiências pré-clínicas <i>in vivo</i>
Tanaka <i>et al.</i> 2018	ESCs com/sem mesênquima da SMG E13.5	Gel de colagénio	Agregações de células são induzidas na ectoderme oral a partir de suplementos como SB, BMP4, LDN e FGF2; Em seguida, as camadas externas infetadas com adenovírus que codificam Sox9 e Foxc I são	Formação de organóides da glândula salivar, a partir de PSCs, por meio de indução gradual, com secreção salivar, após transplante ortotópico. Após transplante de iSG com	IF- Pan-CK, K18, AQP5, α -SMA, CHRM1 e CHRM3.; após transplantação: -iSG sem mesênquima: Coloração H&E: e Coloração PAS: tinham estruturas como ducto e acinar; IF: AQP5, K18, K5, α -SMA, NKCC1,	Organogénese e maturação sem co-cultura de mesênquima	Necessidade de uma correta regulação e de grandes quantidades de fatores de crescimento

			cultivadas com FGF7 e FGF10. Transplante ectópico para camundongos	mesênquima, a SG não só mostrou morfologia e expressão genética semelhantes a uma SG embrionária de camundongos normais, como também exibiu características de glândulas salivares maduras, como secreção de saliva	Muc10, Amy, Mist1 e PSP. Apresentando pouca saliva quando estimulados. -iSG com mesênquima: AQP5 e K18. Apresentado boa quantidade de saliva quando estimulado		
Urkasemsin <i>et al.</i> , 2020	hDPSC	Não foi utilizado	Bioimpressão magnética 3D com recurso a MNP, permitindo a sua marcação e organização espacial, em torno de pontos magnéticos. As células foram bioimpressas em esferas e cultivadas em meio de diferenciação epitelial suplementado com FGF10, recapitulando a morfogênese epitelial SG e tratadas com meios diferenciados neurogênicos (meio composto por DMEM enriquecido) de forma a recapitular a neurogênese	Organóides epiteliais semelhantes a SG nativas com rede neuronal que responde aos neuroestimulantes da saliva	Não refere	O uso de bioimpressão magnética 3D permite o arranjo espacial celular e a formação de esferóides em menos de 24h	Não refere
Xu <i>et al.</i> , 2017	hDF-EpiSCs	Matrigel	As células foram colocadas numa matriz 3D e cultivadas em condições de indução de células SG, enquanto as culturas 3D em condições regulares de cultura de células epiteliais, serviam de controle. As células foram injetadas em estruturas nativas acelulares de PG de rato e transplantadas para a cápsula renal de camundongos	As células incorporadas na matriz proliferaram, formaram agregados e desenvolveram-se em estruturas ramificadas, após indução, levando à formação de organóides da SG. hDF-EpiSCs transplantados com substrato de glândula parótida nativa são capazes de se diferenciar em células semelhantes a acinares de SG <i>in vivo</i>	IF e Western Blot: AQP5, CK19, E-cad, α -amilase e α -SMA. Após transplante: Coloração H&E: as matrizes acelulares, foram repovoadas com células; IF: as células expressaram AQP5 e α -amy	DF-EpiSCs pode ser uma fonte promissora de células-tronco epiteliais para o desenvolvimento de terapias para reparar/regenerar uma lesão na SG e restaurar a função salivar	Não refere
Yoshimoto <i>et al.</i> , 2020	Células derivadas da SMG	Matrigel	As células isoladas das glândulas salivares humanas foram cultivadas em CM com inibidores Alk: LDN193189 (L) e SB431542 (S). Em condições de cultura CM/LS+,	Formação de organóides com ramificação aumentada, em CM/LS+, com espaços ociosos centrais, semelhantes a SG humanas. A inibição da	VEM: formação de estruturas semelhantes a acinares. Coloração H&E: organóides com duas camadas de células, um revestimento interno de epitélio e células mucosas e um	Utilização de tecido de glândula salivar humana	Não refere

os organóides foram estabelecidos a partir de diferentes tipos de SG

sinalização de quinase semelhante ao recetor Alk é necessária para a formação organóide. O TNF- α inibe o aumento dos organóides

revestimento externo de células. ICC: AQP5, CK18 e α -SMA/ ACTA2, ZO-1, SOX9 e P63

Legenda: 2D, dimensional; 3D, tridimensional; ACC, carcinoma adenoide quístico; AMY, α -amilase; AQP5, aquaporina 5; Atg5, proteína-chave no processo da autofagia; BDNF, gene que codifica o fator neurotrófico derivado do cérebro; BF, microscopia de campo claro; CDH1, gene com informação para a E-caderina; chAT, acetilcolina transferase; CHRM1, recetor colinérgico muscarínico tipo 1; CHRM3, recetor colinérgico muscarínico tipo 3; CM, meio completo; DMEM, meio Eagle modificado de Dulbecco; DMSO, dimetilsulfóxido; E-cad, E-caderina; ECM, matriz extracelular; EGF, fator de crescimento epidérmico; EM, meio enriquecido; EM, microscopia eletrônica; EM+DMSO, meio enriquecido com dimetilsulfóxido; EpCAM, molécula de adesão celular epitelial; ESCs, células-tronco embrionárias; FACS, análise de citometria de fluxo; FBS, soro fetal bovino; FGF10, fator de crescimento de fibroblastos 10; GDNF, proteína que promove a sobrevivência dos neurónios; H&E, coloração Hematoxilina/ Eosina; hDF-EpiSCs, células-tronco epiteliais humanas do folículo dentário; hDPSC, células-tronco da polpa dentária; hépato-STIM, meio definido por hepatócitos; hPECS, células epiteliais da parótida humana; hSGSCs, células-tronco da glândula salivar humana; hSMGepiS/ PCs, células-tronco epiteliais da glândula submandibular humana; ICC, Coloração Imuno-histoquímica; IF, Imunofluorescência; IGF1, fator de crescimento da insulina tipo 1; IL-6, interleucina 6; iSG, glândula salivar induzida; ITGB1/ CD29, integrina beta-1 K5/CK5/KRT5, queratina 5; K7/CK7/KRT7, queratina 7; K8/CK8/CKR18, queratina 8; K14/CK14/KRT4, queratina 4; K18/CK18/ KRT18, queratina 18; K19/CK19/CKR19, queratina 19; Lgr5, célula que expressa o recetor 5 acoplado à proteína G; M3DB, bioimpressão magnética 3D; Mist1, fator de transcrição da família bHLH; MNP, nanopartículas magnéticas; MTC, coloração com Tricômio de Masson; NANOG, fator de transcrição que permite as células-tronco manterem a pluripotência; NGF, fator de crescimento nervoso; NKCC1, proteína do canal iónico; P0, cultura primária; PAS, ácido periódico-Schiff; PCM, microscopia de contraste de fase; PDX, xenoenxerto de tumor derivado do paciente; PG, glândula parótida; PLC, policaprolona; POU5F1/Oct-4, proteína envolvida na auto-renovação celular; PSC, células-tronco pluripotentes; qRT-PCR/ PCR, reação em cadeia polimerase quantitativa em tempo real; sali, meio complexo sem soro; SG, glândula salivar; SGDCs, glândulas salivares primárias; simp, meio com soro simples; SMG, glândula submandibular; Sox2, fator de transcrição essencial na auto-renovação e pluripotência de células-tronco; SS, síndrome de Sjögren; T0, meio com células primárias em tempo zero; TEM, microscopia eletrônica de transmissão; THY1/ CD90, proteína de superfície celular; TNF, fator de necrose tumoral; VEM, microscópio eletrônico de varredura; Y27 / Y27632, inibidor seletivo ROCK; ZO-1 / TJP1, proteína de junção apertada; α -SMA/ ACTA2, alfa actina do músculo liso; β -cat, beta-catenina;

Tabela 4 - Resumo dos artigos incluídos na revisão sistemática: estratégias de construção organóide do epitélio lingual e dos botões gustativos.

Resumo das várias estratégias de construção organóide do epitélio lingual e botões gustativos							
Referência	Tipo de célula	Scaffold	Método de cultura	Resultados	Marcadores e técnica	Pontos fortes	Limitações
Aihara <i>et al.</i> , 2015	células-tronco Lgr5+ gustativas de camundongos transgênicos YC, FUCCI2 e H2B-EGFP	Matrigel	Tecido CV isolado foi suspenso numa matriz 3D e coberto com meio de crescimento adaptado para tecido das papilas gustativas (EGF, TGF-B e Noggin, R-spondin e Wnt3a). Sucessivamente digerido em células individuais e reincorporado em matrigel	Organóides gustativos com características fenotípicas semelhantes ao tecido gustativo nativo, como epitélio com múltiplas camadas, com células-tronco, nas camadas externas e células gustativas epiteliais diferenciadas, nas camadas internas; EGF, Noggin, R-spondin e Wnt3a necessários para a cultura organóide; os organóides derivados de células Lgr5 e CD44, expressaram todos os mRNAs de linhagem de células gustativas	RT-PCR: Lgr5+, CD44+, Sox9, NTPDase2, T1R1, T1R2, T1R3, Gustducina, SNAP25, TRPV1, TRPM5 e CaSR; TEM: células com comprimento de 40-50µm, com um núcleo localizado a nível basal e presença de lúmen no centro dos organóides	Existem dois tipos de ciclos de células-tronco, no nicho das papilas gustativas: células de ciclo rápido e de ciclo lento	Não refere
Guo <i>et al.</i> , 2019	Células-tronco Lgr5+ gustativas de camundongos transgênicos Lgr5-lacZ	Matrigel	As células suspensas foram incluídas numa matriz 3D e incubadas em meio DMEM/F12 suplementado. Os organóides formados foram submetidos a diferentes quantidades de radiação e, em seguida, tratados com inibidores de SIRT1 (NAM, EX527, sirtinol e salemida) e SIRT2	Organóides linguais foram desenvolvidos, <i>in vitro</i> , a partir de células-tronco isoladas, Lgr5 + e/ou Lgr6 +. Os organóides irradiados tiveram uma taxa de sobrevivência de 70%, para uma menor radiação e 37% para uma radiação mais elevada. Os inibidores de SIRT1 promoveram a sobrevivência das células-tronco Lgr5 +, das papilas gustativas e mitigam a RIOM em camundongos	Coloração LacZ: as células-tronco LacZ + são visíveis na base das papilas gustativas no tecido da papila CV	A inibição de SIRT1, e não SIRT2, pode promover a sobrevivência de células-tronco gustativas e mitigar a toxicidade oral induzida por radiação. Importante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a disfunção do paladar e ulceração da mucosa na RIOM	Não refere
Hisha e Ueno, 2019	LECs de camundongos adultos	Matrigel	Os LECS recolhidos foram colocados numa matriz 3D, previamente suplementada com EGF, Noggin e R-Spondin	Formação de três tipos de organóides diferentes: formato redondo, com arranjos de células concêntricas, de formato robusto e de formato redondo, com um	Coloração H&E: os organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas apresentaram estrato córneo. Organóides de forma robusta desenvolveram um grande	Não refere	Não refere

				arranjo de células reticuladas	lúmen central, com células mortas em picnose. Nenhum dos dois últimos tipos de organóides desenvolveu estrato córneo. Os organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas apresentaram CK5+, CK14+ na camada externa dos organóides, Ki67. TEM: presença de estrato córneo, no centro e células achatadas, ao redor do estrato córneo. Presença de grânulos de querato-hialina, fibras de queratina e grânulos lamelares, no citoplasma		
Hisha <i>et al.</i> , 2013	LECs de camundongos adultos	Matrigel	Os LECS recolhidos foram colocados numa matriz 3D, previamente suplementada com EGF, Noggin e R-Spondin	Formação de três tipos de organóides diferentes: de formato redondo, com arranjos de células concêntricas, de formato robusto e de formato redondo, com um arranjo de células. As células Bmi1-positivas têm a capacidade de gerar organóides. Os camundongos sujeitos ao carcinogéneo, levaram à formação de organóides anormais, ou muito grandes ou muito delgados	Coloração H&E: os organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas apresentaram estrato córneo. Organóides de forma robusta desenvolveram um grande lúmen central, com células mortas em picnose. Nenhum dos dois últimos tipos de organóides desenvolveu estrato córneo. Os organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas apresentaram CK5+, CK14+ na camada externa dos organóides, Ki67. TEM: presença de estrato córneo, no centro e células achatadas, ao redor do estrato córneo. Foi detetada a presença de grânulos de querato-hialina, fibras de queratina e grânulos lamelares, no citoplasma	Os organóides enxertados expandiram-se e atingiram a maturação, na camada muscular, das línguas recetoras; fornece uma estratégia valiosa não só para os mecanismos reguladores do epitélio lingual, mas também para o estudo da reconstituição lingual e carcinogénese lingual em camundongos e humanos	Os organóides enxertados não cresceram na camada epitelial, foi tecnicamente difícil injetá-los na área subepitelial
Lin <i>et al.</i> , 2021	células-tronco Lgr5+/Lgr6+ de camundongo	Matrigel	As células foram colocadas em meio de cultura definido, suplementado por EGF, Noggin, Wnt3a e R-spondin (Rspo1 ou Rspo2). O mesmo lote de células, foi dividido em dois grupos, para comparação do efeito da R-spondin na formação de células gustativas (presença e ausência de Rspo2). Foi adicionado Y-27632	R-spondina exógena promoveu a formação de células gustativas diferenciadas, no modelo GLx <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> , a partir de um sistema de cultura organóide	ICC e Microscopia confocal: Meio com Rspo2 continha células Car4+ e Trpm5-GFP+, demonstrando pelo menos uma célula semelhante a uma célula gustativa nativa (forma de fuso, núcleo esférico próximo do centro da célula)	R-spondin exógena pode substituir a entrada neuronal para o reabastecimento das células gustativas e manutenção das papilas gustativas	Não refere

