



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA COM RECURSO A CÉLULAS  
ESTAMINAIS MESENQUIMAIS**

Trabalho submetido por  
**Giovanni Rodolfo Girotto**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2022**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**REGENERAÇÃO ÓSSEA COM RECURSO A CÉLULAS  
ESTAMINAIS MESENQUIMAIS**

Trabalho submetido por  
**Giovanni Rodolfo Girotto**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Eugénio Pereira**

e coorientado por  
**Mestre Pedro Trancoso**

**setembro de 2022**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Eugénio Pereira, por toda a ajuda na realização deste projeto, pela disponibilidade, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pela motivação para a minha vida profissional futura.

Ao meu co-orientador Mestre Pedro Trancoso, pela ajuda e orientação na realização desta dissertação.

Ao Dr. Dennis Smiler e ao Professor Doutor Alexander Salvoni pelo apoio e disponibilização do seu conhecimento, fundamental na realização deste trabalho.

Ao Prof. Doutor José Silva Marques, por ter motivado o início deste trabalho.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, por me acolher nestes 6 anos, um agradecimento aos professores que cruzaram o meu percurso.

A todos os meus amigos de faculdade, sem eles não teria sido a experiência que foi, em especial à minha parceira de clínica Ana, por me acompanhar todos os dias neste último ano, pelo seu apoio, pelos conselhos e, acima de tudo, pela excelente amizade.

À minha melhor amiga Mariana, que acompanhou do início ao fim este percurso, sempre a torcer e a gritar por mim.

Aos meus primos Nicole e Paulo, pelas horas a ouvir-me relatar os desafios que iam surgindo, motivando-me e apoiando para a concretização deste sonho.

A toda a minha família, por me apoiar em todo o meu percurso académico, incondicionalmente, do início ao fim.

Ao meu irmão por todo o auxílio e conselhos na realização do curso, transmitindo-me o seu conhecimento.

Ao meu pai, faltam-me as palavras para agradecer todos os ensinamentos, todo o apoio, todos os conselhos, a segurança transmitida e o carinho. À minha mãe por estar sempre lá para mim, por me apoiar em todos os momentos da minha vida, parte desta conquista é graças a eles.

Finalmente quero agradecer à minha namorada Raquel, que acompanhou todo o meu percurso, sem a sua força não sei como teria sido esta jornada. Um obrigado não chega para tudo o que fez e faz por mim, por toda a paciência nas horas intermináveis de estudo, pela motivação nas horas mais negras, pelo apoio incondicional quando as lágrimas falavam mais alto, sem dúvida o meu porto seguro e o meu maior apoio, a quem amo do fundo do coração, hoje e sempre.







## Resumo

A Medicina Regenerativa já estuda o potencial terapêutico das células estaminais mesenquimais, também denominadas de células estromais mesenquimais multipotentes, há longos anos.

Estas células não apresentam tantas contraindicações devido à sua não pluripotência e capacidade teratogénica como as células estaminais embrionárias podendo ser isoladas a partir de vários tecidos diferenciados.

As células estaminais mesenquimais proliferam e diferenciam-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* após transplante. Além de se diferenciarem em células de origem da mesoderme, podem também originar células da linhagem endodérmica e ectodérmica, através de transdiferenciação.

Existem vários locais de recolha das células estaminais mesenquimais, intra e extraorais, sendo que dentro das fontes disponíveis, as mais utilizadas atualmente são a medula óssea e o tecido adiposo.

É possível estimular a diferenciação osteoblástica destas células através da adição de agentes específicos ao meio, entre eles a dexametasona, o ácido ascórbico, o beta-glicerofosfato ou soro fetal animal, entre outros.

O isolamento e a cultura fácil destas células, o alto índice de expansão *ex vivo* e os potenciais mecanismos terapêuticos das células estaminais mesenquimais, contribuem para a sua crescente exploração e utilização.

O tecido ósseo apresenta um certo grau de autorreparação, no entanto, essa capacidade é limitada quando é excedido um valor crítico. Desta forma a regeneração óssea está indicada na reabilitação de defeitos ósseos, que podem ser originados por lesões tumorais, traumatismos ósseos, malformações congénitas e exodontias traumáticas.

Esta revisão bibliográfica incide na abordagem das propriedades, funções, fontes e formas de aplicação das células estaminais mesenquimais, baseada na literatura mais recente, bem como a descrição das técnicas utilizadas para reconstrução óssea em medicina dentária.

**Palavras-chave:** Células Estaminais Mesenquimais, Regeneração Óssea, Diferenciação Osteoblástica, Aumento de Volume Ósseo



## Abstract

Regenerative Medicina has been studying the therapeutic potential of Mesenchymal stem cells, also called multipotent Mesenchymal stromal cells, for many years.

These cells don't pose as many obstacles due to non-pluripotency and teratogenic capacity as embryonic stem cells and can be isolated from various differentiated tissues.

Mesenchymal stem cells proliferate and differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* after transplantation. In addition to differentiating into cells of mesoderm origin, they can also give rise to cells of endodermal and ectodermal lineages, through transdifferentiation.

There are several sites for collecting Mesenchymal stem cells, intra and extraorally, and among the available sources, the most used nowadays are bone marrow and adipose tissue.

It is possible to stimulate the osteoblastic differentiation MSCs by adding specific agents to the medium, among them dexamethasone, ascorbic acid, beta-glycerophosphate or fetal animal serum, among other.

The ease in isolating and culturing of these cells, the high rate of *ex vivo* expansion and the potential therapeutic mechanisms of Mesenchymal stem cells, contribute to their increase and ensuing exploitation.

Bone tissue exhibits a certain degree of self-repair, however, it is limited when a critical value is exceeded. Thus, bone regeneration is required to treat bone defects, which can be caused by tumor lesions, bone trauma, congenital malformations and dental extractions.

This bibliographic review focuses on the approach of the properties, functions, sources and mechanisms of applications of Mesenchymal stem cells, based on the most recent literature, as well as the description of the techniques described for bone reconstruction and augmentation in dentistry.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells, Bone Regeneration, Osteoblast Differentiation, Bone Augmentation



## Índice Geral

<b>Resumo .....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Índice de Figuras .....</b>	<b>6</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>8</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>II. Desenvolvimento.....</b>	<b>15</b>
2.1 Introdução histórica .....	15
2.2 Células Estaminais – O que são? .....	18
2.3 Células Estaminais – Tipos.....	21
2.4 Células Estaminais Mesenquimais – Definição .....	24
2.5 Células Estaminais Mesenquimais – Fontes.....	26
2.5.1 Medula Óssea – BMMSCs.....	28
2.5.2 Cordão Umbilical – UCMSCs.....	30
2.5.3 Tecido Adiposo – ATMSCs .....	31
2.5.4 Tecidos Dentários – DMSCs.....	32
2.6 Regeneração Óssea .....	34
2.6.1 Diferenciação Osteoblástica.....	39
2.6.2 Tipos de Defeitos Ósseos .....	40
2.6.3 Enxertos Ósseos .....	47
2.6.4 Técnicas de Reconstrução Óssea .....	48
2.6.4.1 Regeneração Óssea Guiada (ROG) .....	50
2.6.4.2 Elevação do Pavimento do Seio Maxilar – <i>Sinus Lift</i> .....	51
2.6.4.3 Enxerto de Bloco .....	54
2.6.4.4 Técnica Interposicional Mandibular .....	56
2.6.4.5 Distração Óssea .....	56
2.6.4.6 Expansão da Crista Alveolar – <i>Ridge Splitting</i> .....	57
2.6.4.7 Preservação do Alvéolo Dentário – <i>Socket Preservation</i> .....	59
2.7 Aplicação de Células Estaminais Mesenquimais .....	60
2.8 Regulamentação e Criopreservação de Células Estaminais .....	66
<b>III. Conclusão .....</b>	<b>69</b>
<b>IV. Bibliografia .....</b>	<b>71</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Milestones da história da investigação de células estaminais. ....	18
Figura 2. Origem das células estaminais da massa interna do blastocisto. Adaptado de (Landry & Zucker, 2004). ....	19
Figura 3. Propriedades e tipos de células estaminais. A: Exemplificação das propriedades de autorrenovação e potencial de diferenciação; B: Desenvolvimento das células estaminais nos diferentes tipos como células estaminais embrionárias (ECSs) e células estaminais mesenquimais (MSCs); C: Ilustração da origem de células estaminais pluripotenciais induzidas (iPSCs) de fibroblastos de ratos induzidos por fatores específicos. Adaptado de (Ahamad & Singh, 2021). ....	23
Figura 4. A multipotência das MSCs. Esta figura exemplifica a capacidade de autorrenovação e diferenciação das células estaminais mesenquimais (MSCs) e demonstra o processo de transdiferenciação em células de linhagem da endoderme e ectoderme. Adaptado (Uccelli et al., 2008). ....	25
Figura 5. Figura ilustrativa de fontes e aplicações das células estaminais mesenquimais (MSCs). Adaptado de (Kangari et al., 2020). ....	28
Figura 6. Técnica de aspiração e biópsia da medula óssea. Adaptado de (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002). ....	30
Figura 7. Ilustração das várias fontes de células estaminais mesenquimais derivadas de tecidos dentários (DMSCs). ....	34
Figura 8. Esquema representativo das opções disponíveis para a regeneração de tecido ósseo. ....	39
Figura 9. Classificação óssea proposta por Lekholm e Zarb em 1985. ....	41
Figura 10. Densidade óssea definida por Misch (1988). ....	43
Figura 11. Os diferentes tipos de densidade óssea, esquematizados nas regiões frequentemente encontrados. ....	44
Figura 12. Classificação da reabsorção alveolar segundo Cawood e Howell (1988), na Mandíbula posterior (A) e na Mandíbula anterior (B). ....	46
Figura 13. Classificação da reabsorção, segundo Cawood e Howell (1988), na Maxila posterior (A) e na Maxila anterior (B). ....	46
Figura 14. Classificação de colônia para defeitos da crista alveolar. ....	47

Figura 15. a) - Vista intracirúrgica da “janela lateral” para acesso ao seio maxilar.	
b) - MSCs de origem alógena (MSC-TP, Chara Biologics, inc). .....	63
Figura 16. c) – Xenoenxerto bovino particulado e MSC-TP. d) – Imagem intracirúrgica da aplicação de xenoenxerto bovino e MSC-TP homogeneizado no seio maxilar. ....	63
Figura 17. e) – Imagem intracirúrgica dos dois biomateriais adequadamente compactados. f) – Vista intracirúrgica da aplicação de membrana de colagénio para encerramento da “janela lateral”.....	64
Figura 18. g) – Vista intracirúrgica do encerramento da “janela lateral” com membrana de colagénio. h) – Vista intraoperatória do encerramento da ferida operatória com sutura PTFE. ....	64
Figura 19. a) – Imagem da delimitação geográfica da crista ilíaca anterior. b) – Imagem da palpação e identificação da crista ilíaca anterior. ....	65
Figura 20. c) – Imagem da anestesia do local da aspiração. d) – Imagem da seringa de aspiração de BMMSCs. ....	65
Figura 21. e) – Imagem do depósito da seringa de aspiração contendo BMMSCs. f) – Imagem da associação das BMMSCs a xenoenxerto particulado. ....	66

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Critérios para a definição de Célula Estaminal Mesenquimal (MSC). Adaptado de (Dominici et al., 2006). .....	17
Tabela 2. Tipos, origem e potencial de diferenciação das células estaminais. Adaptado de (Bacakova et al., 2018; Cheng et al., 2019). .....	22
Tabela 3. Classificação de Misch (1988): Densidade óssea. ....	42

## Lista de abreviaturas

- ALP:** do Inglês *Alkaline Phosphatase* (Fosfatase Alcalina)
- ARP-SG:** do Inglês *Alveolar Ridge Preservation Via Socket Grafting* (Preservação do Alvéolo Dentário via Enxerto Ósseo)
- AT:** do Inglês *Adipose Tissue* (Tecido Adiposo)
- ATMP:** do Inglês *Advanced Therapy Medicinal Product* (Produto Terapêutico Medicinal Avançado)
- ATMSCs:** do Inglês *Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais do Tecido Adiposo)
- ABSCs:** do Inglês *Alveolar Bone Stem Cells* (Células Estaminais do Osso Alveolar)
- BLGs:** do Inglês *Bone Lining Cells* (Células de Revestimento Ósseo)
- BM:** do Inglês *Bone Marrow* (Medula Óssea)
- BMMSCs:** do Inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais da Medula Óssea)
- BMP:** do Inglês *Bone Morphogenetic Protein* (Proteína Morfogenética Óssea)
- BMSCs:** do Inglês *Bone Marrow Stromal Cells* (Células Estaminais da Medula Óssea)
- BPCCU:** Banco Público de Células do Cordão Umbilical
- BSPII:** do Inglês *Bone Sialoprotein 2* (Sialoproteína Óssea 2)
- CCARD:** do Inglês *Cologne Classification of Alveolar Ridge Defects* (Classificação de Colônia para Defeitos da Crista Alveolar)
- CFU-FS:** do Inglês *Colony Forming Unit-Fibroblast* (Células com de Formação de Unidades de Fibroblastos)
- COL1A1:** Cadeia de Colagénio 1  $\alpha$  1
- C-FMs:** do Inglês *Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulante de Colônia)
- DFSCs:** do Inglês *Dental Follicle Stem Cells* (Células Estaminais do Foliculo Dentário)
- DGS:** Direção Geral de Saúde
- DLX5:** do Inglês *Distal-less Homeobox 5* (Proteína Homeobox DLX-5)
- DMSCs:** do Inglês *Dental Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais Dentárias)