Matsumoto <i>et al.</i> , 2019	células-tronco de CV de camundongos deficientes em Trpv4 KO e Células neuroepiteliais das papilas gustativas de camundongos selvagem (WT)	Matrigel	As células forma suspensas numa 3D e semeadas em placas de cultura com matrigel com meio DMEM / F12 condicionado por Wnt, R-espondina, EGF e Noggin	Desenvolvidos organóides, derivados de cada um dos camundongos WT e Trpv4 KO	ICC: Trpv4 KO apresentou baixo nível de expressão de células CAR4+, comparativamente com WT	TRPV4 está envolvido na percepção do sabor azedo, por diferenciação de células gustativas do tipo III	Não refere
Qin <i>et al.</i> , 2018	células-tronco Lgr5-GFP+ de camundongos transgênicos CKO e WT	Matrigel	Células foram misturadas com Matrigel e cultivadas em DMEM / F12 suplementado com Wnt3a, R-spondin, Noggin, N2, B27, Y27632 e FGF	Formação de organóides Gli3 CKO e organóides Gli3 WT. Gli3 é um supressor da proliferação de células-tronco gustativas que afeta o número e a função das células gustativas	ICC: TAS1R3 + aumentaram e células CAR4 + diminuíram; PCR: Tas1r3, Lgr5, Gna14 e Gnat3 aumentaram e a expressão dos genes Shh Gli1, Mycn, Jag2 e Ccnd2, diminuiu em organóides Gli3 CKO	O papel dos genes e das vias do sistema gustativo, podem ser estudadas com recurso a organóides gustativos, sem preocupação com os efeitos letais, <i>in vivo</i> . Pode ser obtido um grande número de células gustativas, a partir de organóides, úteis para a expressão de proteínas e estudos bioquímicos.	Por ser um sistema <i>ex vivo</i> , os organóides gustativos não são influenciados por sinais de outros tecidos
Ren <i>et al.</i> , 2014	células-tronco Lgr5+ e células-tronco Lgr6+ gustativas de camundongo transgênicos	Matrigel	Células progenitoras gustativas Lgr5 + isoladas foram incorporadas numa matriz 3D contendo fatores de cultura organóide para células-tronco intestinais, e então, cultivadas em meio definido, suplementado por fatores de crescimento como N2 e B27	As células-tronco gustativas Lgr5+ e Lgr6+ isoladas podem crescer em estruturas 3D "organóides", <i>ex vivo</i> , em condições de cultura definidas, com presença de células em proliferação e células gustativas maduras diferenciadas. Algumas dessas células funcionam como células recetoras gustativas que respondem a saborizantes. Quando os organóides foram replantados numa superfície 2D pré-revestida com laminina e polilisina, as células cresceram e	ICC: Gustducina, ca4, T1R3, NTPDse2+ e K8. Análise de BrdU: K5, Sox2 e BrdU. Ensaio de imagem de cálcio: as células cultivadas a partir de organóides gustativos derivados de células Lgr5 + isoladas eram funcionais e respondiam aos saborizantes de uma maneira dependente da dose. qRT-PCR demonstraram que Lgr5 e Lgr6 podem marcar o mesmo subconjunto de células-tronco / progenitoras gustativas	As células Lgr5 + dão origem aos três tipos principais de células gustativas. Tal como Lgr5, também Lgr6 marca células-tronco / progenitoras no tecido gustativo na língua anterior e posterior e pode gerar células gustativas maduras <i>ex vivo</i> . Células Lgr5 + e Lgr6 + únicas podem expandir-se e diferenciar-se em células semelhantes ao sabor <i>in</i>	Não refere

				os organóides fixaram-se na superfície plana, e algumas células retiveram os elementos de sinalização gustativa expressos e responderam aos estímulos gustativos		<i>vitro</i> , sem nicho mesenquimal ou conexão neuronal, o que sugere que essas células são intrinsecamente capazes de dar origem a todos os subtipos de células gustativas	
Ren <i>et al.</i> , 2020	células-tronco Lgr5+ gustativas de camundongos neonatais e adultos	Matrigel	As suspensões de células individuais foram cultivadas em meio de cultura definido (DMEM/F12, Wnt3a, R-spondin e Noggin), suplementado por FGF, N2, B27, penicilina-estreptomicina, HEPES, Glutamax e Y-27632, centrifugadas e incubadas	Organóides de papilas CV de camundongos adultos e neonatos exibiram capacidade diferencial para gerar células recetoras de sabor. Formação de organóides na língua anterior e posterior de camundongos neonatais com consecutivo desenvolvimento de células recetoras gustativas Car4+ e Gustducin+. A formação de células recetoras gustativas em organóides depende da idade e está associada com a modulação de sinalização múltipla	ICC: NTPDase2 +, K8 +, Car4+ e Gustducin+.	Vários fatores determinam a formação de células recetoras de sabor em organóides, incluindo o subtipo específico de células, o recurso do tecido gustativo, a idade do animal, a ativação e a inativação das vias de sinalização, bem como o <i>crosstalk</i> entre várias transduções de sinalização	Não refere
Shechtman <i>et al.</i> , 2021	células-tronco Lgr5+ de camundongos adultos	Matrigel	As células-tronco são semeadas num sistema de cultura 3D (meio próprio com EGF, Wnt3a, Noggin, R-spondin- meio WENR e Y27632), sofrem proliferação e sofrem diferenciação	Formação de organóides linguais com os três tipos de células gustativas e com células epiteliais não gustativas	RT-PCR: Kcnq1, KRT8 e KRT13; Células tipo I (marcadas por Entpd2) e células amargas do tipo II (marcadas por Gnat3) são altamente expressas, enquanto as células do tipo III de deteção de azedo (marcadas por Car4) são menos comuns	Ferramenta reprodutível e económica de triagem para fármacos específicos, para pacientes com disfunção gustativa	Não foi incorporada neovascularização nos organóides
Takai <i>et al.</i> , 2019	células-tronco Lgr5+ de camundongos	Matrigel	As células foram colocadas num meio específico (DMEM/F12, Wnt3a, R-spondin e Noggin) suplementado por EFF, suplemento sem insulina e penicilina-estreptomicina. Também foi adicionado Y-27632. Foi adicionada insulina, que ativou a via de sinalização de mTOR. Compararam-se dois	A partir de organóides gustativos, descobriram que a insulina, em meio de cultura, diminuiu significativamente o número de células gustativas e os níveis de expressão de mRNA de genes de células gustativas, de maneira dependente da concentração. A rapamicina, diminui os efeitos da insulina e aumentou a formação	qPCR: NTPDase2, Tas1R3 (T1R3), gustducina, CA4, GLUT8 e SGLT1	A insulina pode desempenhar um papel importante na diferenciação / proliferação das células gustativas. mTOR pode ser uma molécula chave na manutenção da homeostase da papila gustativa	Não refere

meios, um com insulina e outro com rapamicina (inibidor de mTORC1) de células gustativas

Vincent-Chong e Seshadri, 2020	células RP-MOC1 de camundongo	Matrigel	Foi avaliada a resposta à radiação de células RP-MOC1 em culturas 2D, 3D (modelo organóide) e <i>in vivo</i> , a partir de aloenxertos ortotópicos. Para a formação de cultura 3D, as células foram suspensas e semeadas em poços com meio definido. Esse meio foi suplementado com GlutaMAX, HEPES, Primocin, L-WRN, condicionado por fatores de sinalização Wnt3a, R-spondin-3 e Noggin, B27, N2, nicotinamida, N-Acetil-L-cisteína, FGF10 humano e EGF humano	LD50 baixo para células RP-MOC1, em cultura 2D, enquanto as culturas organóides 3D exibiram um LD50 mais alto e os tumores RP-MOC1 cresceram ortotopicamente no assoalho da boca. O modelo imunocompetente de OSCC, exibiu um perfil mutacional e histológico semelhante à doença humana	Microscopia de Campo claro: a cultura organóide RP-MOC1 para a radiação de 20 Gy resultou numa redução significativa do tamanho	Pode ser usado numa primeira etapa para a triagem <i>in vitro</i> de potenciais 'radiossensibilizadores' antes da avaliação <i>in vivo</i> . O modelo ortotópico <i>in vivo</i> também pode servir como uma ferramenta valiosa para examinar a atividade de novas estratégias imunoterapêuticas contra o OSCC. Pode ser usado para entender os mecanismos de resistência à radiação e inibidores do ponto de vista imunológico	Nenhum modelo experimental de tumor, pode recapitular totalmente as características da doença observadas em pacientes com CEC, nem nenhum modelo animal pode recapitular totalmente tumores humanos
--------------------------------	-------------------------------	----------	--	--	---	--	---

Legenda: BrdU, 5-bromo-2-desoxiuridina/ bromodeoxiuridina; Ca4, anidrase carbónica; CaSR- recetor extracelular sensível ao cálcio; CD44, glicoproteína da superfície celular; CEC, carcinoma das células escamosas; CV, papilas circunvaladas; EGF, fator de crescimento epidérmico; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; GLUT8, transportador de glicose 8; Gustducina, proteína G associada ao paladar e ao sistema gustativo; HEPES, agente tamponante de ácido sulfónico zwitteriônico; K18/CK18/ KRT18, queratina 18; LD50, dose letal mediana; LECs, células epiteliais linguais; Lgr5, célula que expressa o recetor 5 acoplado à proteína G; Noggin, inibidor da sinalização; NTPDase2, nucleosídeo trifosfato difosfolidase-2; OSCC, carcinoma epidermoide oral; RIOM, mucosite oral induzida por radiação; SGLT1, co-transportador 1 de sódio-glicose; SNAP25, proteína associada a sinaptossomas; Sox9, fator de transcrição; T1R1, recetor gustativo tipo 1 membro 1; T1R2, recetor gustativo tipo 1 membro 2; T1R3, recetor gustativo tipo 1 membro 3; TRPM5, membro 5 da subfamília M do canal de catiões; TRPV, recetor catiónico da subfamília V, membro 1; Y-27/ Y-27632, inibidor seletivo ROCK;

2.2. Resumo das estratégias de construção de organóides orais

Nas figuras abaixo estão representadas algumas das estratégias de construção de organóides dentários (**Figura 4**), organóides salivares (**Figura 5**) e organóides do epitélio lingual e botões gustativos (**Figura 6**).

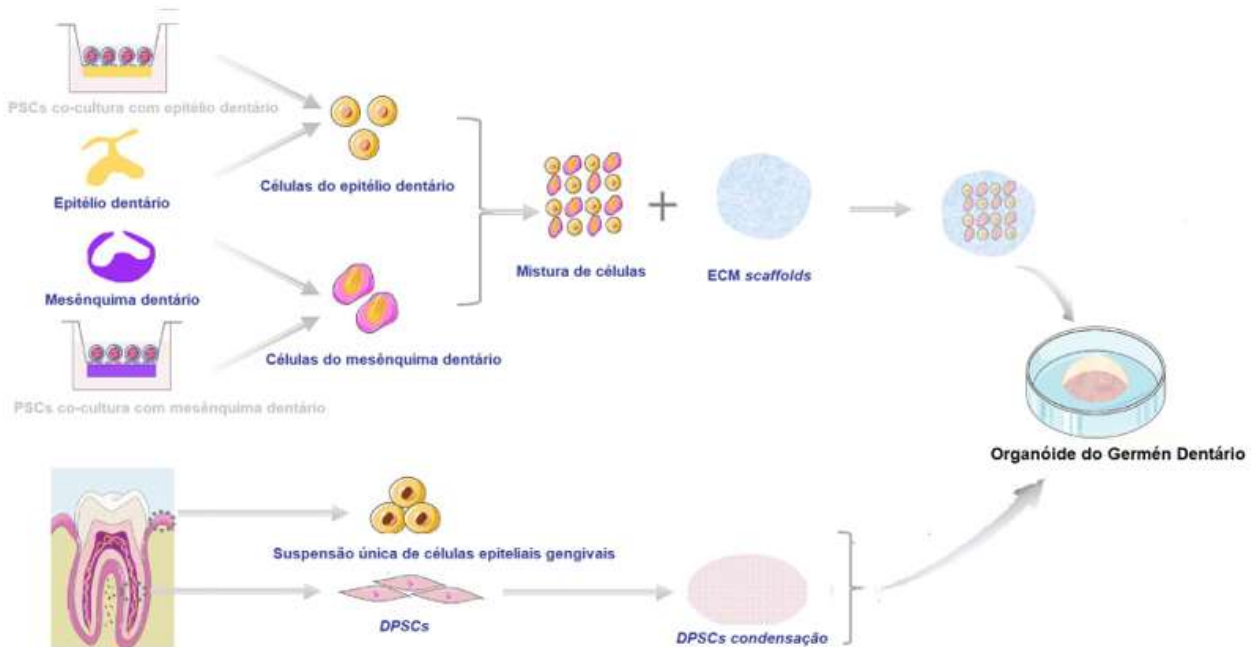


Figura 4- Diagrama esquemático da construção de organóides do germén dentário (Modificado de Gao *et al.*, 2021).

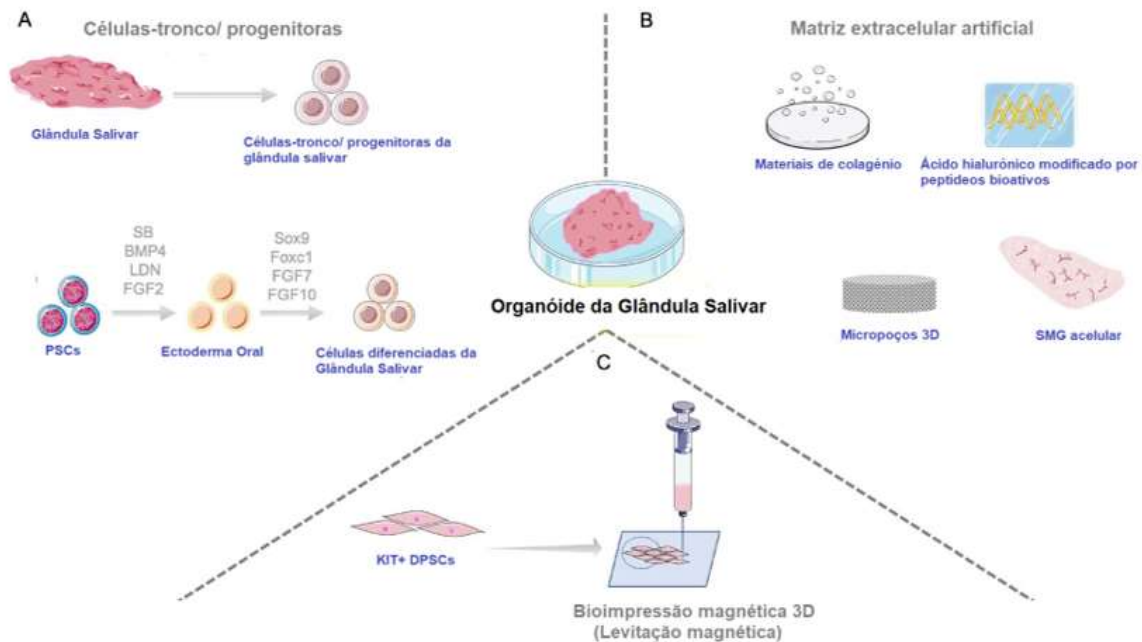


Figura 5- Diagrama esquemático da construção de organóides da glândula salivar (Adaptado de Gao *et al.*, 2021).

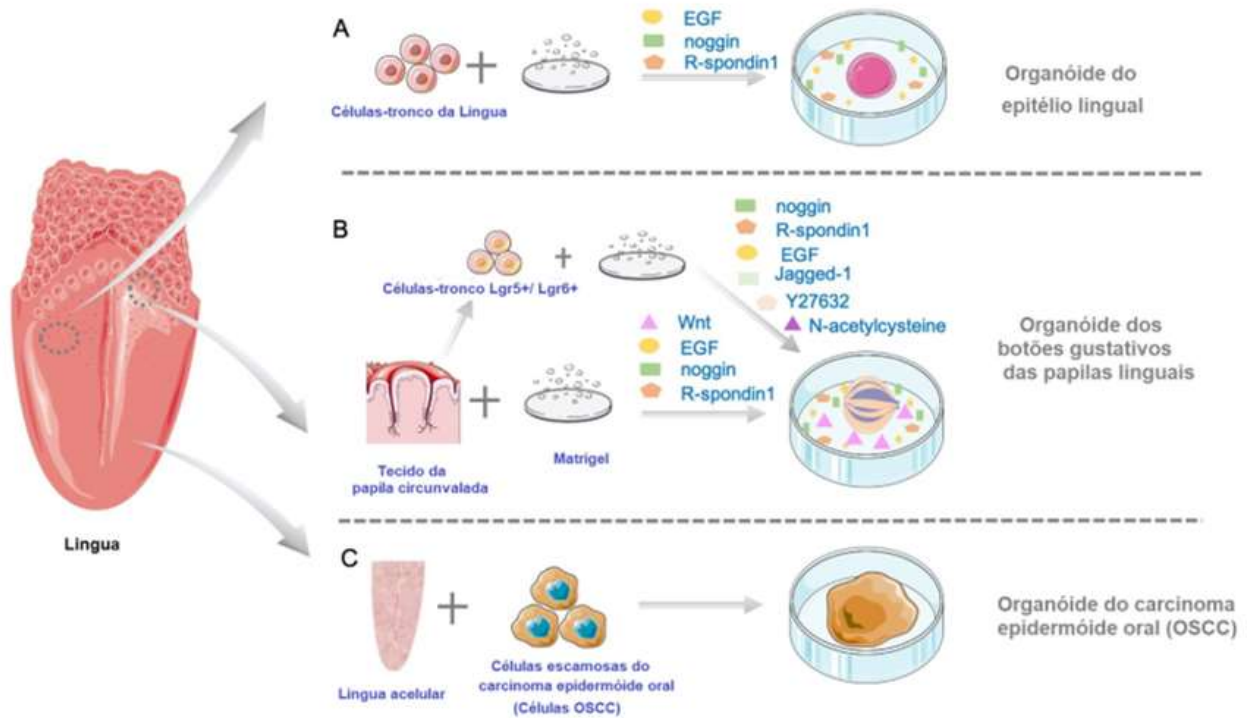


Figura 6- Diagrama esquemático da construção de organóides do epitélio lingual e botões gustativos (Modificado de Gao *et al.*, 2021).

2.3.Resultados da Avaliação do Risco de Enviesamento

Após a avaliação do risco de enviesamento de cada artigo enumerado anteriormente, os resultados obtidos foram apresentados de duas formas distintas: através da tabela em formato *Traffic light plot* (Figura 7, Figura 9 e Figura 11) e do gráfico *summary plot* (Figura 8, Figura 10 e Figura 12), para cada uma das variáveis de estudo.

Foi realizada a análise do risco de enviesamento da técnica organóide para formação/ regeneração:

- do gérmen dentário: quatro estudos apresentaram risco de viés elevado devido a falta de informação dos parâmetros avaliados e outros dois apresentam risco de viés intermédio. Nenhum dos estudos apresentou risco de viés baixo;
- da glândula salivar: oito estudos apresentaram risco de viés elevado devido a alta de informação dos parâmetros avaliados, outros nove apresentam risco de viés intermédio e outros quatro estudos apresentaram risco de enviesamento baixo;

- de epitélio lingual e botões gustativos: sete estudos apresentaram risco de viés elevado devido a falta de informação dos parâmetros avaliados, outros dois apresentam risco de viés intermédio e outros três estudos apresentaram risco de enviesamento baixo;

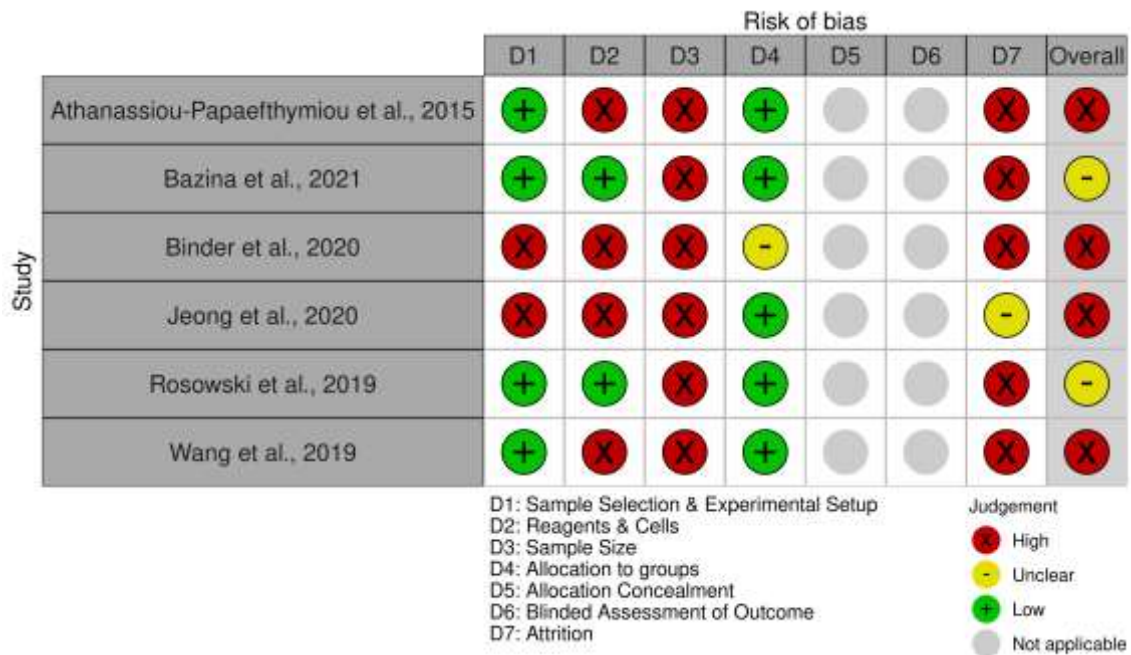


Figura 7- Gráfico *traffic light plot* (*RobVis tool*) para análise do risco de enviesamento organóide do gérmén dentário.