**DO:** Distração Óssea

**DPMSCs:** do Inglês *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais da Polpa Dentária)

**DPSCs:** do Inglês *Dental Stem Cells From Permanent Teeth* (Células Estaminais de Dentes Permanentes)

**ESCs:** do Inglês *Embryonic Stem Cells* (Células Estaminais Embrionárias)

**FGFs:** do Inglês *Fibroblast Growth Factor* (Fator de Crescimento de Fibroblastos)

**GMSCs:** do Inglês *Gingival Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais da Gengiva Aderida)

**HA:** Hidroxiapatita

**HPCs:** do Inglês *Hematopoietic Cells* (Células Hematopoiéticas)

**HSCs:** do Inglês *Hematopoietic Stem Cells* (Células Estaminais Hematopoiéticas)

**ICM:** do Inglês *Inner Cell Mass* (Massa Interna do Blastocisto)

**iPSCs:** do Inglês *Induced Pluripotent Stem Cells* (Células Estaminais Pluripotenciais Induzidas)

**IPST:** Instituto Português do Sangue e da Transplantação

**ISCT:** do Inglês *International Society for Cellular Therapy* (Sociedade Internacional de Terapia Celular)

**MSCs:** do Inglês *Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais)

**M-CSF:** do Inglês *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulante de Colónias de Macrófagos)

**OCN:** Osteocalcina

**OESCs:** do Inglês *Oral Epithelium Stem Cells* (Células Estaminais do Epitélio Oral)

**OPG:** Osteoprotegerina

**OPN:** Osteopontina

**OSX:** Osterix (Fator de transcrição específico para osteoblastos)

**PDGF:** do Inglês *Platelet Derived Growth Factor* (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas)

**PLMSCs:** do Inglês *Periodontal Ligament Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais do Ligamento Periodontal)

**PRF:** do Inglês *Platelet-Rich Fibrin* (Fibrina Rica em Plaquetas)

**PRP:** do Inglês *Platelet-Rich Plasma* (Plasma Rico em Plaquetas)

**PSCs:** do Inglês *Pluripotent Stem Cells* (Células Estaminais Pluripotenciais)

**RANK:** do Inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B* (Recetor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B)

**RANKL:** do Inglês *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand* (Ligante para o Recetor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B)

**ROG:** Regeneração Óssea Guiada

**RUNX2:** do Inglês *Runt-related Transcription Factor 2* (Fator de Transcrição 2 relativo a Runt)

**SCAPs:** do Inglês *Stem Cells from Apical Papilla* (Células Estaminais da Papila Apical)

**SCN:** do Inglês *Stem Cell Niche* (Nicho das Células Estaminais)

**SHEDs:** do Inglês *Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth* (Células Estaminais de Dentes Decíduos Exfoliados)

**TGSCs:** do Inglês *Tooth Germ Stem Cells* (Células Estaminais do Gérmen Dentário)

**UCMSCs:** do Inglês *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells* (Células Estaminais Mesenquimais do Cordão Umbilical)

**VEGF:** do Inglês *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)



## I. Introdução

A ciência que combina os princípios da biologia e da engenharia de forma a substituir funcionalmente tecidos lesados, designa-se por engenharia tecidual. Apesar de ser uma área científica moderna e ter sido pela primeira vez referenciada nos anos 80, existem relatos históricos que datam a sua primordial existência, são exemplo disso reconstruções nasais documentadas historicamente na Índia aproximadamente no ano 1000 AC (Sahakyants & Vacanti, 2020). A engenharia tecidual é uma área interdisciplinar, que combina áreas científicas como a biologia celular, biomateriais, entre outras, com o objetivo de produzir estruturas viáveis para substituir, reparar ou regenerar órgãos e tecidos danificados (Hassanzadeh et al., 2018; Sahakyants & Vacanti, 2020). Uma origem celular apropriada (células progenitoras), sinais morfogénicos indutores e matriz extracelular (*scaffold*) compõem a tríade da engenharia tecidual e tratamentos regenerativos (Bakhshandeh et al., 2017).

A regeneração óssea continua a ser um grande desafio para a medicina reconstrutiva. Apesar do tecido ósseo apresentar um certo grau de autorreparação, esta é limitada quando o defeito ósseo excede uma dimensão crítica ou surge devido a doença, tal como tumores ou infeções ósseas (Qing et al., 2020). A reconstrução craniofacial é requerida em inúmeras situações, tais como defeitos ósseos originados por lesões tumorais, traumatismos ósseos ou malformações congénitas, em que a complexidade deste desafio clínico, deve-se ao facto da região craniofacial em si ser uma estrutura constituída por tecido ósseo, cartilagem, tecidos moles e feixes neuro-vasculares, complexidade esta que exige do cirurgião um conhecimento aprofundado das técnicas cirúrgicas e biomateriais disponíveis para a sua resolução (Ansari et al., 2017).

As células estaminais são células indiferenciadas do corpo humano (Zakrzewski et al., 2019), com capacidade de autorrenovação, potencial clonogénico e capacidade de se diferenciarem em células de linhagens diferentes (Bacakova et al., 2018). Bacakova (2018) acrescenta ainda, definindo-as como unidades de organização de sistemas biológicos, que são responsáveis pela regeneração e desenvolvimento de órgãos e tecidos. Segundo Zakrzewski (2019) estas células demonstram grande potencial para se tornarem um dos aspetos mais importantes da medicina e sugere ainda que, o estudo da sua terapêutica revela bastante informação sobre os eventos que decorrem durante o

desenvolvimento humano. As principais diferentes origens de células estaminais podem dividir-se, nomeadamente, em células estaminais embrionárias (ECSs), células estaminais mesenquimais ou células estaminais adultas (MSCs) e células estaminais pluripotenciais induzidas (iPSCs) (Ghaneialvar et al., 2018).

Células estaminais mesenquimais (MSCs) encontram-se entre os tipos de células mais estudadas para terapia celular, graças à sua facilidade de isolamento, cultivo e elevado potencial de expansão *ex vivo* (Rendra et al., 2020). O termo células estaminais mesenquimais (MSCs) foi introduzido por Caplan et al. nos anos 90 (Rendra et al., 2020), estas células comparativamente a outro tipo de células estaminais, não suscitam controvérsias de um ponto de vista ético, como é o caso das ESCs devido à não teratogenicidade (Cheng et al., 2019). As MSCs detêm a capacidade de regenerar tecido ósseo, tecido cartilaginoso e tecido adiposo, adicionalmente não estão limitadas à diferenciação de linhagem mesenquimal, podendo diferenciar-se em células de linhagem endodérmica e ectodérmica (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; Cheng et al., 2019).

Assim, a utilização destas células tem sido descrita como o tratamento ideal na reconstrução e remodelação óssea (Chu et al., 2019) e associado ao seu potencial de expansão e diferenciação, a sua não imunogenicidade e a capacidade de migração sugerem que a sua utilização não está limitada à medicina regenerativa (Cheng et al., 2019).

## II. Desenvolvimento

### 2.1 Introdução histórica

Uma das técnicas utilizadas na regeneração óssea baseia-se na aplicação de células para preenchimento de defeitos ósseos, as quais podem ser transportadas para o local pré-definido, através de autoenxertos ósseos, ou cultivando-as *in vitro*, induzindo depois a sua diferenciação na linhagem osteoblástica e implantando *in vivo* de forma a induzir a formação de novo tecido ósseo (Ho-Shui-Ling et al., 2018a).

A primeira identificação de células estaminais surgiu há mais de meio século, no ano de 1961, quando James Till e Ernest McCulloch, na Universidade de Toronto no Canadá, descreveram células derivadas da medula óssea de ratos adultos, que tinham a capacidade de se diferenciar noutro tipo de células (Liu et al., 2020), no qual se observaram algumas propriedades na população de células estaminais, tais como autorrenovação e multipotência (Marcus & Woodbury, 2008).

O cientista Alexander Friedenstein foi a primeira pessoa a descrever células estaminais mesenquimais (MSCs), em 1976, as quais foram caracterizadas como uma subpopulação de células derivadas da medula óssea, com aderência ao plástico e, propriedades hematopoiéticas e osteogénicas (Rendra et al., 2020). No entanto, foi quase um século antes, que J.Cohnheim identificou uma colónia de células não-hematopoiéticas com capacidade de formação de unidades de fibroblastos (CFU-Fs), a partir da medula óssea, que seriam mais tarde assumidas como MSCs (Attia & Mashal, 2020). Contemporaneamente foram chamadas de “células da medula óssea e estroma” (BMSCs) (Hanna et al., 2018) por terem sido isoladas na medula óssea e estroma do baço e timo (Han et al., 2014). O trabalho de Friedenstein estabeleceu o fundamento para futuros estudos, demonstrando que as BMSCs são as células antecessoras comuns dos tecidos mesenquimais (Uccelli et al., 2008). Friedenstein ainda observou que estas células não pertenciam à linhagem celular hematopoiética e tinham a capacidade de formar tecido ósseo e células formadoras de cartilagem (Gomez-Salazar et al., 2020). Com o avançar da investigação destas células, estabeleceu-se que as mesmas tinham potencial para originar osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos (Gomez-Salazar et al., 2020).

Em 1978, Schofield propôs a hipótese do “nicho das células estaminais” (SCN), que descrevia fisiologicamente o microambiente que fornece suporte às células estaminais (Via et al., 2012). O conceito de nicho manteve-se apenas como hipótese, até ter sido validado empiricamente, por Xie e Spradling em 1998, no qual utilizaram a *drosophila melanogaster* (mosca da fruta) e conseguiram provar que a célula estaminal reside num local altamente especializado, o qual é responsável por preservar o seu fenótipo, fornecer sinais específicos tais como proteínas morfogenéticas do osso (BMP) e controlar a sua diferenciação (Papayannopoulou & Scadden, 2008). No entanto, foi apenas mais tarde que Scadden estipulou uma definição completa do SCN, como um “local anatómico específico que regula a forma de como as células estaminais participam na síntese, manutenção e reparação tecidual” (Via et al., 2012).

Na década de 1990, Arnold Caplan denominou o termo “Células Estaminais Mesenquimais”, baseando-se no seu potencial de diferenciação em diferentes linhagens (Rendra et al., 2020) tendo sido a primeira pessoa a cultivar estas células com origem em tecido humano (Gomez-Salazar et al., 2020).

Mais tarde, em 1998, James Thomson isolou pela primeira vez em laboratório, células estaminais embrionárias humanas (hESCs) (Liu et al., 2020). Este procedimento foi realizado a partir de embriões humanos, produzidos exclusivamente para o propósito, por fertilização *in vitro*, isolados e implantados em fibroblastos de embriões previamente irradiados de ratos. Desta forma, está implícita a destruição de embriões humanos, o que provocou bastante controvérsia ética e moral (Mora et al., 2017).

Anos mais tarde, a Sociedade Internacional da Terapia Celular (ISCT) definiu então o termo “Célula Estaminal Mesenquimal” e a sua sigla “MSC”, derivada da língua nativa “Mesenchymal Stem Cell” e, estabeleceram critérios mínimos de classificação das células, como está descrito na Tabela 1 (Rendra et al., 2020).

CÉLULAS ESTAMINAIS	MARCADORES PADRÃO DE ANTIGÊNIO DE SUPERFÍCIE (Ag)	POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i>
Em condições de estrutura padronizadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 95% da população de MSC deve expressar os marcadores CD105; CD73; CD90</li> <li>• Menos de 2% deverá expressar os marcadores CD45; CD34; CD14; CD11b; CD79a; CD19; HLA-DR.</li> </ul>	<p>Osteoblastos</p> <p>Condrócitos</p> <p>Adipócitos</p>

Tabela 1. Critérios para a definição de Célula Estaminal Mesenquimal (MSC). Adaptado de (Dominici et al., 2006).

Em 2018, a Agência Europeia de Medicamentos autorizou finalmente a primeira venda de um produto com MSCs, destinado a tratar fístulas perianais complexas em pacientes com doença de Crohn (Rendra et al., 2020).

A evidência reunida até à data, apresentada na figura 1, impulsionaram a exploração do papel das células estaminais na Medicina Dentária (Santosh & Bose, 2019).