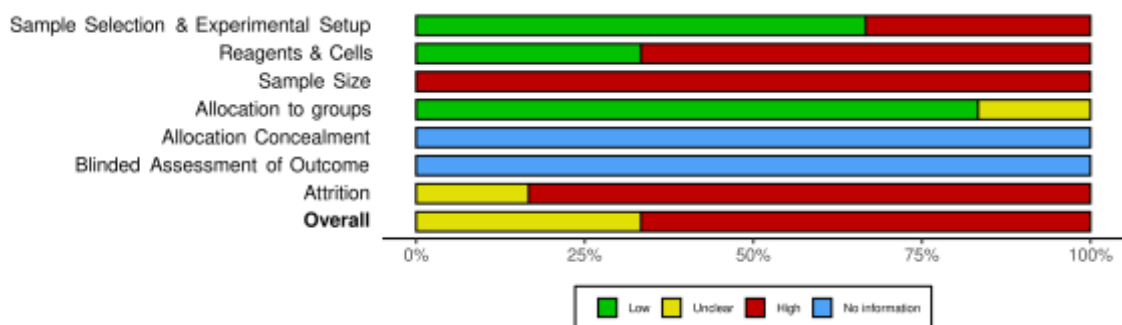


Figura 8- Gráfico *summary plot* (*RobVis tool*) para análise do risco de enviesamento organóide do gérmén dentário.



Figura 9- Gráfico *traffic light plot* (*RobVis tool*) para análise do risco de enviesamento organóide da glândula salivar.

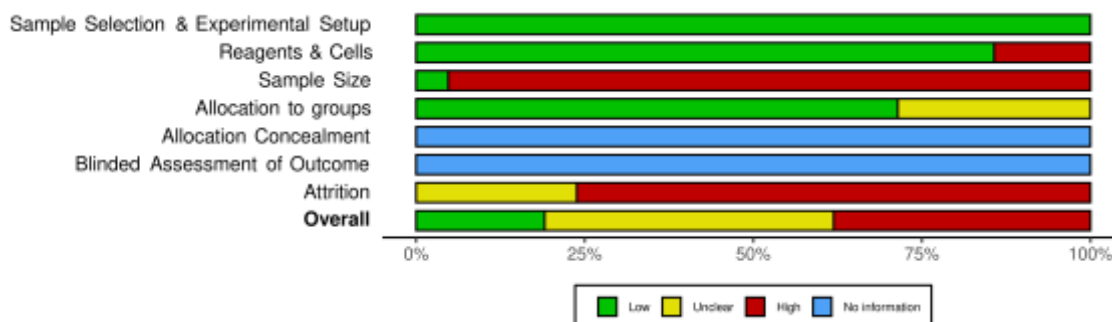


Figura 10- Gráfico *summary plot* (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento organóide da glândula salivar.

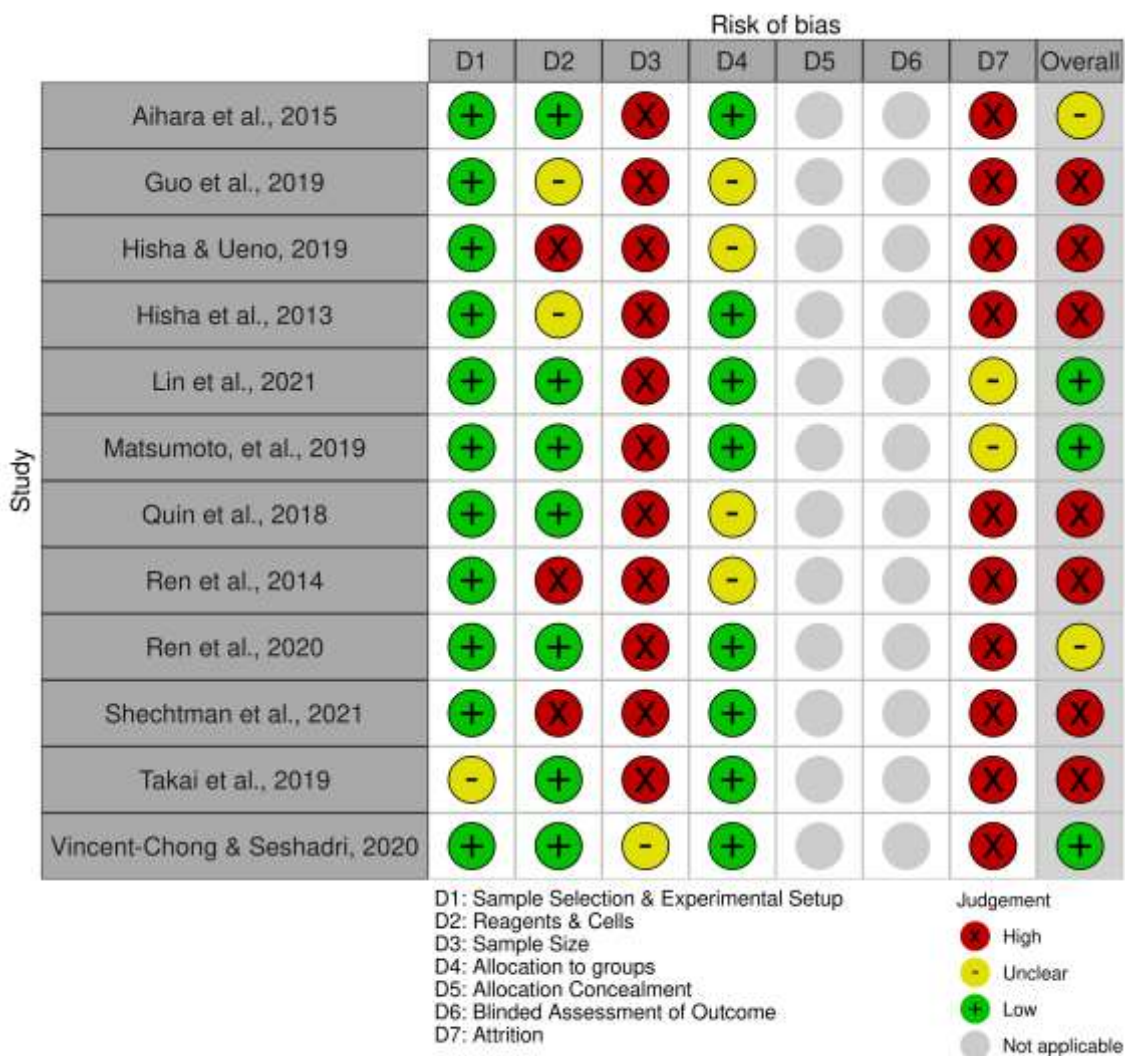


Figura 11- Gráfico *traffic light plot* (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento organóide do epitélio lingual e botões gustativos das papilas linguais

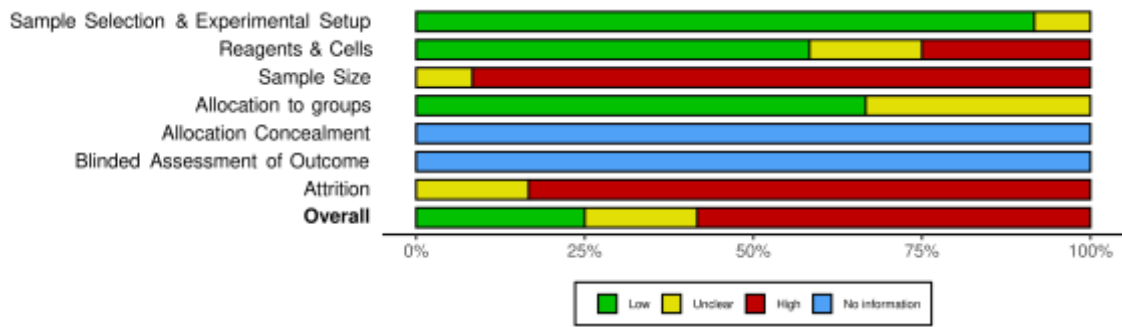


Figura 12- Gráfico *summary plot* (*RobVis tool*) para análise do risco de enviesamento organóide do epitélio lingual e papilas gustativas.

IV. Discussão

Segundo Simian e Bissell, 2017, o termo organóide só surgiu por volta de 2005, sendo que antes dessa data, era apenas uma extensão das culturas tridimensionais. Até aos dias de hoje, muitas foram as definições dadas ao termo organóide (Simian & Bissell, 2017).

A estratégia de pesquisa, ficou limitada ao ano de 2011, porque só a partir dessa data, é que houve um aumento considerável de literatura relevante, sobre a técnica organóide (Simian & Bissel, 2017). Ao longo da pesquisa, constatámos que muitos dos trabalhos não utilizavam efetivamente a tipologia organóide, mas sim métodos similares.

As estratégias de construção de um organóide oral, geralmente, dependem da interação entre células-tronco e o seu nicho, o que cria um ambiente dinâmico que proporciona a auto-renovação, diferenciação, e conseqüentemente a sua agregação em organóides (Clevers, 2016). A construção de organóides orais tem assim por base três elementos essenciais: células, matriz e boas estratégias de construção (Gao *et al.*, 2021).

De acordo com os estudos, as células exibem uma capacidade intrínseca de se agrupar em estruturas complexas quando colocadas num ambiente 3D, na presença de fatores de crescimento e pequenas moléculas. Embora a presença de estrutura de suporte, não seja necessária para a construção de todos os organóides, desempenham um papel importante na construção dos mesmos. No processo de formação dos organóides, as fontes adequadas de células-tronco e o microambiente (nicho), são a chave do sucesso da cultura.

Organóides do gérmen dentário

A aplicação da tecnologia organóide na medicina regenerativa requer conhecimento detalhado sobre o desenvolvimento do órgão, bem como uma fonte acessível de células. No entanto, o conhecimento atual sobre o desenvolvimento dentário é baseado em modelos de camundongos (Athanassiou-Papaefthymiou *et al.*, 2015; Binder *et al.*, 2020), murinos (Bazina *et al.*, 2021) e porcos (Wang *et al.*, 2019) ou em modelos *in vitro* que exploram as células embrionárias desses animais.

Diferentes estratégias de construção de organóides do gérmen dentário, têm sido desenvolvidas, ao longo dos últimos anos, sendo que cada uma apresenta os seus pontos fortes e as suas limitações (**Tabela 2**). A escolha da estrutura de suporte utilizada, depende da abordagem de construção.

O ponto-chave para o desenvolvimento deste tipo de estruturas assenta na emulação da etapa inicial de desenvolvimento dentário *in vivo*, com a replicação da interação espaço-temporal entre o epitélio e o mesênquima (Rosowski *et al.*, 2019). Células-tronco epiteliais e mesenquimais, derivadas do gérmen dentário, apresentam capacidade de se diferenciar em ameloblastos e odontoblastos (Binder *et al.*, 2020).

Verificou-se que as células-tronco da polpa dentária (DPSCs) podem ser facilmente obtidas como ASCs dos tecidos da polpa e apresentam capacidade odontogénica (Sharpe, 2016). DPSCs quando cultivadas numa placa de fixação podem levar à formação de conexões intercelulares, com a consequente formação de um agregado denso. Posteriormente, as DPSCs condensadas podem ser co-cultivadas com células de origem epitelial e permitir a formação de organóides semelhantes ao dente humano, com expressão de marcadores odontogénicos (Rosowski *et al.*, 2019).

O camundongo como principal modelo para o desenvolvimento dentário, difere significativamente dos humanos quanto ao número, tamanho e formato dos dentes. A procura por uma alternativa a este modelo, levou Wang *et al.* (2019) a utilizar o porco como modelo de estudo. As células epiteliais e mesenquimais do gérmen dentário do porco, em diferentes fases do desenvolvimento, quando cultivadas em meio de cultura específico levaram à formação de um organóide de um gérmen dentário (Wang *et al.*, 2019).

A estrutura do tecido dentário duro, como o esmalte e a dentina, são bastante difíceis de regenerar, uma vez que dependem da presença de odontoblastos (Huang, 2011). Manipulando as condições de cultura ou os métodos em que as células-tronco se diferenciam, é possível controlar e aumentar as vias de diferenciação e gerar culturas enriquecidas em precursores semelhantes a odontoblastos *in vitro*. Segundo Jeong *et al.* (2020) células pulpares isoladas, podem ser induzidas a diferenciar-se em células

semelhantes a odontoblastos e gerar uma estrutura mineral semelhante à dentina-polpa (Jeong *et al.*, 2020). Esse organóide dentina-polpa mostrou respostas adequadas a um estimulador biológico, o Biodentine®, aumentando significativamente a proliferação, migração e adesão de células-tronco. Refletindo a bioatividade e biocompatibilidade do material (Jeong *et al.*, 2020).