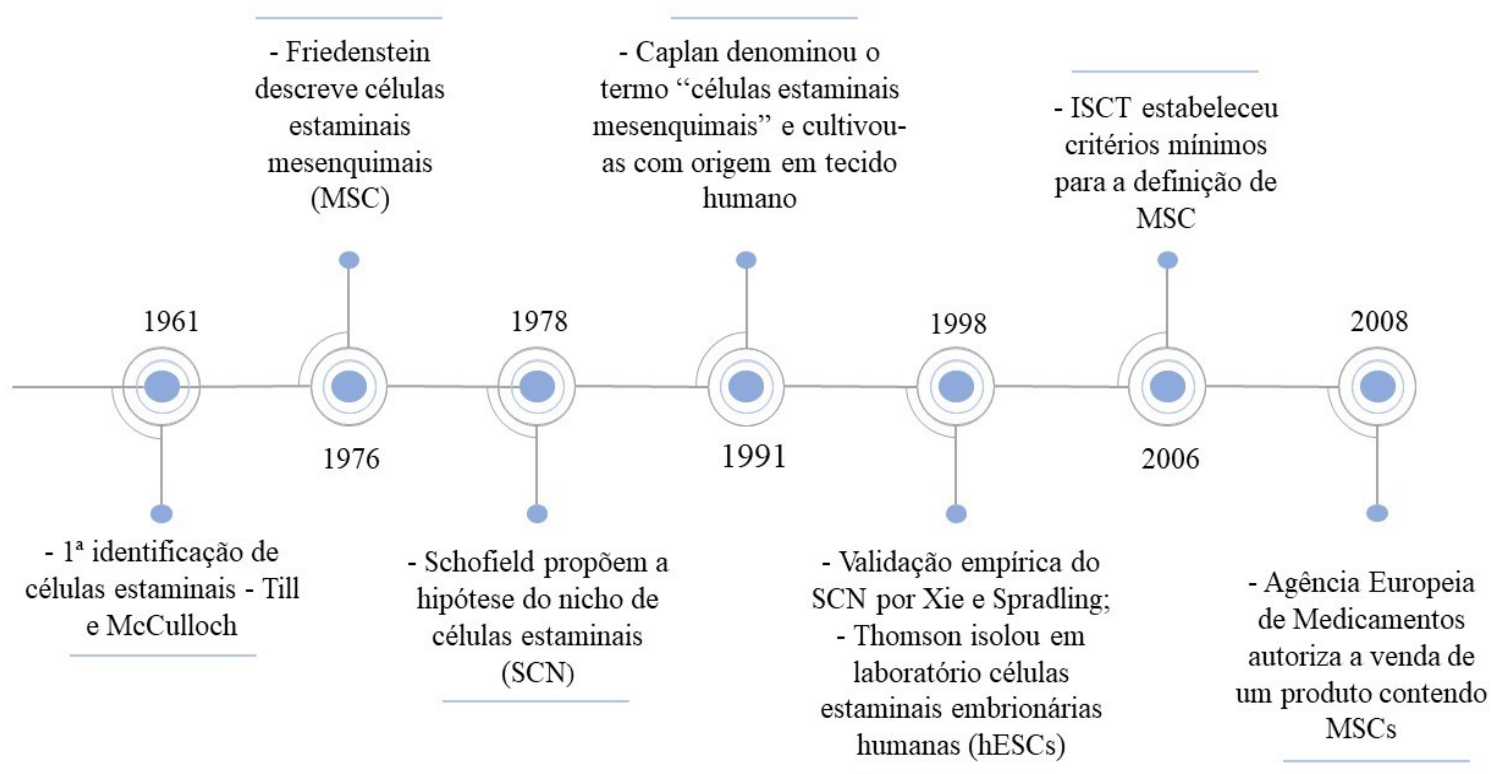


Figura 1. Milestones da história da investigação de células estaminais.

## 2.2 Células Estaminais – O que são?

Células estaminais representam a base de todos os órgãos constituintes do corpo humano (Alessandrini et al., 2019).

Qualquer célula no corpo humano tem um ancestral comum, o óvulo fertilizado e, sabemos que existem mais de 200 tipos diferentes de células no nosso corpo, todas derivadas de um aglomerado de células estaminais do embrião, designado por massa celular interna do blastocisto (ICM), exemplificado na figura 2 (Santosh & Bose, 2019). As células estaminais têm a capacidade de se dividir assimetricamente (Alessandrini et

al., 2019), possuem capacidade de autorrenovação e diferenciação em células de diferentes linhagens, no entanto não são homogêneas, existem em hierarquia consoante o desenvolvimento celular e encontram-se diferentes tipos de células estaminais com diferente potencial de diferenciação (Aly, 2020). Ainda podem ser descritas como unidades de organização biológica responsáveis pelo desenvolvimento e regeneração de sistemas de órgãos e tecidos, em constante evolução via seleção natural (Bacakova et al., 2018).

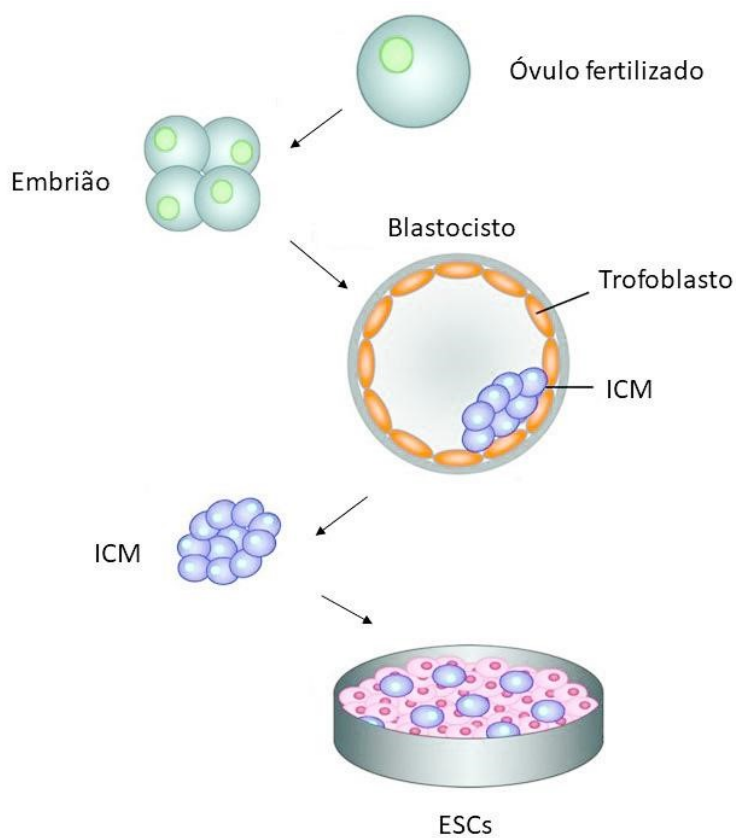


Figura 2. Origem das células estaminais da massa interna do blastocisto. Adaptado de (Landry & Zucker, 2004).

Quando falamos em potência de uma célula estaminal, estamos a descrever a habilidade da mesma replicar e diferenciar-se em células especializadas (Alessandrini et al., 2019). Totipotência e pluripotência são os níveis mais elevados de diferenciação de células estaminais e estão presentes nas fases pré-embrionárias (Alessandrini et al., 2019; Aly, 2020). Os blastómeros originados a partir de um óvulo fertilizado (zigoto), são células estaminais totipotentes e podem originar todos os tecidos do corpo humano, até mesmo a placenta (Alessandrini et al., 2019). Quando o aglomerado de blastómeros, denominado de mórula (Ahamad & Singh, 2021), forma o blastocisto, a ICM contém células estaminais embrionárias (ECS) as quais são pluripotenciais. Continuando a embriogénese, as células pluripotenciais formam camadas celulares: endoderme, mesoderme e ectoderme, cada uma originará, eventualmente, células diferenciadas, tecidos e, mais tarde, o organismo adulto (Zakrzewski et al., 2019). Após essa diferenciação numa camada celular, as células tornam-se células multipotentes, ou seja, com capacidade de diferenciação em tipos celulares limitados relacionados com o tecido de origem. É esta propriedade das células estaminais adultas ou mesenquimais que cria um estado de homeostase durante toda a vida do organismo, estando presentes em quase todos os tecidos, nomeadamente na medula óssea, em tecidos orais e dentários. Por sua vez, as células estaminais multipotentes diferenciam-se em células progenitoras que são oligopotentes e unipotentes, com diferenciação e especialização celular muito mais restrita (Alessandrini et al., 2019; Aly, 2020).

A diferenciação celular das células estaminais pode dividir-se em 3 mecanismos principais: 1. externa; 2. interna e 3. divisão celular (Zakrzewski et al., 2019).

1. Neste processo as células estabelecem contacto com outras células vizinhas, ou com secreções químicas sintetizadas por tecidos vizinhos, criando um ambiente propício para a diferenciação (Zakrzewski et al., 2019);

2. Na segunda hipótese a diferenciação dá-se por regulação génica no DNA, através da acetilação da cromatina e da metilação de sequências genéticas promotoras, criticamente importantes para que esse gene, que contém a zona metilada, não seja expresso e, portanto, a diferenciação se dê no sentido certo (Tyurin-Kuzmin et al., 2020);

3. A divisão celular pode conduzir à diferenciação ou não, podendo ser simétrica, onde a partir de uma célula-mãe são produzidas duas células-filha, idênticas entre si e à célula-mãe, ou assimétrica. No caso da divisão assimétrica, a partir da célula-mãe originam 2 células-filha, diferentes entre si,

que podem ser iguais à célula-mãe, equilibrando assim a autorrenovação e diferenciação das células estaminais (Silva-Vargas et al., 2018; Venkei & Yamashita, 2018).

O processo de diferenciação de células estaminais constitui a base do desenvolvimento individual, tal como da manutenção da homeostase e renovação tecidual. É através de processos metabólicos, descritos de forma sucinta anteriormente, que o corpo regula a autorrenovação e diferenciação das células estaminais, mantendo o equilíbrio entre as células estaminais diferenciadas e indiferenciadas (Tyurin-Kuzmin et al., 2020).

O mecanismo da divisão assimétrica, essencialmente, assegura este equilíbrio entre o número de células estaminais indiferenciadas e diferenciadas, em que uma das células-filhas é uma célula estaminal que mantém as características e potencialidade da célula-mãe e, a outra, é uma célula diferenciada com capacidade mais restrita de diferenciação. A divisão simétrica, também contribui na manutenção do equilíbrio, no sentido em que as duas células-filhas são células estaminais indiferenciadas (Silva-Vargas et al., 2018).

### **2.3 Células Estaminais – Tipos**

Existem principalmente 3 tipos de células estaminais: células estaminais embrionárias (ECSs), células estaminais mesenquimais ou adultas (MSCs) e células estaminais pluripotenciais induzidas (iPSCs) (Ghaneialvar et al., 2018). Como indicado na tabela 2 e ilustrado na figura 3, estes grupos de células estaminais apresentam diferentes níveis de diferenciação ou potência. As únicas células estaminais com capacidade de totipotência são as células estaminais derivadas da mórula (Bacakova et al., 2018). As ECSs, derivadas da ICM do blastocisto, descrito no capítulo anterior, são pluripotenciais tal como as iPSCs e, as células estaminais que derivam do feto são chamadas de adultas ou mesenquimais (MSCs) (Bacakova et al., 2018). As MSCs apresentam multipotência, isto é, têm um espectro de diferenciação menor que as células estaminais pluripotenciais (PSCs), mas podem especializar-se em linhagens celulares específicas (Zakrzewski et al., 2019). No entanto, as MSCs não estão restritas à sua

linhagem germinativa, podendo diferenciar-se em células de linhagem endodérmica e ectodérmica (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

As diferentes origens das células estaminais podem ser divididas em: 1. tecido embrionário, 2. tecido fetal, 3. localizações específicas no organismo adulto e 4. células somáticas adultas pós-reprogramação genética, como é o caso das iPSCs (Bacakova et al., 2018).

<b>CÉLULAS ESTAMINAIS</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO</b>
Embrionárias	Embrionárias	Embrionárias
—	Blastocisto	Pluripotenciais
Adultas	Medula óssea, tecido adiposo, tecidos orais e dentários, músculo esquelético, sangue, pele, órgãos, etc.	Multipotenciais
Induzidas	Células somáticas diferenciadas	Pluripotenciais

Tabela 2. Tipos, origem e potencial de diferenciação das células estaminais. Adaptado de (Bacakova et al., 2018; Cheng et al., 2019).