Um outro estudo, co-transplantou células integrina- $\alpha 6^{2+ve}$ com células estaminais mesenquimais da polpa dentária, levando à formação de ossículos heterotópicos mineralizados, que apresentavam dentina, esmalte cemento e osso, rodeado por fibroblastos produtores de cartilagem, *in vivo* (Athanassiou-Papaefthymiou *et al.*, 2015).

Segundo Bazina *et al.*, (2020) a serotonina pode induzir a produção de um biomaterial semelhante ao esmalte a partir de queratinócitos orais adultos reprogramados com TGF- $\beta 1$, num meio sem estrutura de suporte, *in vitro*. Os organóides formados estabeleceram uma matriz de proteína rica em amelogenina. Após a mineralização, os cristais recém-formados produziram um material semelhante ao esmalte, rico em amelogenina, que demonstrou alinhamento dos cristais de hidroxiapatite, com propriedades mecânicas, como translucidez de luz (Bazina *et al.*, 2020).

A complexidade da estrutura do dente, faz com que seja extremamente difícil a sua construção organóide. O dente projetado não só deve atingir a dureza e o módulo de elasticidade do tecido duro, como também tem que ter vascularização adequada e inervação para crescer e sobreviver (Yelick & Sharpe, 2019).

Resumidamente, organóides do gérmen dentário, derivados de células dentárias embrionárias, podem gerar por completo, toda a estrutura do dente, incluindo tecido duro, tecido pulpar, vasos sanguíneos, e fibras nervosas (Gao *et al.*, 2021). Contudo, essa estratégia é limitada devido à reduzida quantidade de células embrionárias. A aplicação de PSCs e ASCs podem resolver a origem das células na construção organóide. O uso de PSCs na construção organóide, tem muitas vantagens como, capacidade de diferenciação de auto-renovação. No entanto, o desconhecimento de uma

forma eficaz de indução de iPSC, torna a sua utilização, na formação de organóides de gérmen dentário complicada (Gao *et al.*, 2021).

O facto de existirem poucos estudos e de não terem sido realizados em humanos, *in vivo*, fazem com que a aplicabilidade desta técnica na formação de um novo gérmen dentário, seja limitada.

Organóides da Glândula Salivar

A chave para a construção de organóides da glândula salivar reside na recuperação da sua estrutura e da sua função secretora.

As células-tronco/ progenitoras podem ser utilizadas para construção de organóides das GS, na presença de uma matriz natural ou sintética (ou não).

Dois estratégias principais têm sido delineadas em pesquisas sobre a construção de organóides da GS, organóides derivados de PSC e organóides derivado de ASC (Gao *et al.*, 2021).

Derivados de PSC

Na construção de organóides das glândulas salivares, as células-tronco/ progenitoras com capacidade de auto-organização e auto-renovação, são geralmente derivadas de glândulas salivares embrionárias e pós-natais (Hosseini *et al.*, 2019; Sui *et al.*, 2020). Estudos recentes descobriram que células-tronco / progenitoras isoladas da glândula salivar podem ser expandidas e diferenciadas para gerar organóides capazes de restaurar a função da glândula *in vivo*. A presença de FGF10, promoveu o seu desenvolvimento, conforme indicado pela expressão de marcadores específicos, melhor arranjo espacial de células e maior sensibilidade à estimulação por neurotransmissores, *in vitro*. Após transplante heterotópico, as esferas celulares induzidas, combinadas com o mesênquima da glândula salivar embrionária, desenvolveram uma GS madura, com morfologia natural e secreção salivar. No entanto, a sua função secretora estava diminuída devido à ausência de fatores de estimulação contínua (Sui *et al.*, 2020).

Também foi explorada a utilização de PSCs para formação de células específicas de glândulas salivares. As ESCs foram induzidas a se diferenciar em ectoderma oral, que

passou por morfogênese para formar ductos salivares ramificados quando influenciados por sinalização FGF7 e FGF10 (Tanaka *et al.*, 2018). A indução passo a passo, pode fazer com que as células-tronco embrionárias de camundongo se desenvolvam numa glândula salivar precoce por tecnologia organóide e amadureçam ainda mais após o transplante ortotópico (Tanaka *et al.*, 2018), apresentando não só morfologia e expressão genética semelhantes a uma glândula salivar embrionária como características de glândulas salivares maduras, como secreção salivar (Tanaka *et al.*, 2018).

Derivados de ASC

Alguns autores relataram o isolamento de células de murino (Maimets *et al.*, 2016; Nanduri *et al.*, 2014) e da SMG humano (Pringle *et al.*, 2016), que por sua vez, mostraram potencial de auto-renovação e diferenciação *in vitro*, ambas características de células-tronco. Essas células-tronco / progenitoras mostraram capacidade de se auto-renovar e gerar organóides que expressavam amilase (Pringle *et al.* 2016).

Células-tronco adultas da glândula salivar humana semeadas em matrigel, foram descritas como possíveis formadoras de organóides da GS, de ramificação pequena (Nanduri *et al.* 2014; Pringle *et al.* 2016). As células expandidas foram capazes de formar mini-glândulas contendo várias linhagens de células (Nanduri *et al.*, 2014).

Uma outra abordagem, desta vez, sem estrutura de suporte, foi desenvolvida por Shin *et al.* (2018a), levando à formação de organóides da GS que apresentaram neovascularização e expressão de marcadores acinares e ductais (Shin *et al.*, 2018a).

Além das técnicas anteriormente referidas, também a bioimpressão 3D pode ser utilizada na construção de organóides da GS derivados de ASC (Adine *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Urkasemsin *et al.*, 2020). DPSCs foram marcados com nanopartículas magnéticas, que se organizam espacialmente em torno de pontos magnéticos para gerar estruturas tridimensionais. Em seguida, as células foram induzidas por FGF10 para se diferenciarem em organóides que mimetizaram a GS nativa, com propriedades funcionais, neuroepiteliais e produção de saliva, quando estimulados (Adine *et al.*, 2018; Urkasemsin *et al.*, 2020), mas vascularização limitada (Adine *et al.*, 2018). Esta ferramenta apresenta algumas vantagens como facilidade de

reprodutibilidade e rapidez na obtenção de resultados (Adine *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019; Urkasemsin *et al.*, 2020).

Também as células-tronco do folículo dentário (hDFSC) são outra fonte de células-tronco para a formação de organóides das glândulas salivares (Xu *et al.*, 2017).

A linha celular SIMS, que inclui células da glândula salivar submandibular de camundongo adulto imortalizado, também se pode diferenciar em populações únicas de células acinares, mioepiteliais e ductais sob várias condições de diferenciação 3D (Athwal e Lombaert, 2019).

Segundo Cho *et al.* (2021), as salisferas quando sujeitas a auto-renovação e colocadas em meio de diferenciação, podem levar à formação de organóides em matriz (Cho *et al.*, 2021; Koslow *et al.*, 2019; Maimets *et al.*, 2016). Alguns autores defendem que Wnt apresenta um papel importante na auto-renovação de células-tronco das glândulas salivares e promove a sua expansão a longo prazo (Maimets *et al.*, 2016), já outros defendem que a expansão de células mediada por Y27632 de culturas de salisférios adultos, facilita a formação de organóides (Koslow *et al.*, 2019).

Embora tenham sido construídos vários modelos organóides salivares, ainda apresentam algumas limitações como fraca vascularização (Adine *et al.*, 2018), dificuldade no controlo das condições de cultura devido à complexidade do matriz (Athwal e Lombaert, 2019), necessidade de uma correta regulação e presença fatores de crescimento para o seu desenvolvimento (Sui *et al.*, 2020; Tanaka *et al.*, 2018) mas principalmente a necessidade de realização destes estudos em humanos, *in vivo* (Maimets *et al.*, 2016; Pringle *et al.*, 2016; Serrano Martinez *et al.*, 2020; Shin *et al.*, 2018a).

Resumidamente, duas abordagens principais têm sido usadas para a construção destas estruturas: 1) incubação de células-tronco/ progenitoras derivadas da glândula salivar num sistema de cultura tridimensional, para formar a estrutura da glândula por meio de indução de processos regenerativos e 2) indução de células-tronco pluripotentes para gerar glândulas salivares embrionárias, replicando o processo de desenvolvimento (Gao *et al.*, 2021).

Organóides do Epitélio Lingual e botões gustativos

Sistemas de cultura organóide epitelial lingual podem ser estabelecidos a partir de células-tronco linguais em matrigel (Gao *et al.*, 2021) e organóides gustativos podem ser formados, incorporando tecido da papila circunvalada ou induzindo células-tronco gustativas Lgr5+ (Aihara *et al.*, 2015; Guo *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2020; Shechtman *et al.*, 2021, Takai *et al.*, 2019) e/ou Lgr6+ (Lin *et al.*, 2021; Ren *et al.*, 2014), presentes nas papilas circunvaladas (Yee *et al.*, 2013), sob condições de cultura específicas na presença de fatores de crescimento e pequenas moléculas (Gao *et al.*, 2021).

Segundo Ren *et al.*, (2014), Lgr5+ e Lgr6+ podem ser cultivadas em DMEM/F12 suplementado com R-spondin, Noggin, Jagged, Y27623, N-acetilcisteína, EGF, N2 e B27, expandir-se e diferenciar-se em células semelhantes ao sabor, *in vitro*, sem nicho mesenquimal ou conexão neuronal, o que sugere que essas células são, intrinsecamente, capazes de dar origem a todos os subtipos de células gustativas. As células Lgr5+ dão origem aos três tipos principais de células gustativas e Lgr6, tal como Lgr5, marca células-tronco no tecido gustativo da língua anterior e posterior e, pode gerar células gustativas maduras *ex vivo* (Ren *et al.*, 2014). Além disso, com suplementação de Wnt, EGF, R-spondin 1 e Noggin, organóides gustativos podem desenvolver-se e apresentar características fenotípicas semelhantes aos tecidos naturais, incluindo múltiplas camadas de células epiteliais contendo células-tronco / progenitoras na camada externa e células gustativas na camada interna (Aihara *et al.*, 2015).

Foi desenvolvido um estudo que avaliou a capacidade de formação de organóides gustativos a partir de células-tronco Lgr5+ gustativas de camundongos neonatais e adultos. Nesse estudo, os organóides formados exibiram capacidade diferencial de gerar células recetoras de sabor, sendo que as células neonatais promoveram o desenvolvimento de células Car4+ e gustducin+ (Ren *et al.*, 2020). Reforçando a ideia de que existem vários fatores que determinam a formação de células recetoras de sabor em organóides, tais como: o subtipo de células, a idade do animal, a ativação e inativação das vias de sinalização, bem como o *crosstalk* entre as várias transduções de sinalização (Ren *et al.*, 2020).

Recentemente, as células Bmi1+ isoladas da camada basal do epitélio lingual, foram usadas para estabelecer organóides do epitélio lingual, que são considerados um tipo de células-tronco epiteliais linguais (LECs) (Hisha *et al.*, 2016). As células Bmi1 + das LECs, libertadas dos fragmentos linguais foram cultivadas em matrigel, suplementado com citocinas, incluindo EGF, Noggin e R-spondin. Nessas condições, três diferentes tipos de organóides foram gerados: organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas e de formato robusto e redondo organóides com um arranjo de células reticuladas. Entre eles, organóides de formato redondo com arranjos de células concêntricas, apresentaram um epitélio queratinizado com multicamadas e estrato córneo, característicos de papilas filiformes (Hisha *et al.*, 2013; Hisha & Ueno, 2019). No entanto, a limitação deste sistema é a heterogeneidade de organóides gerados sob as mesmas condições culturais (Hisha *et al.* 2016). Após o transplante, os organóides enxertados, expandiram-se na camada muscular, em vez de na camada epitelial da língua do recetor, uma vez que é tecnicamente difícil injetá-los na área subepitelial (Hisha *et al.*, 2013).

Potenciais aplicações dos Organóides orais

Os organóides orais têm aplicações potenciais imediatas, fornecem ótimos modelos para experiências *in vitro* e *in vivo*, além do desenvolvimento de uma medicina personalizada para o tratamento de doenças. Em relação à medicina regenerativa, os organóides orais são uma fonte promissora de tecidos transplantáveis para *in vivo* e tipos de células funcionais para terapia. (Gao *et al.*, 2021).