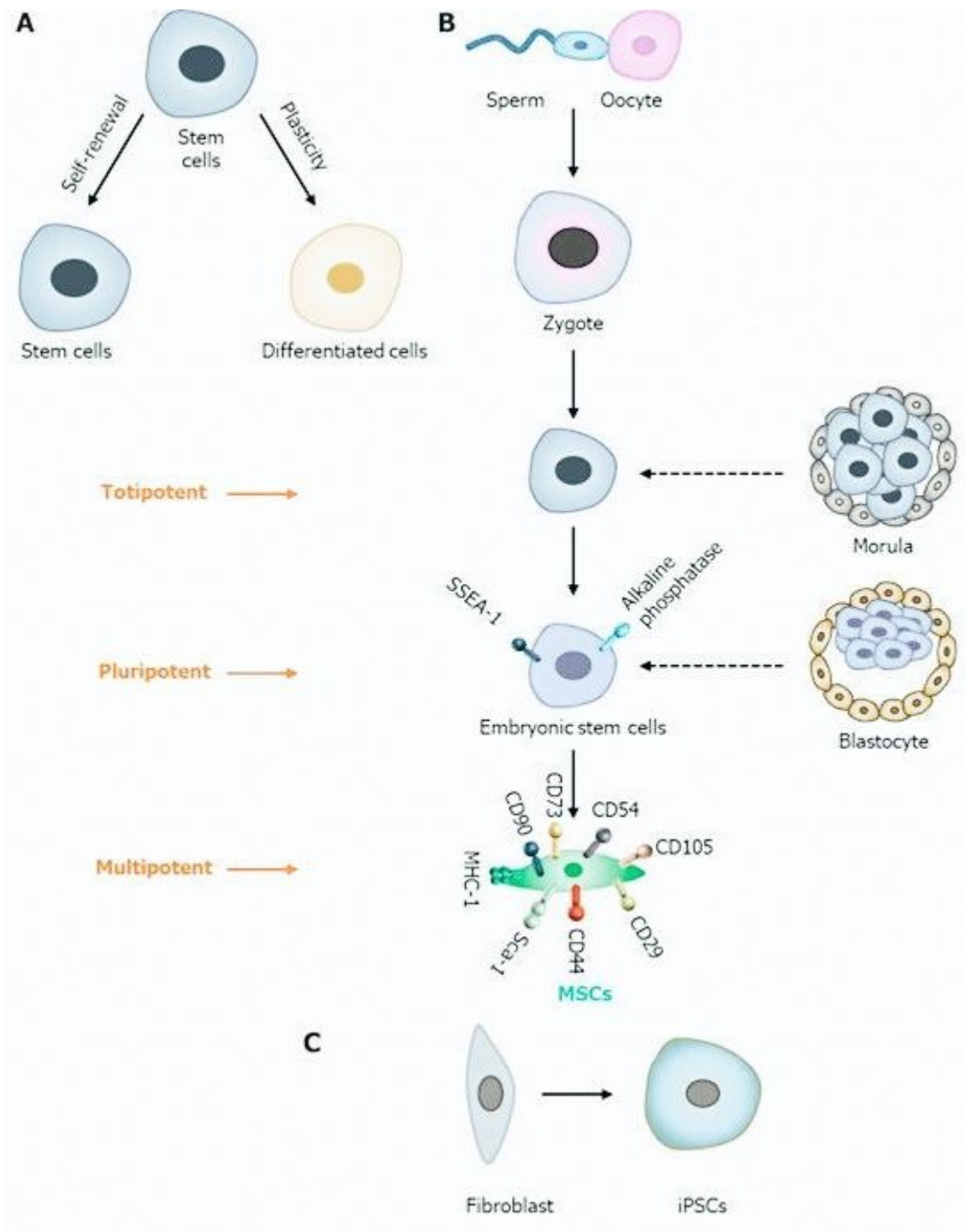
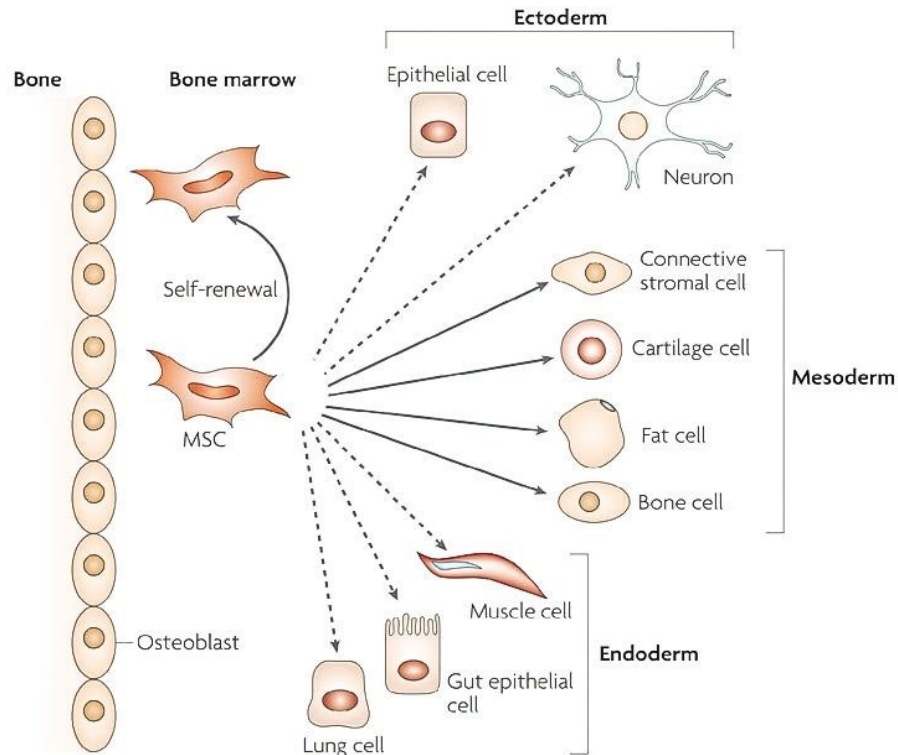


Figura 3. Propriedades e tipos de células estaminais. A: Exemplificação das propriedades de autorrenovação e potencial de diferenciação; B: Desenvolvimento das células estaminais nos diferentes tipos como células estaminais embrionárias (ECSs) e células estaminais mesenquimais (MSCs); C: Ilustração da origem de células estaminais pluripotenciais induzidas (iPSCs) de fibroblastos de ratos induzidos por fatores específicos. Adaptado de (Ahmad & Singh, 2021).

## 2.4 Células Estaminais Mesenquimais – Definição

Células estaminais mesenquimais (MSCs), ou células estromais mesenquimais multipotentes estão entre o grupo celular mais estudado para terapia celular, graças à facilidade do seu isolamento, cultura e potencial de expansão *ex vivo* (Rendra et al., 2020). São células estaminais adultas, com capacidade de autorrenovação, aderência ao plástico, potencialidade primária de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e, não requerem compatibilidade genética (Alessandrini et al., 2019; Cheng et al., 2019; Rendra et al., 2020). No entanto, o seu potencial de diferenciação não está limitado à linhagem germinativa da mesoderme, como é exemplificado na figura 4, podendo as MSCs diferenciarem-se em células da endoderme e ectoderme através de um processo chamado transdiferenciação, no qual uma célula não estaminal se transforma noutra de linhagem germinativa diferente, ou quando a mesma situação acontece numa célula estaminal já diferenciada parcialmente (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).



*Figura 4.* A multipotência das MSCs. Esta figura exemplifica a capacidade de autorrenovação e diferenciação das células estaminais mesenquimais (MSCs) e demonstra o processo de transdiferenciação em células de linhagem da endoderme e ectoderme. Adaptado (Uccelli et al., 2008).

MSCs foram isoladas com êxito em vários tecidos como a medula óssea (BMMSCs), tecido adiposo (ATMSCs) e sangue periférico (HSCs) (W. Lin et al., 2017). Além destas, várias são as fontes de recolha de MSCs, visto que se encontram presentes em quase todos os tecidos adultos, nomeadamente de vários tecidos dentários e orais, os quais serão descritos no capítulo seguinte (Santosh & Bose, 2019).

Estas células modulam respostas do sistema imune inato e adaptativo, detêm atividade imunossupressora e não fornecem apenas uma fonte para regeneração ou substituição de células num determinado local, também fortalecem ou ativam as células locais (como células estaminais residentes ou progenitoras, células endoteliais e fibroblastos) de forma a facilitar a regeneração tecidual via estimulação parácrina (W. Lin et al., 2017). As MSCs demonstram mecanismos terapêuticos como anti-fibrótico, anti-apoptose (prevenindo a morte celular programada) e pró-angiogénico (resultando na

revascularização), sendo também classificadas como “produto terapêutico medicinal avançado” (ATMP, da língua nativa advanced therapy medicinal product) (Rendra et al., 2020).

O estudo do uso de MSCs tem demonstrado potencializar a regeneração de tecido ósseo em inúmeros casos clínicos ao diferenciarem-se diretamente em osteoblastos e ao modularem o ambiente biológico local secretando fatores de crescimento, como BMP-2 (proteínas morfogenéticas ósseas), e citocinas anti-inflamatórias (W. Lin et al., 2017).

Inicialmente descoberto por Fiedenstein, como referido anteriormente, as células estaminais mesenquimais derivadas da medula óssea (BMMSCs), descritas como aderentes ao plástico e com potencial osteogénico e hematopoiético, são o antecessor comum dos tecidos mesenquimais e, portanto, a medula óssea é considerada a principal fonte de MSCs do nosso corpo (Rendra et al., 2020). Contudo, desde 2018, quando foi aprovado o primeiro medicamento à base de MSCs, o tecido adiposo demonstrou muito interesse terapêutico e hoje é também considerado, em junção com a medula óssea, uma das principais fontes de recolha de MSCs (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018; Rendra et al., 2020).

## 2.5 Células Estaminais Mesenquimais – Fontes

Células estaminais mesenquimais (MSCs) podem ser isoladas praticamente de todos os órgãos e tecidos do corpo humano. Todavia, esta seleção da fonte dadora deve ser cuidada e idealmente designada tendo em conta as melhores características no que diz respeito à logística, praticidade e comportamento *in vitro* (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018). As melhores fontes para colheita de MSCs descritas na literatura são a medula óssea (BM) e o tecido adiposo (AT) (Rendra et al., 2020). São as limitações da colheita destas células, que influenciam a escolha do local de colheita, incluem a dificuldade do procedimento, o quão invasivo é a técnica de recolha e as características da fonte dadora (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

A recolha de MSCs através da medula óssea, tecido adiposo ou do cordão umbilical é considerado de baixa complexidade e apresenta resultados promissores *in vitro* e *in vivo* graças à sua capacidade em formar tecido ósseo, cartilagem e à capacidade imunomoduladora (Donnelly et al., 2018).

As MSCs regulam o equilíbrio entre a sua diferenciação, proliferação e autorrenovação através de fatores funcionais e físicos no formato de *feedback*, do nicho de células estaminais (SCN), descrito anteriormente. O nicho foi pela primeira vez descrito há quatro décadas, por Schofield, e trata-se de um microambiente especializado que mantém e regula o estado de latência das MSCs. Quando existe um estímulo, determinadas alterações no nicho (SCN) vão ativar estas células e promover a sua diferenciação, proliferação e migração (H. Lin et al., 2019).

Atualmente sabemos que é possível isolar MSCs de vários tecidos, tais como dos tecidos musculares, cordão umbilical, tecidos dentários e orais, pele, glândulas salivares, placenta, geleia de Wharton, medula óssea, tecido adiposo e tecidos perinatais, como ilustrado na figura 5. A principal fonte de recolha é a medula óssea, no entanto, o tecido adiposo, tecidos dentários e cordão umbilical são outras fontes possíveis de recolha e serão descritos nos próximos subcapítulos (Mushahary et al., 2018a; Rodríguez-Fuentes et al., 2021).

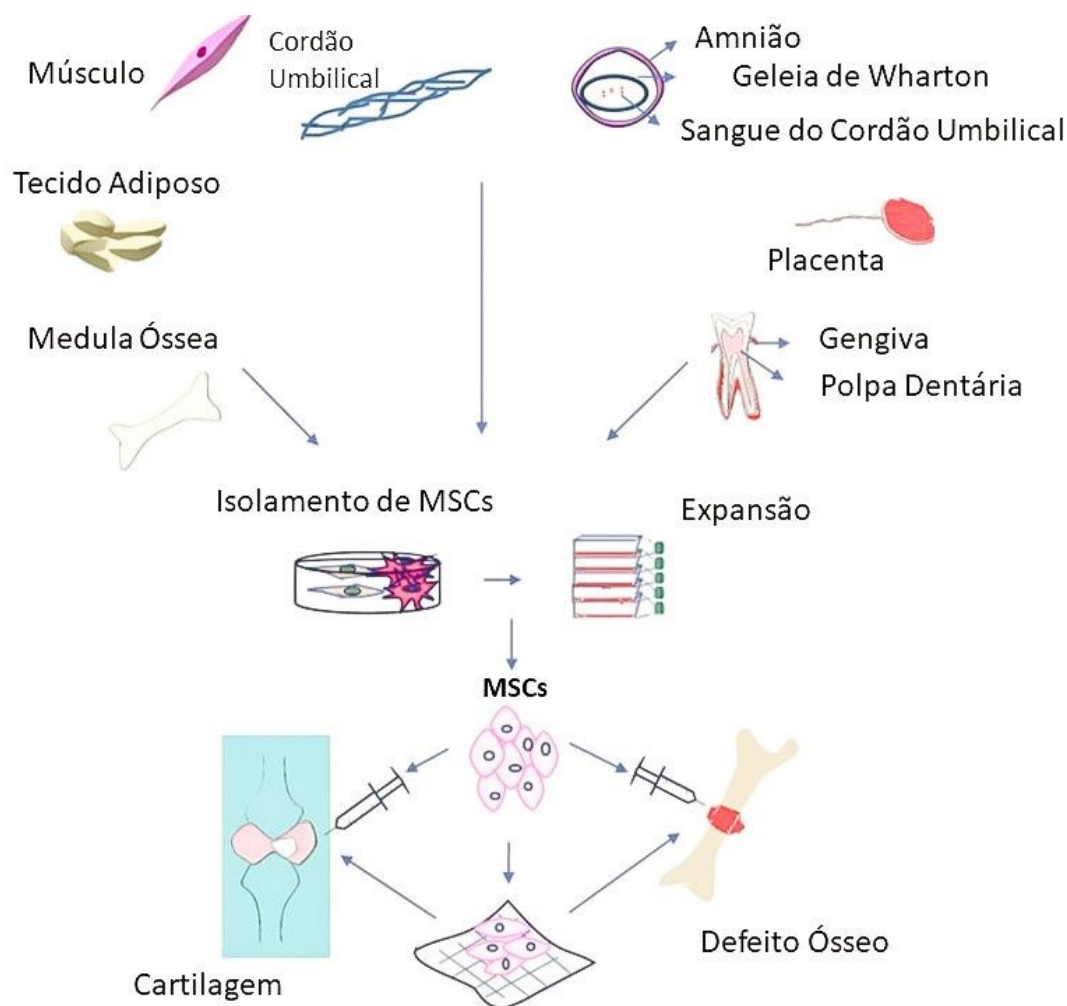


Figura 5. Figura ilustrativa de fontes e aplicações das células estaminais mesenquimais (MSCs).

Adaptado de (Kangari et al., 2020).