Como modelos de desenvolvimento

A formação de organóides derivados de células-tronco pluripotentes, espelha a organogénese natural, até certo ponto e fornece uma compreensão aprofundada do processo, além de exibir maior acessibilidade experimental, do que modelos animais (Gao *et al.*, 2021). Por exemplo, organóides do gérmen dentário, podem exibir marcadores odontogénicos e também são capazes de invaginação epitelial no mesênquima condensado, imitando as interações recíprocas dos tecidos envolvidos no

desenvolvimento do dente humano. A análise abrangente do transcriptoma indicou a ativação de vias de sinalização, envolvidas em organogênese dentária humana, como Notch e sinalização de TGF- β (Rosowski *et al.*, 2019).

Na construção de organóides da GS, o FGF2 e a laminina 111 foram identificados como fatores de nicho essenciais na promoção da maturação das células da SG e, Sox9 e Foxc1 como fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação do ectoderma oral no rudimento da glândula salivar (Tanaka *et al.* 2018; Hosseini *et al.* 2018).

Na construção de organóides das papilas gustativas, Matsumoto *et al.* (2019) defendeu que TRPV4 está envolvido na percepção do sabor azedo, por diferenciação de células gustativas tipo III (Matsumoto *et al.*, 2019). Qin *et al.* (2018), a partir de células-tronco Lgr5+-GFP de camundongos transgênicos, percebeu que Gli3 é um supressor da proliferação de células-tronco gustativas e afeta o número e a função das células (Qin *et al.*, 2018).

Na modelagem de doenças

Para o estudo de patologias orais, a utilização direta de células dos pacientes pode permitir a formação de organóides personalizados (Schutgens e Clevers 2020). A aplicação de organóides na pesquisa de tumores, mostra vantagens notáveis no tratamento de precisão do cancro oral (Gao *et al.*, 2021).

Ao contrário das linhas de células em monocamada, os organóides são geneticamente estáveis durante a cultura a longo prazo e captam a heterogeneidade parcial, do tumor original (Gao *et al.*, 2021).

Organóides normais e organóides cancerígenos, podem ser estabelecidos em simultâneo, a partir das mesmas amostras de pacientes, proporcionado uma oportunidade para a medicina personalizada.

Organóides gustativos têm sido utilizados para explorar os efeitos da radiação nas papilas gustativas, sugerindo que os inibidores de SIRT1 podem promover a sobrevivência das células-tronco do botão gustativo Lgr5+ e mitigar a mucosite oral induzida por radiação (Guo *et al.*, 2019). Promovendo o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a disfunção do paladar e ulceração da mucosa. Também Cho *et al.*, 2021, defende que a cultura organóide 3D pode ser usada para gerar um modelo de uma glândula salivar induzida por radiação e dessa forma prever respostas a agentes radioterapêuticos protetores. Segundo este autor, EGF pode promover o crescimento e inibir a apoptose das células epiteliais salivares, podendo mesmo ser uma opção terapêutica promissora para a prevenção da hipofunção das glândulas salivares induzidas por radiação (Cho *et al.*, 2021).

Esta ferramenta, também pode ser útil como modelo de pré-clínico, fornecendo luzes sobre a compreensão da biologia de tumores, como o carcinoma adenoide quístico (ACC), podendo proporcionar uma terapia personalizada para pacientes com essa doença ou outras patologias malignas, até agora inacessíveis de prever, a real eficácia dos fármacos, devido à falta de modelos *in vitro* e *in vivo* (Takada *et al.*, 2021).

Medicina Regenerativa

Os tecidos e órgãos doados para transplante são sempre escassos. Como os organóides são gerados a partir da expansão e diferenciação, *in vitro*, de quantidades mínimas de células do dador, podem evitar rejeição imunológica e questões éticas, podendo se tornar uma fonte adequada para transplante num futuro próximo (Gao *et al.*, 2021).

Embora os organóides do gérmen dentário ainda não se tenham desenvolvido em dentes perfeitos, fornecem um novo método para desenvolvimento de dentes intactos. A criação de um organóide do gérmen dentário, passível de transplante para o osso alveolar, com consecutivo desenvolvimento de um dente totalmente formado com inervação e vascularização, será o bastante útil para a terapia clínica (Gao *et al.*, 2021).

Organóides da glândula salivar enxertados ortotopicamente, exibiram reconstrução do sistema nervoso, com secreção salivar, sugerindo um grande potencial desta terapia para o reparo e regeneração das glândulas (Tanaka *et al.*, 2018).

O sistema de cultura organóide do epitélio lingual e papilas gustativas, têm fornecido um método conveniente e direto para a compreensão do mecanismo de manutenção e hiperplasia do epitélio lingual, importante para o estudo do cancro e regeneração da língua.

V. Conclusão e Perspetivas futuras

Esta dissertação, reúne a literatura mais revelante sobre a utilização da técnica organotípica, na cavidade oral, de 2011 a junho de 2021. Este trabalho pretende enfatizar os esforços contínuos da ciência para dar hipóteses de tratamento mais biológicas a muitos dos problemas com que nos deparamos na nossa prática clínica.

Os organóides orais representam uma importante ponte entre as culturas de células 2D e os modelos animais *in vivo*, uma vez que podem recapitular parcialmente a estrutura tridimensional do órgão nativo e ao mesmo tempo, são relativamente acessíveis e estáveis.

Embora as estratégias de desenvolvimento de organóides orais, se tenham desenvolvido drasticamente, nas últimas décadas, ainda não se tornaram modelos perfeitos de órgãos nativos. Não está claro até que ponto eles podem substituir funcionalmente os órgãos originais após serem transplantados para o corpo humano. Diferentes organóides orais têm características estruturais e funções muito distintas, portanto, não existe uma estratégia geral de construção para todos os organóides.

No entanto, não deixam de ser uma nova ferramenta de pesquisa, com possíveis aplicações em medicina regenerativa no futuro.

VI. Bibliografia

- Adine, C., Ng, K. K., Rungarunlert, S., Souza, G. R., & Ferreira, J. N. (2018). Engineering innervated secretory epithelial organoids by magnetic three-dimensional bioprinting for stimulating epithelial growth in salivary glands. *Biomaterials*, *180*, 52–66. MEDLINE. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.011>
- Aihara, E., Mahe, M. M., Schumacher, M. A., Matthis, A. L., Feng, R., Ren, W., Noah, T. K., Matsu-ura, T., Moore, S. R., Hong, C. I., Zavros, Y., Herness, S., Shroyer, N. F., Iwatsuki, K., Jiang, P., Helmrich, M. A., & Montrose, M. H. (2015). Characterization of stem/progenitor cell cycle using murine circumvallate papilla taste bud organoid. *Scientific Reports*, *5*, 17185. <https://doi.org/10.1038/srep17185>
- Athanassiou-Papaefthymiou, M., Papagerakis, P., & Papagerakis, S. (2015). Isolation and Characterization of Human Adult Epithelial Stem Cells from the Periodontal Ligament. *Journal of Dental Research*, *94*(11), 1591–1600. <https://doi.org/10.1177/0022034515606401>
- Athwal H.K., Lombaert I.M.A. (2019). 3D organoid formation from the murine salivary gland cell line SIMS. *Bio Protoc*, *9*(19), e3386. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3386>
- Barker, N., Huch, M., Kujala, P., van de Wetering, M., Snippert, H.J., van Es, J. H., Sato, T., Stange, D.E., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., van den Brink, S., Korving, J., Abo, A., Peters, P. J., Wright, N., Poulsom, R., & Clevers, H. (2010). Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell*, *6*(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.11.013>
- Barlow L.A. (2015). Progress and renewal in gustation: new insights into taste bud development. *Development*, *142*(21), 3620-3629. <https://doi.org/10.1242/dev.120394>

- Bartfeld, S., & Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *Journal of Molecular Medicine*, 95(7), 729–738. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1531-7>
- Bártolo, P., Almeida, H., & Rezende, R. (2008). Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. Bártolo & B. Bidanda (Eds.), *Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications* (pp. 149–170). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68831-2_8
- Bazina, F., Brouxhon, S. M., Graham, U. M., & Kyrkanides, S. (2021). Serotonin contributes to the in vitro production of a biomimetic enamel-like material from reprogrammed oral epithelial keratinocytes. *Orthodontics & craniofacial research*. <https://doi.org/10.1111/ocr.12475>
- Binder, M., Biggs, L. C., Kronenberg, M. S., Schneider, P., Thesleff, I., & Balic, A. (2020). Novel strategies for expansion of tooth epithelial stem cells and ameloblast generation. *Scientific reports*, 10(1), 4963. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60708-w>
- Boj S.F., Hwang C.I., Baker L.A., Chio I.I., Engle D.D., Corbo V., Jager M., Ponz-Sarvisé M., Tiriác H., Spector M.S., Gracanin A., Oni T., Feigin M. E., Ohlund D., Handly-Santana A., Ardito-Abraham C.M., Ludwig M., Elyada E., Alagesan B., ... Tuveson D. (2015) Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell*. 160 (1-2), 324–338. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.021>
- Cai X.J., Hoopen S. T., Zhang W., Yi C., Yang W., Yang F., Jansen J.A., Walboomers X.F., Yelick P.C. (2017). Influence of highly porous electrospun PLGA/PCL/nHA fibrous scaffolds on the differentiation of tooth bud cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research A*, 105(9), 2597–2607. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36120>
- Cho, J. M., Yoon, Y. J., Lee, S., Kim, D., Choi, D., Kim, J., & Lim, J. Y. (2021).

- Retroductal Delivery of Epidermal Growth Factor Protects Salivary Progenitors after Irradiation. *Journal of dental research*, 100(8), 883-890. <https://doi.org/10.1177/0022034521999298>
- Ciano, K. A., Saredy, J. J., & Bowers, D. F. (2014). Heparan sulfate Proteoglycan: An Arbovirus attachment factor integral to mosquito salivary gland ducts. *Viruses*, 6(12), 5182–5197. <https://doi.org/10.3390/v6125182>
- Clevers, H. (2015). STEM CELLS. What is an adult stem cell? *Science*, 350(6266), 1319–1320. <https://doi.org/10.1126/science.aad7016>
- Clevers H. (2016). Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165(7), 1586–1597. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
- Cochrane Effective Practice and Organisation of Care, (EPOC). (2017). EPOC resources for review authors. *Consultado Novembro 21, 2020*. epoc.cochrane.org/epoc-resources-review-authors
- Cramond, F., Irvine, C., Liao, J., Howells, D., Sena, E., Currie, G., & Macleod, M. (2016). Protocol for a retrospective, controlled cohort study of the impact of a change in Nature journals' editorial policy for life sciences research on the completeness of reporting study design and execution. *Scientometrics*, 108, 315–328. <https://doi.org/10.1007/s11192-016-1964-8>
- Diaz-Arnold A.M., Marek C.A. (2002). The impact of saliva on patient care: A literature review. *J. Prosthet. Dent*, 88 (3),337-343. <https://doi.org/10.1067/mpr.2002.128176>
- Duval, K., Grover, H., Han, L.-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology*, 32(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., & Okuda, S. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472(7341), 51–56. <https://doi.org/10.1038/nature09941>

- Ferreira J.N., Rungarunlert S., Urkasemsin G., Adine C., & Souza G.R. (2016). Three-dimensional bioprinting nanotechnologies towards clinical application of stem cells and their secretome in salivary gland regeneration. *Stem Cell. Int.*, 2016, 7564689. <https://doi.org/10.1155/2016/7564689>
- Ferreira, J. N., Adine, C., Ng, K. K., Hasan, R., Urkasemsin, G., Muthumariappan, S., Souza, G. R. (2019). A magnetic three - dimensional levitated primary cell culture system for the development of secretory salivary gland - like organoids. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(3), 495-508. <https://doi.org/10.1002/term.2809>
- Gao Z.H., Wu T.T., Xu J.J., Liu G.L., Xie Y.L., Zhang C.M., Wang J.S., Wang S.L.(2014). Generation of bioartificial salivary gland using whole-organ decellularized bioscaffold. *Cells Tissues Organs*, 200(3–4), 171- 180. <https://doi.org/10.1159/000371873>
- Gao, X., Wu, Y., Liao, L., & Tian, W. (2021). Oral Organoids: Progress and Challenges. *Journal of Dental Research*, 100(5), 454-463. <https://doi.org/10.1177/0022034520983808>
- Grant, P. A., Herold, M. B., & Moody, S. A. (2013). Blastomere explants to test for cell fate commitment during embryonic development. *Journal of Visualized Experiments*, 71, 1–8. <https://doi.org/10.3791/4458>
- Guo, Q., Chen, S., Rao, X., Li, Y., Pan, M., Fu, G., Yao, Y., Gao, X., Tang, P., Zhou, Y., Xu, X., Gao, J., Hua, G. (2019). Inhibition of SIRT1 promotes taste bud stem cell survival and mitigates radiation-induced oral mucositis in mice. *American Journal of Translational Research*, 11(8), 4789–4799.
- Hisha, H., & Ueno, H. (2019). Organoid Culture of Lingual Epithelial Cells in a Three-Dimensional Matrix. *Methods in Molecular Biology*, 1576, 93–99. https://doi.org/10.1007/7651_2016_3
- Hisha, H., Tanaka, T., Kanno, S., Tokuyama, Y., Komai, Y., Ohe, S., Yanai, H.,

- Omachi, T., & Ueno, H. (2013). Establishment of a novel lingual organoid culture system: Generation of organoids having mature keratinized epithelium from adult epithelial stem cells. *Scientific reports*, 3, 3224. <https://doi.org/10.1038/srep03224>
- Hosseini, Z. F., Nelson, D. A., Moskwa, N., & Larsen, M. (2019). Generating Embryonic Salivary Gland Organoids. *Current Protocols in Cell Biology*, 83(1), e76. <https://doi.org/10.1002/cpcb.76>
- Hosseini, Z. F., Nelson, D. A., Moskwa, N., Sfakis, L. M., Castracane, J., & Larsen, M. (2018). FGF2-dependent mesenchyme and laminin-111 are niche factors in salivary gland organoids. *Journal of Cell Science*, 131(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.208728>
- Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Tränkner, D., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, 442(7105), 934–938. <https://doi.org/10.1038/nature05084>
- Huang, G.T. (2011). Dental pulp and dentin tissue engineering and regeneration: Advancement and challenge. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 3, 788–800. <https://doi.org/10.2741/e286>
- Huch M., Boj S.F., & Clevers H. (2013). Lgr5(+) liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, 8(4), 385–387. <http://doi.org/10.2217/rme.13.39>
- Huch M., Dorrell C., Boj S.F., van Es J.H., Li V.S., van de Wetering M., Sato T., Hamer K., Sasaki N., Finegold M.J., Haft A., Vries R., Grompe M., & Clevers H. (2013). In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*, 494(7436), 247–250. <https://doi.org/10.1038/nature11826>
- Huch, M.; Bonfanti, P.; Boj, S. F.; Sato, T.; Loomans, C. J.; van de Wetering, M.

- Sojoodi, M.; Li, V. S.; Schuijers, J.; Gracanin, A.; Ringnald, F.; Begthel, H.; Hamer, K., Mulder, J., van Es, J. H., de Koning E., Vries, R. G. J., Heimberg H., & Clevers, H. (2013). Unlimited in vitro expansion of adult bi-potent pancreas progenitors through the Lgr5/R-spondin axis. *The EMBO journal*, 32(20), 2708-2721. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.204>
- Ikeda E., Morita R., Nakao K., Ishida K., Nakamura T., Takano-Yamamoto T., Ogawa M., Mizuno M., Kasugai S., Tsuji T. (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (32), 13475-13480. <https://doi.org/10.1073/pnas.0902944106>
- Jamal, H. A. (2016). Tooth Organ Bioengineering: Cell Sources and Innovative Approaches. *Dentistry Journal*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/dj4020018>
- Jensen, S. B., Pedersen, A. M. L., Vissink, A., Andersen, E., Brown, C. G., Davies, A. N., Dutilh, J., Fulton, J. S., Jankovic, L., Lopes, N. N. F., Mello, A. L. S., Muniz, L. V., Murdoch-Kinch, C. A., Nair, R. G., Napeñas, J. J., Nogueira-Rodrigues, A., Saunders, D., Stirling, B., von Bültzingslöwen, I., ... Brennan, M. T. (2010). A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: Prevalence, severity and impact on quality of life. *Supportive Care in Cancer: Official Journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, 18(8), 1039–1060. <https://doi.org/10.1007/s00520-010-0827-8>
- Jeong, S. Y., Lee, S., Choi, W. H., Jee, J. H., Kim, H.-R., & Yoo, J. (2020). Fabrication of Dentin-Pulp-Like Organoids Using Dental-Pulp Stem Cells. *Cells*, 9(3), 642. <https://doi.org/10.3390/cells9030642>
- Karthaus, W.R., Iaquinta, P.J., Drost, J., Gracanin, A., van Boxtel, R., Wongvipat, J., Dowling, C.M., Gao, D., Begthel, H., Sachs, N., Vries R. G. J., Cuppen E., Chen Y., Sawyers C. L., & Clevers H. C. (2014). Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, 159(1), 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.017>

- Koslow, M., O'Keefe, K. J., Hosseini, Z. F., Nelson, D. A., & Larsen, M. (2019). ROCK inhibitor increases proacinar cells in adult salivary gland organoids. *Stem cell research*, 41, 101608. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101608>
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly. *Nature*, 501 (7467), 373-379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- Lancaster, M.A., Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, 345(6194). <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Lei, M., Li, K., Li, B., Gao, L.N., Chen, F.M., Jin, Y. (2014). Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. *Biomaterials*, 35(24), 6332–6343. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.071>
- Lin, X., Lu, C., Ohmoto, M., Choma, K., Margolskee, R. F., Matsumoto, I., & Jiang, P. (2021). R-spondin substitutes for neuronal input for taste cell regeneration in adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.2001833118>
- Lombaert, I., Movahednia, M., Adine, C., & Ferreira, J. (2017). Concise Review: Salivary Gland Regeneration: Therapeutic Approaches from Stem Cells to Tissue Organoids. *Stem Cells*, 35(1), 97-105. <http://doi.org/10.1002/stem.2455>
- Maimets, M., Rocchi, C., Bron, R., Pringle, S., Kuipers, J., Giepmans, B. N. G., Vries, R. G. J., Clevers, H., de Haan, G., van Os, R., & Coppes, R. P. (2016). Long-Term In Vitro Expansion of Salivary Gland Stem Cells Driven by Wnt Signals. *Stem cell reports*, 6(1), 150–162. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.11.009>
- Matsumoto, K., Ohishi, A., Iwatsuki, K., Yamazaki, K., Takayanagi, S., Tsuji, M.,

- Aihara, E., Utsumi, D., Tsukahara, T., Tominaga, M., Nagasawa, K., & Kato, S. (2019). Transient receptor potential vanilloid 4 mediates sour taste sensing via type III taste cell differentiation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43254-y>
- McGuinness, L. A., & Higgins, J. P. T. (2020). Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Research Synthesis Methods*, n/a(n/a). <https://doi.org/10.1002/jrsm.1411>
- Mikos, A. G., & Temenoff, J. S. (2000). Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biotechnology*, 3(2), 1995–2000. <https://doi.org/10.2225/vol3-issue2-fulltext-5>
- Monteiro, N., & Yelick, P.C. (2017). Advances and perspectives in tooth tissue engineering. *Journal Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(9), 2443–2461. <https://doi.org/10.1002/term.2134>
- Nada, O.A., & El Backly, R.M. (2018). Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 103. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00103>
- Nanci, A. (2012). *Ten Cate's Oral Histology Development, Structure, and Function*. (8th ed.). Elsevier Mosby.
- Nanduri, L. S. Y., Baanstra, M., Faber, H., Rocchi, C., Zwart, E., de Haan, G., van Os, R., & Coppes, R. P. (2014). Purification and ex vivo expansion of fully functional salivary gland stem cells. *Stem cell reports*, 3(6), 957–964. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.09.015>
- Nanduri, L.S.Y., Maimets, M., Pringle, S.A., van der Zwaag, M., van Os, R.P., & Coppes R.P. (2011). Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, 99, 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2011.05.085>

- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- Orhon, I., Rocchi, C., Villarejo-Zori, B., Serrano Martinez, P., Baanstra, M., Brouwer, U., Boya, P., Coppes, R., & Reggiori, F. (2021). Autophagy induction during stem cell activation plays a key role in salivary gland self-renewal. *Autophagy*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1924036>
- Oshima, M., & Tsuji, T. (2014). Functional tooth regenerative therapy: tooth tissue regeneration and whole-tooth replacement. *Odontology*, 102, 123-136. <https://doi.org/10.1007/s10266-014-0168-z>
- Ozdemir, T., Fowler, E.W., Hao, Y., Ravikrishnan, A., Harrington, D. A, Witt, R.L., Farach-Carson, M. C., Pradhan-Bhatt, S., Jia, X. (2016). Biomaterials-based strategies for salivary gland tissue regeneration. *Biomaterials Science*, 4(4), 592–604. <https://doi.org/10.1039/c5bm00358j>
- Patel R., & Alahmad A. J. (2016). Growth-factor reduced Matrigel source influences stem cell derived brain microvascular endothelial cell barrier properties. *Fluids Barriers CNS*, 13(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12987-016-0030-5>
- Pringle, S., Maimets, M., van der Zwaag, M., Stokman, M. A., van Gosliga, D., Zwart, E., Witjes, M. J. H., de Haan, G., van Os, R., & Coppes, R. P. (2016). Human Salivary Gland Stem Cells Functionally Restore Radiation Damaged Salivary Glands. *Stem Cells*, 34(3), 640–652. <https://doi.org/10.1002/stem.2278>
- Pringle, S., Van Os, R., & Coppes, R.P. (2013). Concise review: adult salivary gland stem cells and a potential therapy for xerostomia. *Stem Cells*, 31(4), 613–619. <https://doi.org/10.1002/stem.1327>
- Pringle, S., Wang, X., Verstappen, G. M. P. J., Terpstra, J. H., Zhang, C. K., He, A.,

- Patel, V., Jones, R. E., Baird, D. M., Spijkervet, F. K. L., Vissink, A., Bootsma, H., Coppes, R. P., & Kroese, F. G. M. (2018). Salivary Gland Stem Cells Age Prematurely in Primary Sjögren's Syndrome. *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 71(1), 133–142. <https://doi.org/10.1002/art.40659>
- Qin, Y., Sukumaran, S. K., Jyotaki, M., Redding, K., Jiang, P., & Margolskee, R. F. (2018). Gli3 is a negative regulator of Tas1r3-expressing taste cells. *PLoS genetics*, 14(2), e1007058. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007058>
- Ren, W., Lewandowski, B. C., Watson, J., Aihara, E., Iwatsuki, K., Bachmanov, A. A., Margolskee, R. F., & Jiang, P. (2014). Single Lgr5- or Lgr6-expressing taste stem/progenitor cells generate taste bud cells ex vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(46), 16401–16406. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409064111>
- Ren, W., Liu, Q., Zhang, X., & Yu, Y. (2020). Age-related taste cell generation in circumvallate papillae organoids via regulation of multiple signaling pathways. *Experimental cell research*, 394(2), 112150. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112150>
- Rosowski, J., Bräunig, J., Amler, A.-K., Strietzel, F. P., Lauster, R., & Rosowski, M. (2019). Emulating the early phases of human tooth development in vitro. *Scientific reports*, 9(1), 7057. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43468-0>
- Schutgens, F., & Clevers, H. (2020). Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annual Review of Pathology*, 15, 211–234. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032611>
- Serrano Martinez, P., Cinat, D., Luijk, P., Baanstra, M., Haan, G., Pringle, S., & Coppes, R. P. (2021). Mouse parotid salivary gland organoids for the in vitro study of stem cell radiation response. *Oral Diseases*, 27(1), 52–63. <https://doi.org/10.1111/odi.13475>
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture:

- Experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 647–664. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
- Sharpe, P. T. (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273–2280. <https://doi.org/10.1242/dev.134189>
- Shechtman, L. A., Piarowski, C. M., Scott, J. K., Golden, E. J., Gaillard, D., & Barlow, L. A. (2021). Generation and Culture of Lingual Organoids Derived from Adult Mouse Taste Stem Cells. *Journal of visualized experiments*, 170. <https://doi.org/10.3791/62300>
- Shin, H. S., Hong, H. J., Koh, W. G., & Lim, J. Y. (2018a). Organotypic 3D culture in nanoscaffold microwells supports salivary gland stem-cell-based organization. *ACS biomaterials science & engineering*, 4(12), 4311–4320. <https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.8b00894>
- Shin, H. S., Lee, S., Hong, H. J., Lim, Y. C., Koh, W.-G., & Lim, J.Y. (2018b). Stem cell properties of human clonal salivary gland stem cells are enhanced by three-dimensional priming culture in nanofibrous microwells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0829-x>
- Simian, M., Bissel, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216 (1), 31-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Sui, Y., Zhang, S., Li, Y., Zhang, X., Hu, W., Feng, Y., Xiong, J., Zhang, Y., & Wei, S. (2020). Generation of functional salivary gland tissue from human submandibular gland stem/progenitor cells. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 127. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01628-4>
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A., & Inch, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1), 113–120.