### 2.5.1 Medula Óssea – BMMSCs

O nicho das células estaminais (SCN) na medula óssea é organizado estruturalmente na cavidade medular, sendo protegido dentro do próprio tecido ósseo. As células ósseas servem como matriz de suporte estrutural para as células hematopoiéticas (HPCs) juntamente com as reservas de cálcio. A medula óssea nos mamíferos integra o sistema imunitário, descrevendo-se como o maior órgão semissólido do corpo humano. A medula está presente na cavidade medular e nas epífises dos ossos longos: úmero, fêmur, tibia, pélvis e crânio. É constituída por um tecido dinâmico, gelatinoso, que varia

entre indivíduos na quantidade, qualidade e estrutura. É composta por uma componente solúvel que contém citocinas, fatores de crescimento, hormonas e outros iões, sendo a componente celular constituída por adipócitos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos e células estaminais (Ahamad & Singh, 2021).

Comparativamente com outras fontes de recolha, a medula óssea constitui o maior reservatório de células estaminais não embrionárias contendo as MSCs (BMMSCs possuem o período mais curto de tempo de cultura) (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

Células estaminais mesenquimais adultas (MSCs) são células multipotentes indiferenciadas caracterizadas pela capacidade de autorrenovação e diferenciação em vários tipos celulares, não limitados à linhagem germinativa da mesoderme, incluindo adipócitos, condrócitos, miócitos e osteoblastos, quando expostas a sinais e fatores de crescimento específicos (Mohamed-Ahmed et al., 2018). Como ilustrado anteriormente, a ISCT (International Society for Cellular Teraphy) propõe que as MSCs têm de ter aderência ao plástico, expressar marcadores de superfície específicos (CD73, CD90, CD105 maior ou igual que 90%), não expressar outros (CD14, CD34, CD45, CD19, HLA-DR menor ou igual que 2%) e ainda diferenciarem-se em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Mohamed-Ahmed et al., 2018). Em 2020 foi realizada uma revisão sistemática, por Rodríguez-Fuentes, na qual concluíram que não existem consequências adversas severas na utilização destas células (Rodríguez-Fuentes et al., 2021)

A recolha de BMMCSs pode ser realizada em diferentes constituintes do esqueleto humano como por exemplo: externo, corpo vertebral, crista ilíaca e fémur (Purwaningrum et al., 2021), no entanto, a técnica considerada *gold standard* é a técnica de aspiração de medula óssea, exemplificada na figura 6, na região anatómica da crista ilíaca. Esta técnica cirúrgica pode ser acompanhada de dor, estar associada a morbilidade da região dadora, sendo que o número de MSCs obtido é relativamente pequeno (0,001 - 0,01%). A proliferação e diferenciação entre MSCs recolhidas podem diferir de indivíduo para indivíduo, além disso a idade é um fator determinante que pode afetar as propriedades destas células, nomeadamente o rendimento total de células e o potencial condrogénico e adipogénico, mantendo, no entanto, os potenciais osteogénicos e a clonogenicidade (Mohamed-Ahmed et al., 2018).

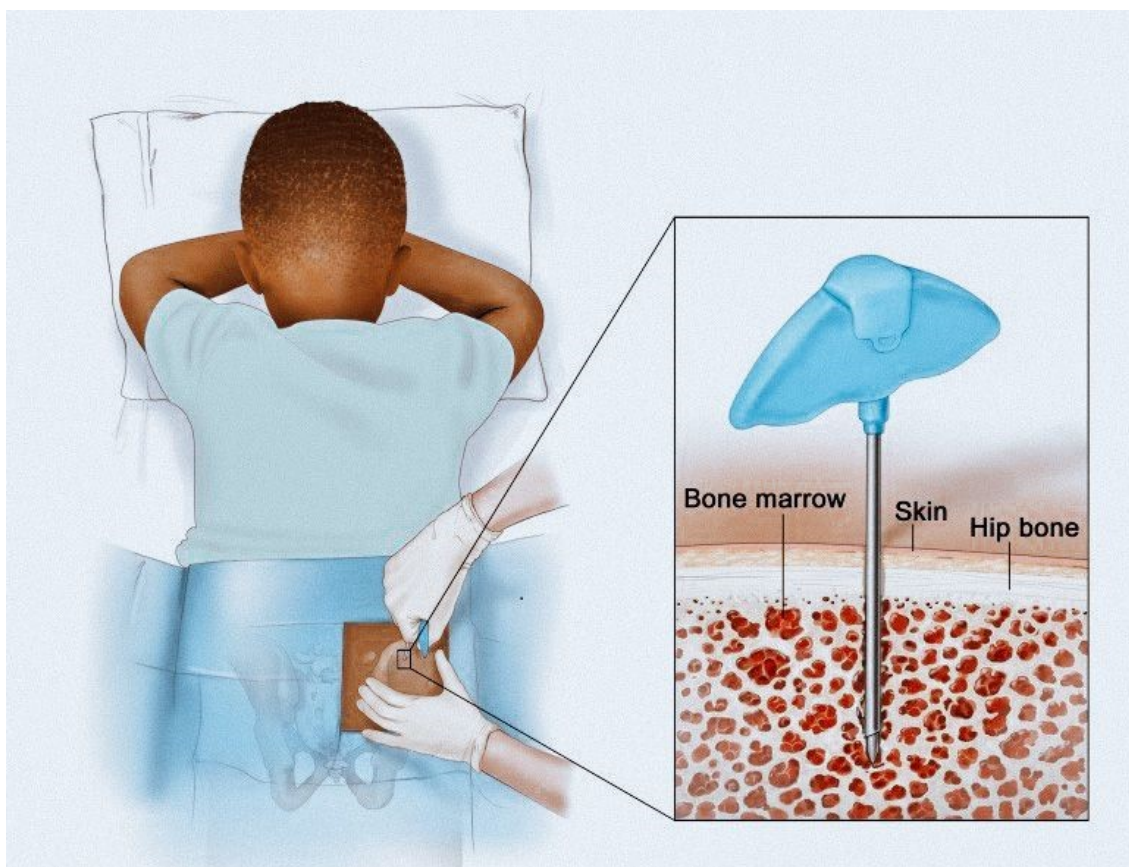


Figura 6. Técnica de aspiração e biópsia da medula óssea. Adaptado de (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

### 2.5.2 Cordão Umbilical – UCMSCs

Apesar das BMMSCs serem consideradas o *gold standard* da terapia com células estaminais mesenquimais (MSCs), outras fontes incluindo o tecido adiposo; sangue periférico do cordão umbilical e o seu tecido; polpa dentária; pele; tecido do próprio cordão umbilical; placenta e endométrio, estão cada vez mais a ser alvo de estudo (Shareghi-oskoue et al., 2021).

Este grupo celular foi caracterizado como células estaminais mesenquimais (MSCs) baseado no critério mínimo para tal, estabelecido pela ISCT, onde inclui a morfologia celular, os marcadores de perfil e o potencial de diferenciação (Dao et al., 2019). As UCMSCs presentes no tecido do cordão umbilical são multipotenciais e

apresentam a capacidade de autorrenovação, quando em ambiente propício podem diferenciar-se principalmente em osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Xie et al., 2020).

Ao contrário das células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMMSCs), o método de recolha das UCMSCs (Células estaminais mesenquimais do cordão umbilical) é mais rápido, realizado de forma simples em ausência de dor e apresentam uma separação, cultura e expansão *in vitro* igualmente fácil (Bartolucci et al., 2017; Xie et al., 2020). Estas células apresentam o triplo da atividade de regeneração tecidual, modulação de resposta imunitária e propriedades anticancerígenas. Apresentam ainda, menos implicações éticas comparativamente a outras fontes de recolha (Shareghi-oskoue et al., 2021), os antigénios de superfície não são proeminentes, a rejeição ao transplante é insignificante e não necessitam de compatibilidade, possibilitando a sua utilização em enxertos alógenos. (Xie et al., 2020).

### 2.5.3 Tecido Adiposo – ATMSCs

Apesar da medula óssea ter sido o primeiro órgão a ser estudado como fonte de recolha de MSCs, estas células foram isoladas com sucesso a partir do tecido adiposo e é considerado a fonte mais rica de MSCs, demonstrando multipotência *ex vivo* (Gomez-Salazar et al., 2020).

A maior vantagem em utilizar o tecido adiposo como fonte de recolha para as MSCs é a sua conveniência, devido ao facto de o tecido adiposo subcutâneo existir em abundância no corpo humano (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018). Apresentam um maior rácio de proliferação do que as BMMSCs, no entanto, este facto está dependente da região de que é extraída. As ATMSCs também diferem no potencial de diferenciação, em que na linhagem osteoblástica a extensão de diferenciação não apresenta os mesmos resultados em diferentes estudos (Brown et al., 2019).

Uma importante aplicação das ATMSCs consiste na regeneração do tecido ósseo na região da mandíbula, na qual é utilizado associado a fosfato  $\beta$ -tricálcio incorporado com BMP-2 (Bacakova et al., 2018).

A primeira descrição de tecido adiposo como fonte de recolha para células estaminais mesenquimais (MSCs) foi realizada em 2001. Comparando com as BMMSCs, as células recolhidas da medula óssea apresentam um número 2500 vezes inferior às

MSCs existentes no tecido adiposo, no entanto, estes valores podem diferir segundo fatores característicos do dador, tais como a idade, o género, o índice de massa corporal (IMC), a localização, o método de recolha e as condições de cultura (Mushahary et al., 2018b).

Células estaminais mesenquimais do tecido adiposo (ATMSCs) são isoladas em intervenção médica, por lipoaspiração ou lipectomia, isto é, são obtidas por aspiração ou excisão visceral ou subcutânea do tecido adiposo, em locais como o abdómen, o braço e nas áreas femorais e glúteas (Naji et al., 2019). O método de expansão não difere dos usados para as BMMSCs e a sua utilização tem vindo a crescer exponencialmente, não só pela sua disponibilidade natural, como também pelo método de recolha ser cirurgicamente menos invasivo quando comparado com a colheita de medula óssea (Naji et al., 2019).

#### **2.5.4 Tecidos Dentários – DMSCs**

Recentemente, os tecidos dentários ganharam bastante popularidade como uma fonte de células estaminais mesenquimais (MSCs) graças à sua facilidade de recolha, consideradas como sendo a fonte mais natural e menos invasiva, tem elevado potencial de proliferação, capacidade clonogénica, autorrenovação, multipotencialidade de diferenciação, potencial de regeneração tecidular e apresentam uma ótima recuperação tecidular (Dave & Tomar, 2018).

Acredita-se que as DMSCs têm uma origem ectomesenquimal, pois derivam da crista neural, no entanto, são necessárias mais investigações para uma melhor compreensão da sua origem (Dave & Tomar, 2018).

As MSCs residem num amplo espectro de tecidos pós-natais e têm sido isolados com sucesso a partir de tecidos orofaciais. Estas MSCs possuem a capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplas linhagens (Ansari et al., 2017).

Vários foram os estudos que compararam as propriedades das células estaminais mesenquimais (MSCs) derivadas de tecidos orais e dentários que confirmaram a sua multidiferenciação. Ainda, uma subpopulação de células estaminais derivadas da polpa dentária foi identificada por possuir diferenciação osteogénica, no entanto, comparando com as células da medula óssea, estas têm uma diferenciação preferencial odontogénica.

Vários estudos reportaram que as subpopulações de MSCs derivadas de tecidos dentários têm capacidade de diferenciação adipogénica e neurogénica, ao exibirem uma morfologia semelhante a células da linhagem adipogénica e neural com expressão de marcadores genéticos característicos (Ansari et al., 2017).

A primeira identificação de MSCs num tecido dentário foi realizada na polpa dentária e subsequentemente em dentes decíduos (Dave & Tomar, 2018) & Tomar, 2018). De seguida foram identificadas as MSCs recolhidas a partir do ligamento periodontal (PLMSCs), as quais exibem diferenças significativas na sua capacidade regenerativa se forem recolhidas a partir do tecido ósseo alveolar ou da superfície radicular (Dave & Tomar, 2018). Existem diferentes fontes de MSCs, para além das mencionadas anteriormente na cavidade oral, tais como a papila apical (SCAP), folículo dentário (DFSCs) e polpa dentária (DPMSCs) de dentes decíduos (SHED) e permanentes (DPSC), como se pode observar na ilustração da figura 7, (Hernández-Monjaraz et al., 2018). Além destas fontes, o dente em desenvolvimento também contém MSCs no gérmen dentário (TGSCs) (Dave & Tomar, 2018). A mucosa oral detém dois tipos diferentes de MSCs, nomeadamente as células estaminais mesenquimais do epitélio oral (OESCs) e as células estaminais mesenquimais da gengiva aderida (GMSCs) (Dave & Tomar, 2018).

As MSCs derivadas da polpa dentária (DPMSCs) são conservadas por criopreservação e são, de uma forma geral, muito semelhantes às ATMSCs possuindo propriedades imunomoduladoras. Ao serem derivadas da crista neural, têm origem ectomesenquimal e ambas linhagens mesenquimal e ectodermal, podendo diferenciar-se, não só em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, como também em células da linhagem neural. Ainda, quando cultivadas com matrizes tridimensionais de dentina, podem diferenciar-se em células epiteliais da córnea, melanócitos e células estaminais pluripotenciais induzidas (iPSCs) (Berebichez-Fridman & Montero-Olvera, 2018).

As células estaminais mesenquimais dentárias (DMSCs) estão indicadas como terapêutica na regeneração de tecido ósseo, neurogênese, angiogênese, regeneração oral, maxilofacial, craniofacial e em muitos outros tecidos, além de que podem ser utilizadas como matrizes de materiais de enxertia óssea contribuindo para a regeneração guiada de tecidos. No entanto, apresentam certas limitações, como a disponibilidade e qualidade de MSCs obtidas entre pacientes e, apesar do transplante autólogo ser um método aliado à terapêutica com MSCs, existe dificuldade em originar um número suficiente de células saudáveis derivadas de tecidos dentários apenas de um único dador (Dave & Tomar, 2018).