- Takada, K., Aizawa, Y., Sano, D., Okuda, R., Sekine, K., Ueno, Y., Yamanaka, S., Aoyama, J., Sato, K., Kuwahara, T., Hatano, T., Takahashi, H., Arai, Y., Nishimura, G., Taniguchi, H., & Oridate, N. (2021). Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method. *International journal of cancer*, 148(1), 193–202. <https://doi.org/10.1002/ijc.33315>
- Takai, S., Watanabe, Y., Sanematsu, K., Yoshida, R., Margolskee, R. F., Jiang, P., Atsuta, I., Koyano, K., Ninomiya, Y., & Shigemura, N. (2019). Effects of insulin signaling on mouse taste cell proliferation. *PloS One*, 14(11), e0225190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225190>
- Takeo, M., & Tsuji, T. (2018). Organ regeneration based on developmental biology: past and future. *Current opinion in Genetics Development*, 52, 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.05.008>
- Tanaka, J., & Mishima, K. (2020). In vitro three-dimensional culture systems of salivary glands. *Pathology International*, 70(8), 493–501. <https://doi.org/10.1111/pin.12947>
- Tanaka, J., Ogawa, M., Hojo, H., Kawashima, Y., Mabuchi, Y., Hata, K., Nakamura, S., Yasuhara, R., Takamatsu, K., Irié, T., Fukada, T., Sakai, T., Inoue, T., Nishimura, R., Ohara, O., Saito, I., Ohba, S., Tsuji, T., & Mishima, K. (2018). Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nature communications*, 9(1), 4216. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06469-7>
- Taruno, A., Vingtdoux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., Adrien, L., Zhao, H., Leung, S., Abernethy, M., Koppel, J., Davies, P., Civan, M. M., Chaudhari, N., Matsumoto, I., Hellekant, G., Tordoff, M. G., Marambaud, P., & Foskett, J. K. (2013). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*, 495(7440), 223–226. <https://doi.org/10.1038/nature11906>

- Urkasemsin, G., Rungarunlert, S., & Ferreira, J. N. (2020). Bioprinting Strategies for Secretory Epithelial Organoids. *Methods in Molecular Biology*, 2140, 243–249. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0520-2_16
- Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., Parnes, J., Enjyoji, K., & Robson, S. C. (2013). Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36), 14789–14794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309468110>
- Vincent-Chong, V. K., & Seshadri, M. (2020). Development and Radiation Response Assessment in A Novel Syngeneic Mouse Model of Tongue Cancer: 2D Culture, 3D Organoids and Orthotopic Allografts. *Cancers*, 12(3), 579. <https://doi.org/10.3390/cancers12030579>
- Wang, F., Li, G., Wu, Z., Fan, Z., Yang, M., Wu, T., Wang, J., Zhang, C., & Wang, S. (2019). Tracking diphyodont development in miniature pigs in vitro and in vivo. *Biology open*, 8(2). <https://doi.org/10.1242/bio.037036>
- Xu, Q. L., Furuhashi, A., Zhang, Q. Z., Jiang, C. M., Chang, T.H., & Le, A. D. (2017). Induction of Salivary Gland-Like Cells from Dental Follicle Epithelial Cells. *Journal of Dental Research*, 96(9), 1035–1043. <https://doi.org/10.1177/0022034517711146>
- Yang, T. L., & Young, T. H. (2008). The enhancement of submandibular gland branch formation on chitosan membranes. *Biomaterials*, 29, 2501–2508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.02.014>
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. P. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234–244. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.001>
- Yee, K. K., Li, Y., Redding, K. M., Iwatsuki, K., Margolskee, R. F., Jiang, P.

- (2013). Lgr5-EGFP marks taste bud stem/progenitor cells in posterior tongue. *Stem Cells*, 31(5), 992–1000. <https://doi.org/10.1002/stem.1338>
- Yelick, P. C., & Sharpe, P. T. (2019). Tooth Bioengineering and Regenerative Dentistry. *Journal of Dental Research*, 98(11), 1173–1182. <https://doi.org/10.1177/0022034519861903>
- Yin, X.L., Mead, B.E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J.M., & Levy, O. (2016). Engineering stem cell organoids. *Cell Stem Cell*, 18(1), 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.12.005>
- Yoshimoto, S., Yoshizumi, J., Anzai, H., Morishita, K., Okamura, K., Hiraki, A., & Hashimoto, S. (2020). Inhibition of Alk signaling promotes the induction of human salivary-gland-derived organoids. *Disease models & mechanisms*, 13(9). <https://doi.org/10.1242/dmm.045054>
- Young, C.S., Terada, S., Vacanti, J.P., Honda, M., Bartlett, J.D., & Yelick, P.C. (2002). Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *Journal of dental research*, 81(10), 695–700. <https://doi.org/10.1177/154405910208101008>
- Zheng, C., Chen, J., Liu, S., & Jin, Y. (2019). Stem cell-based bone and dental regeneration: A view of microenvironmental modulation. *International Journal of Oral Science*, 11(3), 23. <https://doi.org/10.1038/s41368-019-0060-3>
- Zhou, T., Pan, J., Wu, P., Huang, R., Du, W., Zhou, Y., Wan, M., Fan, Y., Xu, X., Zhou, X., Zheng, L., & Zhou, X. (2019). Dental Follicle Cells: Roles in Development and Beyond. *Stem Cells International*, 2019, 9159605. <https://doi.org/10.1155/2019/9159605>

Anexos

Anexo I- Checklist Prisma

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	1
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	13-14
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	29-31
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	31
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	31-33
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	31-33
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	31-33
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	31-33

Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	31-33
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	31-33
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	33
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	36
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	37-52
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	55-59
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	55-59
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	55-59

Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	
DISCUSSION			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	60-70
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	71
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	

Anexo II- Ferramenta utilizada para avaliação do risco de viés (*Quality assessment tools for in-vitro studies (version 2)*)

Table 4 – Quality assessment tool for In-vitro studies		Description
Sample Selection & Experimental Setup	Do authors report a description of the sample collection allowing the reader to understand whether the samples represent technical or biological replicates? (Yes, No, Unclear)	<u>Technical replicates</u> : a test performed on the same sample multiple times <u>Biological replicates</u> : a test performed on biologically distinct samples representing an identical time point or treatment dose (Altogen Biosystems, 2017, Lazic et al., 2018)
	Is the experimental unit clearly stated? (Yes, No)	Three types are defined by Lazic as biological unit of interest (BU), experimental unit (EU) and Observational unit (OU). BU is the entity about which interferences are made – the associated experiment tests a hypothesis, estimate a specific property that leads to a conclusion. The experimental unit (EU) is randomly and independently assigned to the test environment (the sample size N is equal to number of EUs). There are other factors that affect it – this can be a BU of interest, group of Bus, parts of a BU or a sequence observations on a BU. The ideal approach to genuine replication is random and independent assignment. Moreover, treatment should be applied independently to each EU and EUs should not influence each other. If this cannot be met – a different unit can be used as EU – this can be one level up in the biological and technical hierarch. Finally observational unit is the entity which the measurement are taken. The latter might be different from EUs and Bus. The increase in OUs does not increase the sample size (Lazic et al., 2018).
	Do authors report a statement of how many times the experiment shown was replicated in the laboratory? (Yes, No, Unclear)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5902037/ “In cell culture experiments cells are often both the OUs and BUs of interest, but rarely the EU. Suppose an aliquot of cells is thawed and the cell suspension is pipetted into different wells of a microtitre plate. Cells are randomised to wells, and then wells to treatments, so the first criterion is met. But treatments are applied simultaneously to all cells in a well, not independently to each cell, so the second criterion is not met. In addition, it is unreasonable to assume that cells in a well have no influence on each other; they form cell-to-cell connections, release signaling molecules, and compete for the same nutrients in the media. Hence, the third criterion is not met for using cells as the EU. Thus, a well, culture dish, or another plastic container is the appropriate EU for cell culture experiments.” “The multiple wells on each day are then treated as subsamples and do not contribute to N (for example, by averaging values across wells in the same condition on each day)”.
	Is the sex of the cells sufficiently reported? (Yes, No, Unclear)	Sex is our experimental variable, there needs to be an adequate description of which data belongs to which sex (Shah et al., 2014). 10.1152/ajpcell.00281.2013
Reagents & Cells	Is the source of cell lines provided? (Yes, No, not applicable)	If it explains the source of the cell lines e.g Neonatal foreskin keratinocytes (NFSKs) select yes. If it does not, the answer is no. if the study does not provide cell lines, it will be not applicable (NPQIP, 2016).
	Do the authors report whether the lines used have been authenticated recently (e.g., by STR profiling: within 1 year of use)? (Yes, No, not applicable.)	If the article has a sentence saying that cell authentication was done within a year from publication using Short Tandem Repeat (STR) profiling, then the answer is yes. If the statement is not available, the answer is no and if they do not report cell lines, it is not applicable (NPQIP, 2016).

	Do the authors report whether the lines used have been tested for mycoplasma contamination recently (within 6 months of use)? (Yes, No, not applicable)	If there is a statement reporting the contamination, the answer is yes. If not, it is no. If no cell lines were used, the answer is no(NPQIP, 2016).
	Do authors report a description allowing the reading to understand whether cells are primary cell cultures or continuous cell line? (Yes, No)	Primary cell cultures most closely represent the tissue of origin. When subcultured they have a finite lifespan and are more prone to significant changes with increasing passage as they adapt to in vitro culture. This means the population doubling number should be carefully recorded. Continuous cell line, e.g. derived from a human cancer, can be passaged an infinite number of times (Public Health England)
	Is the passage number and/or population doubling numbers adequately reported? (Yes, No)	<i>“The passage number of a cell culture is a record of the number of times the culture has been sub-cultured, i.e. harvested and reseeded into multiple ‘daughter’ cell culture flasks. The question about whether thawing cells represents a passage or not is one that is asked frequently. When cells are trypsinized for freezing and then thawed and reseeded, this represents one passage, albeit with time out in the freezer. As a passage is recognised as the transfer of the cells to another culture dish, the passage number should be increased on reseeded, but not on freezing.”(Public Health England)</i>
	Has every antibody used in this manuscript been profiled for use in the system under study, by either citation, catalog number, clone number or validation profile? (Yes, No, Unclear)	ABB to add here from NPQIP study
Sample Size	Does the manuscript describe how the sample size was chosen to ensure adequate power to detect a pre-specified effect size? (Yes, No, Unclear)	
	- If Yes, Was the sample size calculation appropriate? (Yes, No, Unclear)	
Allocation to groups	Was the methods of allocation samples to experimental groups appropriate? (If it is randomised, the answer is yes, otherwise is no or unclear)	
Allocation Concealment	Were the investigators blinded to the group allocation during the experiment? (Yes, No, Unclear)	
Blinded Assessment of Outcome	Were the investigators blinded to the group allocation when assessing the outcome(s)? (Yes, No, Unclear)	
Attrition	Does the manuscript describe if samples were excluded from the analysis? (Yes, No, Unclear)	
	- If yes, were exclusion criteria pre-defined? (Yes, No, Unclear)	-