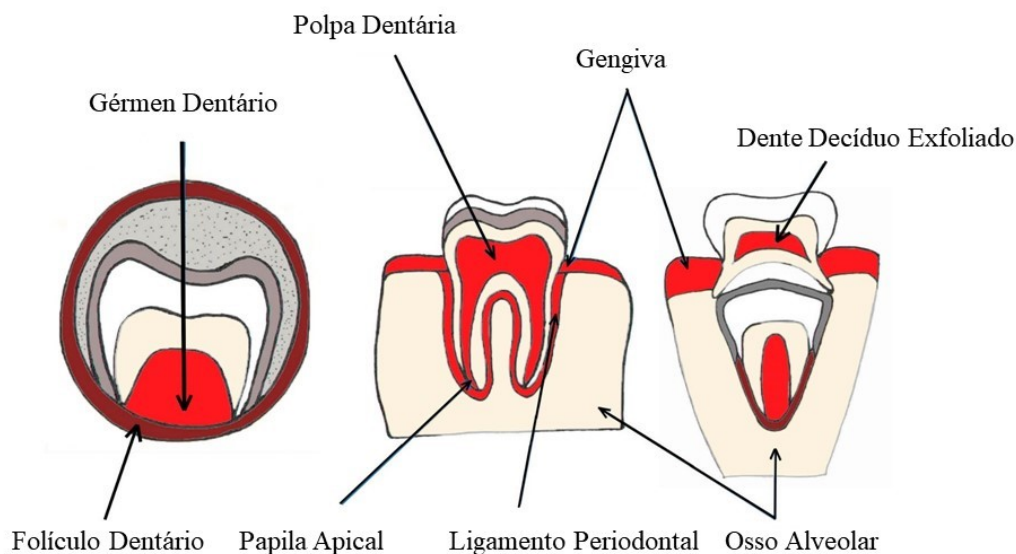


Figura 7. Ilustração das várias fontes de células estaminais mesenquimais derivadas de tecidos dentários (DMSCs).

## 2.6 Regeneração Óssea

O tecido ósseo é uma estrutura anatômica responsável pela sustentação, proteção de órgãos, armazenamento e homeostasia mineral e movimento do corpo humano (Lopes et al., 2018a).

Microscopicamente podemos identificar dois tipos de estruturas ósseas, no tecido ósseo, o osso medular ou esponjoso e osso cortical ou compacto. Todos os ossos são compostos por osso esponjoso e cortical, diferindo na percentagem para cada tipo ósseo. O tecido ósseo esponjoso é mais poroso (40% a 95% de porosidade) e menos denso do que o tecido ósseo cortical. A matriz extracelular mineralizada, caracteriza o tecido ósseo como um tecido conjuntivo especializado que, a nível molecular, consiste numa fase orgânica (constituída 90% por colagénio tipo 1) e uma fase inorgânica constituída por hidroxiapatita (HA) e água (10-20%) (Battafarano et al., 2021).

A regeneração óssea é um processo complexo, biológico e fisiológico, que tem por intenção produzir novo tecido ósseo. Na reabilitação de defeitos ósseos existem várias técnicas de reconstrução e regeneração óssea (que serão descritas) o que favorece os resultados obtidos nos tratamentos funcionais e estéticos de Medicina Dentária (Brozek et al., 2018).

A reconstrução e regeneração de tecido ósseo craniofacial continua a representar um desafio clínico e é indicada nos casos clínicos de doenças tumorais, traumatismos ou ainda malformações congénitas (Ansari et al., 2017). O tecido ósseo em condições ditas normais apresenta um grau de autorregeneração, no entanto, essa capacidade é limitada quando o defeito ósseo excede uma dimensão crítica (2 – 3cm, ou mais) ou devido a doença ortopédica tal como tumores ou infeções (Perić Kačarević et al., 2020; Qing et al., 2020).

A reconstrução ou redução de fraturas ósseas é um processo regenerativo que recapitula os eventos biológicos decorrentes do desenvolvimento esquelético embrionário (Ansari et al., 2017; Ho-Shui-Ling et al., 2018a).

Dentro do tecido ósseo podemos descrever vários tipos celulares, células precursoras osteogénicas, osteoblastos (responsáveis pela formação óssea), osteoclastos (reabsorção óssea), osteócitos (resultam do processo de diferenciação de osteoblastos) e células hematopoiéticas da medula óssea. As células da linha osteoblástica controlam as células da linha osteoclástica, através de um mecanismo de regulação comum, RANKL/RANK/OPG. (Lopes et al., 2018a).

O processo de formação óssea, denominado de osteogénese, acontece de 2 formas:

1. Ossificação endocondral;
2. Ossificação intramembranosa.

Estes dois processos iniciam-se com a concentração de MSCs e estão dependentes da sua diferenciação (Perić Kačarević et al., 2020).

Na ossificação endocondral, as MSCs diferenciam-se em condrócitos que depositam tecido cartilaginoso, o que é então mineralizado por ação de osteoblastos. A ossificação intramembranosa inclui diferenciação osteogénica direta das MSCs, não envolvendo a fase intermédia condrogénica (Perić Kačarević et al., 2020).

O tecido ósseo apresenta 2 formas de cicatrização, primária (direta) e secundária (indireta) (Battafarano et al., 2021). Na cicatrização primária dá-se a transição direta de MSCs para osteoblastos (ossificação intramembranosa) e na secundária, há uma

progressão em tecido cartilágneo intermédio, antes da formação óssea, envolvendo ambos tipos de ossificação (endoncondral e intramembranosa) (Bahney et al., 2019; Battafarano et al., 2021).

A teoria “Mechanostat”, descrita por Harol Frost em 1890, descreve a correlação entre o crescimento de tecido ósseo e a sua reabsorção, com deformação elástica, que ocorre ao longo dos anos. Um exemplo deste mecanismo é a ação de compressão nos dentes, durante o tratamento ortodôntico, que aumenta os níveis de concentração do fator de ligação do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), promovendo a formação osteoclástica. A tensão aplicada ao ligamento periodontal promove o aumento da concentração osteoblástica de osteoprotegerina (OPG), ao mesmo tempo induzindo a diminuição de RANKL. A concentração relativa de OPG e RANKL em ambas compressões e tensões, regulam a modelação e remodelação óssea local (Lopes et al., 2018a).

A remodelação do tecido ósseo caracteriza-se pela substituição ou regeneração de tecido ósseo, permitindo preservar a sua integridade e função. Inclui quatro células ósseas: células de revestimento ósseo (BLCs), osteócitos, osteoclastos e osteoblastos. Na superfície do tecido ósseo, as células mais abundantes são os osteócitos, que apresentam um papel fundamental no processo de remodelação. Osteoclastos são células promotoras da reabsorção óssea que foram diferenciadas através de dois fatores de crescimento diferentes: fator estimulante de colónias monócito/macrófago (M-CSF) e o fator de ligação do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Os osteoblastos produzem tecido ósseo propriamente dito e são derivados das MSCs, depositam fibras de colagénio e hidroxiapatita (HA) e são também responsáveis pela ativação de osteoclastos, ao expressarem os fatores RANKL e M-CSF, que segregam fatores de crescimento como BMPs, entre outros, que influenciam a formação de novo osso (Lopes et al., 2018a; Perić Kačarević et al., 2020). A remodelação óssea é composta por 5 etapas: ativação, em que os osteoclastos são recrutados e ativados; reabsorção, durante a qual estas células reabsorvem o antigo osso; *reversal*, em que há uma troca de fases, onde se inicia a formação de novo osso preparando os osteoblastos para iniciarem a formação óssea; formação e terminação, quando os osteoblastos depositam novo osso e complete a mineralização, até que o osso reabsorvido seja completamente substituído (Kenkre & Bassett, 2018).

A reabsorção óssea dá-se quando existe um desequilíbrio na formação/reabsorção de tecido ósseo. Os osteoblastos produzem RANKL, M-CSF e OPG, enquanto os

osteoclastos produzem c-Fms (recetor para M-CSF) e o recetor ativador nuclear kappa B (RANK), um recetor para RANKL. RANKL e M-CSF estimulam a diferenciação osteoblástica, descrita nos próximos capítulos, enquanto OPG é um inibidor de RANKL e compete para o recetor RANK. Baixos níveis de OPG resultam num desenvolvimento acelerado do desenvolvimento de osteoclastos, que levam á disrupção do equilíbrio entre a formação/remodelação óssea e a reabsorção (Lopes et al., 2018a).

O aumento de volume ósseo, ou na língua nativa, “Bone Augmentation”, é uma técnica cirúrgica que promove o ganho de volume tridimensional tecido ósseo perdido, na qual se utiliza materiais de substituição de tecido ósseo, ou tecido ósseo humano e que tem como objetivo a redução do defeito. Para tal, são necessárias condições apropriadas para o crescimento de elementos osteogénicos (osteocondução), estimulação de células indiferenciadas para formarem osteoblastos (osteoindução) e a presença de osteoblastos capazes de sintetizar tecido ósseo (Brozek et al., 2018; Kangari et al., 2020).

Osteocondução é definida como a estrutura tridimensional para os elementos osteoblásticos e vasos sanguíneos aderirem, proliferarem e formarem uma matriz extracelular na sua superfície. A osteocondutividade de um enxerto permite a eliminação da formação de tecido fibroso e cria uma interligação entre o enxerto e o tecido ósseo recetor (Brozek et al., 2018; Weber, 2019; Zhang et al., 2019). Os enxertos autólogos e alógenos, bem como diversos biomateriais, apresentam estas propriedades osteocondutivas (Brozek et al., 2018).

A osteointegração é definida como o estabelecimento de um contacto direto de ancoragem entre o implante e o tecido ósseo vivo, mantido durante a carga funcional (Weber, 2019). Branemark foi quem introduziu este fenómeno biológico, em 1965, ao descrever o sucesso da osteointegração entre um implante de titânio em tecido ósseo vivo e organizado. De facto, ao estudar o comportamento da microcirculação, cicatrização e remodelação óssea de coelhos, observou que este metal, o titânio, e o tecido ósseo integravam-se perfeitamente, não havendo rejeição (Albrektsson, 2019; Alghamdi, 2018; López-Píriz et al., 2019). Branemark introduziu este termo “osteointegração” para descrever esta capacidade de uma fixação estável do titânio ao tecido ósseo, no entanto, atualmente este conceito é aplicado a todos os biomateriais que têm esta capacidade de osteointegração, destinados a serem implantados ou incorporados com outros materiais, com o objetivo de substituir, reparar ou regenerar o tecido ósseo (Guglielmotti et al., 2019).

A osteoindução define-se pela capacidade de induzir a diferenciação de MSCs, previamente indiferenciadas, na linhagem osteogénica, produzindo tecido ósseo, em locais heterotópicos (Weber, 2019). A investigação na osteoindução começou pelos estudos pioneiros de Urist, em 1965, onde descreveu a formação de tecido ósseo após implantação de matriz óssea desmineralizada em tecidos moles de coelhos, ratos, e porcos da Índia, que originaram a descoberta e clonagem de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (Weber, 2019).

Para a regeneração de tecido ósseo são requeridos três elementos fundamentais: células, fatores de crescimento/sinais morfogénicos indutores e uma matriz de suporte (*scaffold*). Na atualidade existem duas opções de matrizes disponíveis para a terapia de defeitos ósseos, são eles os enxertos de tecido ósseo naturais ou de tecido ósseo sintético, que serão descritos posteriormente (Battafarano et al., 2021).

Moléculas sinalizadores do processo de cicatrização óssea têm capacidade osteoindutiva, indispensável na estimulação de produção de tecido ósseo. São exemplos destas moléculas as BMPs, adesinas, hormonas, vitaminas e quantidades significativas de fatores de crescimento (Brozek et al., 2018).

Como principais fatores de crescimento temos as BMPs, que induzem a osteogénese através da diferenciação de MSCs em osteoblastos, proteínas angiogénicas (VEGF), que regulam a proliferação de células endoteliais e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), que induzem a proliferação de células osteoblásticas e endoteliais (Perić Kačarević et al., 2020).

Alguns biomateriais não são osteoindutores e são, portanto, incorporados em materiais biocerâmicos, matrizes ósseas demineralizadas e BMPs (Perić Kačarević et al., 2020).

Para a regeneração de tecido ósseo o cirurgião tem à sua disposição diversos biomateriais, representados esquematicamente na figura 8, que serão descritos nos próximos capítulos (Battafarano et al., 2021).

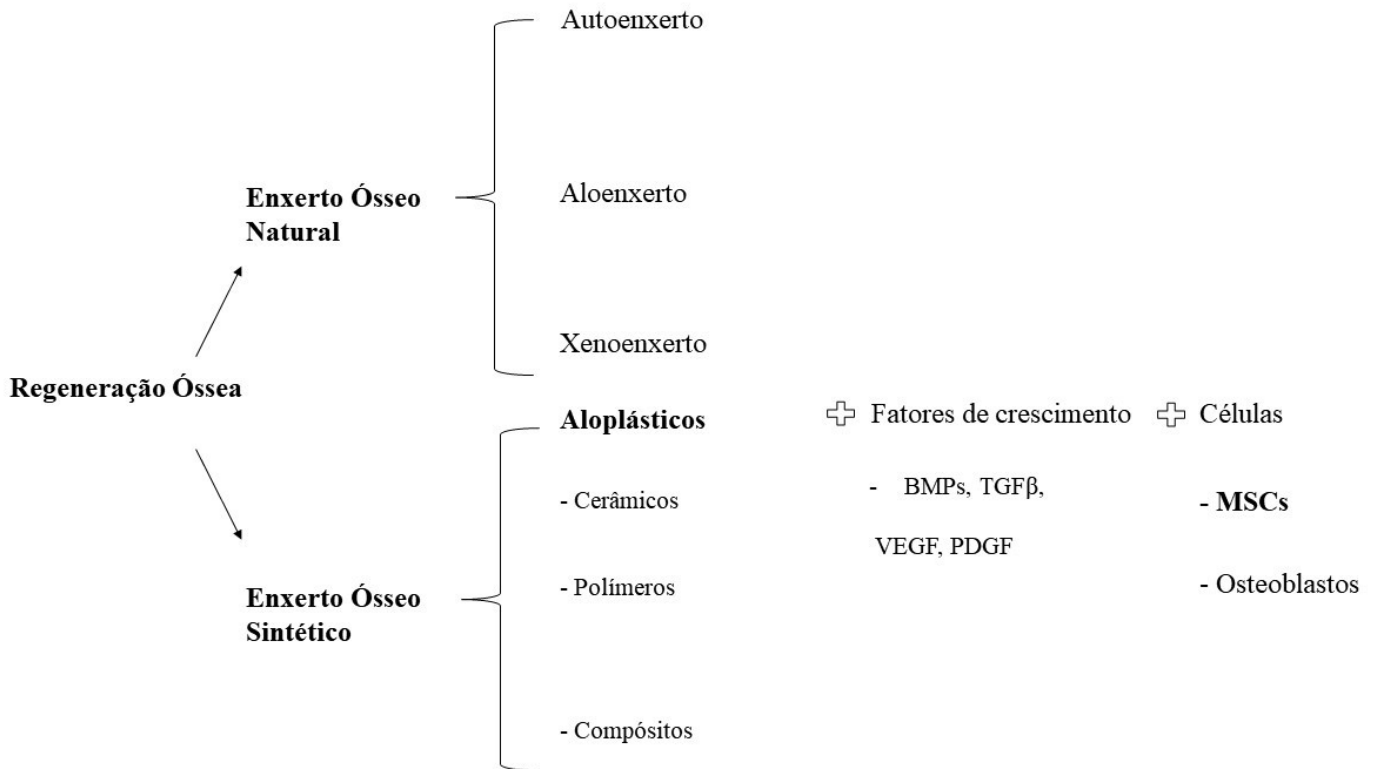


Figura 8. Esquema representativo da classificação dos biomateriais para a regeneração de tecido ósseo.

### 2.6.1 Diferenciação Osteoblástica

Osteoblastos são as células que compõem o esqueleto humano, estritamente reguladas em todas as fases de diferenciação, são extremamente versáteis e muito importantes, garantindo o desenvolvimento esquelético e a homeostase do organismo (Ponzetti & Rucci, 2021). O tecido ósseo, apesar de se considerar imutável, é na verdade bastante dinâmico e ativo, o esqueleto humano desenvolve-se de modo a acomodar todos os órgãos, processo este que é designado de modelação óssea. Para tal, o tecido ósseo necessita de ser constantemente depositado e reabsorvido nas superfícies apropriadas, de forma regulada, incluindo dois tipos celulares principais: osteoblastos e osteoclastos (Ponzetti & Rucci, 2021).

Uma vez atingido o pico de volume ósseo, a atividade osteoblástica é contrabalançada pela atividade osteoclástica, resultando num equilíbrio dinâmico

denominado de remodelação óssea (Ponzetti & Rucci, 2021). No entanto, com o decorrer da idade, a atividade dos osteoblastos começa a ser menor quando comparada com a atividade dos osteoclastos, resultando em reabsorção óssea, originando osteopenia ou osteoporose (Ponzetti & Rucci, 2021).

Os osteoblastos são derivados das células estaminais mesenquimais (MSCs) que estão alojadas na medula óssea. A sua diferenciação na linhagem osteoblástica é controlada por diferentes fatores moleculares, principalmente pelas proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e por uma via sinalizadora, a via WNT, que controla a proliferação, ativação e funcionalidade destas células (Ponzetti & Rucci, 2021).

O processo inicia-se com a diferenciação de uma célula osteocondroprogenitora comum através da ativação de fatores de transcrição osteogénicos, como o fator RUNX2, OSX e DLX5. Essa célula tornar-se-á então um pré-osteoblasto, seguindo a transcrição de genes osteogénicos como a fosfatase alcalina (ALP), e a cadeia de colagénio 1 $\alpha$ 1 (COL1A1) que vai manter a sua expressão ao longo do tempo de vida do osteoblasto maduro, juntamente com outros marcadores osteoblásticos comuns como osteopontina (OPN), sialoproteína óssea II (BSP II) e osteocalcina (OCN) (Ponzetti & Rucci, 2021).

Após a deposição óssea dos osteoblastos, estes podem ter 3 destinos: apoptose, tornarem-se células de revestimento de tecido ósseo, ou originar osteócitos (Ponzetti & Rucci, 2021). Os osteócitos são osteoblastos maduros e diferenciados, constituindo 90-95% das células ósseas no osso adulto, participando em inúmeros mecanismos, nomeadamente na remodelação óssea ao ativarem osteoblastos e osteoclastos (Lopes et al., 2018a).

## **2.6.2 Tipos de Defeitos Ósseos**

A extensão do defeito ósseo irá determinar a escolha do tratamento, por parte do cirurgião. Para defeitos ósseos pequenos, entre 4 - 6 cm, os enxertos ósseos são a escolha primária, sendo os enxertos autólogos, ou autoenxertos, uma opção bastante atrativa por serem recolhidos do próprio paciente, de variados locais como referido anteriormente, reduzindo o potencial de reação imunitária após implantação. No entanto, para defeitos considerados de tamanho amplo, maiores que 6 cm, a transferência de tecido livre é necessária (Luby et al., 2019).

Várias definições foram propostas para classificar a qualidade óssea, contudo, o sistema de classificação mais aceite foi proposto por Lekholm e Zarb, em 1985, determinando a classificação de tecido ósseo relativamente à qualidade. Foi classificado em quatro tipos, baseando-se na observação da quantidade de osso cortical e esponjoso em áreas do processo alveolar, ilustrados na figura 9 (Eskandarloo et al., 2019):

Tipo 1: tecido ósseo cortical homogéneo;

Tipo 2: composto por uma camada espessa de tecido ósseo cortical circundante a um núcleo de tecido ósseo trabecular denso;

Tipo 3: uma fina camada cortical ao redor de um tecido ósseo trabecular denso, com resistência favorável;

Tipo 4: representa uma fina camada de tecido ósseo cortical envolvente de um núcleo de tecido ósseo trabecular de baixa densidade (Eskandarloo et al., 2019).

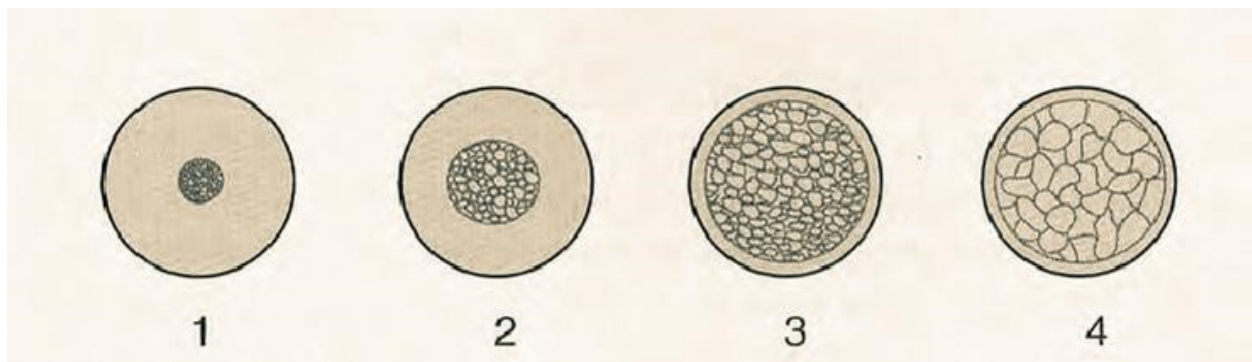


Figura 9. Classificação óssea proposta por Lekholm e Zarb em 1985.

Em 1988, Misch classificou em quatro grupos o tecido ósseo, independentemente da região, de acordo com a densidade e localização nas áreas edêntulas maxilares e mandibulares, baseando-se nas características microscópicas do tecido ósseo cortical e trabecular. Esta classificação do tecido ósseo na sua densidade permitiu delinear diferentes protocolos para diferentes tipos de anatomia óssea. Desde então, para cada classe de tecido ósseo, segundo a classificação de Misch, têm sido propostos diferentes planos de tratamento, protocolos cirúrgicos, tempo de cicatrização, etc (Makary et al., 2019; Rokn et al., 2018).

O tecido ósseo cortical, denso ou poroso, é normalmente encontrado na superfície externa e inclui a crista alveolar de um rebordo edêntulo. O tecido ósseo trabecular, fino e espesso, é normalmente encontrado dentro da cápsula externa do tecido ósseo cortical e, ocasionalmente, pode ser encontrado na superfície da crista alveolar de um rebordo residual edêntulo (Makary et al., 2019; Rokn et al., 2018).

Deste modo, estas quatro estruturas macroscópicas de tecido ósseo podem ser classificadas em tecido ósseo cortical denso, tecido ósseo cortical poroso, tecido ósseo trabecular espesso e tecido ósseo trabecular fino. As categorias de tecido ósseo descritas por Mich, podem ser organizadas da mais densa para a menos densa, tal como foi descrito pela primeira vez por Frost e, estão esquematizadas na tabela 3 e ilustradas na figura 10 (Makary et al., 2019; Rokn et al., 2018).

DENSIDADE ÓSSEA	CARACTERÍSTICAS
D1	Cortical denso
D2	Cortical espesso, denso a poroso na periferia e trabecular fino no interior
D3	Cortical poroso e fino na periferia, envolvendo um tecido ósseo trabecular fino
D4	Trabecular fino
D5	Imaturo, não mineralizado

Tabela 3. Classificação de Misch (1988): Densidade óssea.

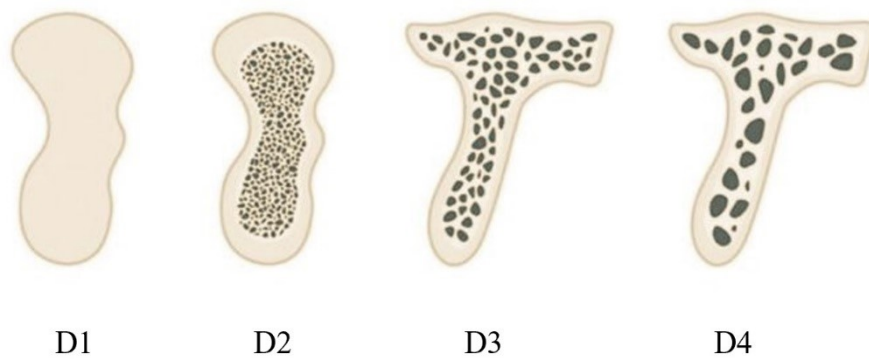


Figura 10. Densidade óssea definida por Misch (1988).

A densidade óssea D1 é principalmente descrita como tecido ósseo cortical denso e encontra-se na região anterior da mandíbula. A D2, por sua vez, contém tecido ósseo cortical denso a espesso na crista e envolve tecido ósseo trabecular espesso, normalmente localizado na região posterior da mandíbula. Já D3 é um tipo de tecido ósseo que apresenta tecido ósseo cortical mais fino poroso no rebordo e tecido ósseo trabecular fino no interior, que pode ser localizado na região anterior maxilar e D4 não apresenta quase nenhuma quantidade de tecido ósseo cortical, de modo que quase 100% do volume ósseo de D4 é composto por tecido ósseo trabecular fino, podendo ser encontrado na área posterior da maxila. Por fim, D5 corresponde a uma densidade óssea composta por mineralização óssea incompleta e largos espaços intratrabeculares (Makary et al., 2019; Rokn et al., 2018).

Os diferentes tipos de densidade óssea podem ser determinados pela localização genérica, por sensação tátil, durante a cirurgia ou por avaliação radiográfica computadorizada. As localizações estão representadas, de forma esquemática, na figura 11 (Makary et al., 2019; Rokn et al., 2018).

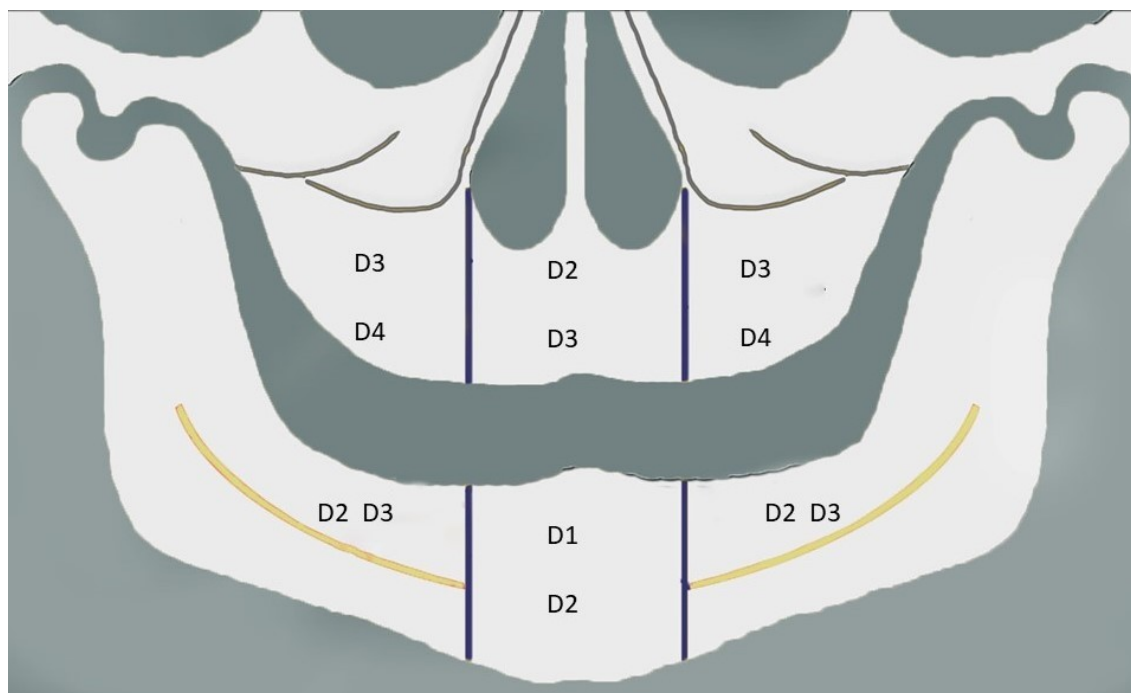


Figura 11. Os diferentes tipos de densidade óssea, esquematizados nas regiões frequentemente encontrados.

A exodontia é um fator desencadeante de uma cascata de eventos biológicos, mediados por inflamação local e privação de estímulo mastigatório, que altera a homeostase e a integridade estrutural dos tecidos periodontais, como consequência, dá-se um processo de atrofia, caracterizado por reabsorção do osso alveolar residual em apenas poucas semanas após a intervenção. Mesmo a técnica cirúrgica mais conservadora pode causar reabsorção óssea e conduzir à necessidade de técnicas de regeneração óssea. A extensão e magnitude do processo de remodelação óssea pode variar, consoante fatores individuais locais ou sistêmicos, mas tipicamente resultam na redução vertical e horizontal do rebordo alveolar (Avila-Ortiz et al., 2019).

A extração dentária conduz a uma reabsorção óssea alveolar, que rapidamente se inicia nas semanas seguintes e perdura por vários anos. Diferentes estudos mostraram que a redução de tecido ósseo alveolar, após extração dentária, foi de 11% – 22% de altura nos primeiros doze meses e, 29% - 63% em largura, contemporaneamente existe uma redução de dois terços do rebordo alveolar nos primeiros três meses (Stumbras et al., 2019).

A reabsorção óssea de um rebordo alveolar pode ser elevada, como nos casos de dentes afetados por patologias periodontais ou endodônticas, traumatismos locais ou técnica cirúrgica que, possa vir a provocar uma fratura da parede vestibular do rebordo alveolar, interferindo na cicatrização e regeneração óssea (Stumbras et al., 2019).

É importante executar o ato cirúrgico com objetivo de preservar a maior quantidade de tecido ósseo alveolar, reduzindo o rácio de reabsorção do rebordo edêntulo e da remodelação óssea pós-operatória (Stumbras et al., 2019).

De modo a classificar patologicamente e fisiologicamente os rebordos residuais, Cawwod e Howell, em 1988, descreveram uma classificação em 6 tipos de reabsorção alveolar, ilustrados na figura 12 e 13, a partir de uma amostra de 300 crânios desidratados na *Royal College of Surgeons of Edinburgh*: Classe I – presença de dentes; Classe II – rebordo alveolar imediatamente após exodontia; Classe III – rebordo alveolar com forma convexa, com altura e largura adequadas; Classe IV – forma em “lâmina de faca”, ao contrário da classe anterior, apresenta altura e largura inadequada; Classe V – rebordo alveolar plano, com altura e largura inadequada, com perda do processo alveolar e Classe VI – forma de depressão do rebordo alveolar, com evidente perda do tecido ósseo basal, podendo ser extensa sem padrão previsível (Alshenaiber et al., 2021; Dekker et al., 2018).

Mais recentemente foi proposta a classificação de Colónia, para defeitos ósseos alveolares, de forma a abordar a morfologia e a necessidade de regeneração dos defeitos ósseos. A classificação de Colónia para defeitos da crista alveolar de rebordos residuais (CCARD, do inglês *Cologne classification of the alveolar ridge defect*), ilustrada na figura 14, descreve os defeitos como horizontais, verticais e combinados, de diferentes dimensões (menor que 4 mm; até 8 mm; mais de 8 mm) e ainda sugere recomendações para a técnica de aumento de volume ósseo, dependendo do tipo e da extensão do defeito (Nickenig et al., 2022).

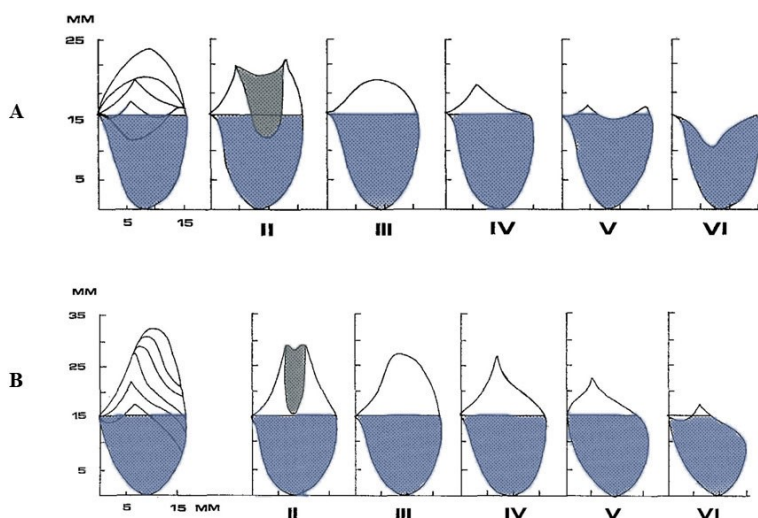


Figura 12. Classificação da reabsorção alveolar segundo Cawood e Howell (1988), na Mandíbula posterior (A) e na Mandíbula anterior (B).

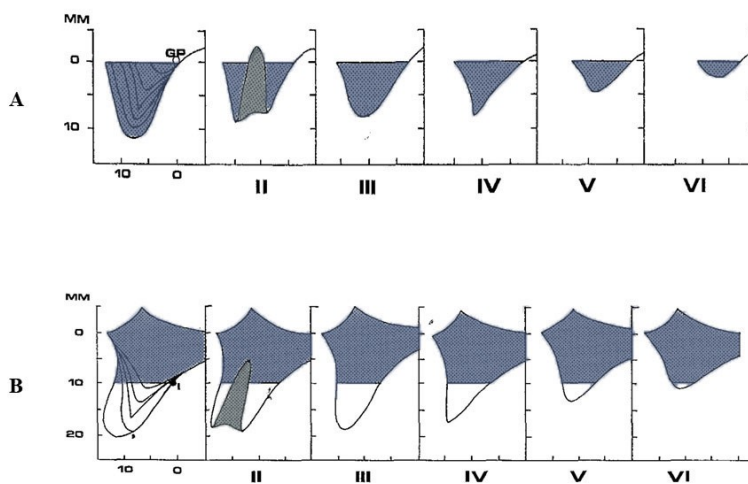


Figura 13. Classificação da reabsorção, segundo Cawood e Howell (1988), na Maxila posterior (A) e na Maxila anterior (B).

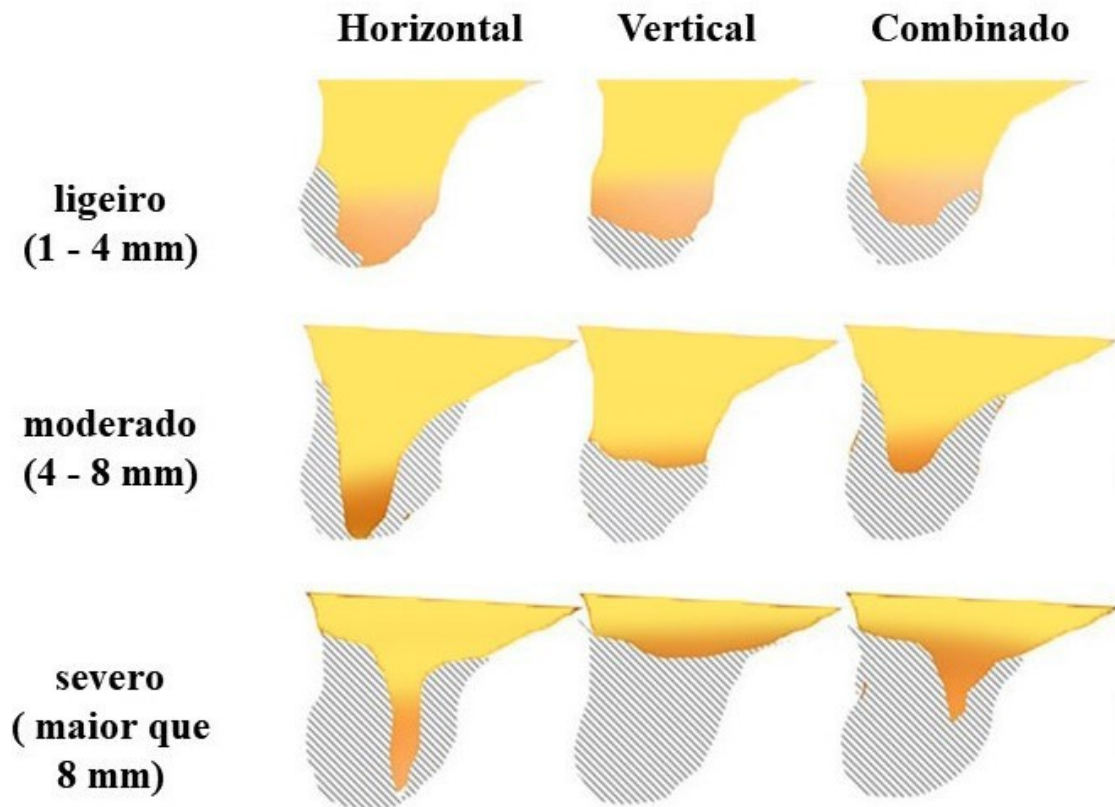


Figura 14. Classificação de Colônia para defeitos da crista alveolar.

### 2.6.3 Enxertos Ósseos

Atualmente o tratamento *gold standard* para a regeneração óssea baseia-se na utilização de enxertos ósseos, autólogos ou alógenos (Ho-Shui-Ling et al., 2018b).

Para a regeneração óssea, os materiais podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com a sua origem:

**autoenxertos**, sendo originários do mesmo indivíduo, apresentam-se como o único tipo de enxerto com as propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteogénicas. Este tipo de enxerto pode ser recolhido na cavidade oral, no tubérculo maxilar, ramo da mandíbula, sínfise mentoniana, espinha nasal anterior, tuberosidade maxilar, região retromolar, pilar canino, parede lateral da fossa nasal podendo ainda ser recolhidos de regiões extraorais, em maior quantidade, como por exemplo a crista ilíaca

(descrita como *gold standard* devido à quantidade elevada de tecido ósseo disponível) e a calota craniana.

**aloenxertos**, provém de outro indivíduo da mesma espécie e quando comparado com o autoenxerto, pode ser obtido em maiores quantidades. O risco de transmissão de doenças e infeções é insignificante, no entanto, a remodelação óssea dá-se de forma mais lenta.

**xenoenxertos**, provenientes de origem animal, como por exemplo bovino, equino e porcino. A disponibilidade é teoricamente aceite como ilimitada e tanto os xenoenxertos como os aloenxertos sofrem um processo de *acelularização* para diminuir a antigenicidade;

**aloplásticos**, que são materiais sintéticos, oferecendo a enorme vantagem de serem ilimitados e não apresentarem nenhum risco de transmissão de fatores patogénicos para o recetor. Estes biomateriais podem ser cerâmicos, polímeros e compósitos (Battafarano et al., 2021; Brozek et al., 2018).

#### 2.6.4 Técnicas de Reconstrução Óssea

O processo de regeneração óssea é um fenómeno complexo, que envolve células progenitoras, inflamatórias, endoteliais e hematopoiéticas. Este processo é composto pela fase inflamatória, o recrutamento de células progenitoras, a regeneração e remodelação do tecido ósseo até à reparação. (Ho-Shui-Ling et al., 2018a).

O processo regenerativo requer elementos principais como: matriz extracelular, células progenitoras e sinalização morfogénica indutora (Brozek et al., 2018).

Os requisitos de matriz ideal para a regeneração de tecido ósseo são: não toxicidade local e sistémica, servirem de suporte à atividade celular, permitirem a adesão celular, proliferação, depósito de matriz extracelular, indução da formação de tecido ósseo e, ainda, promover a vascularização (H. Lin et al., 2019).

Além dos enxertos ósseos, existem outras técnicas de aumento de volume ósseo que combinam a utilização de células com características apropriadas e sinais osteogénicos, células estaminais e materiais com capacidade adaptativa e indutora de crescimento e que, estão documentadas e disponíveis ao clínico (Bakhshandeh et al., 2017; Brozek et al., 2018).

A regeneração de tecido ósseo pode ser conduzida utilizando quatro grandes pilares, passíveis de serem realizados de forma separada ou combinada: biomateriais, biomoléculas, células estaminais e aplicação de estímulo externo (Brozek et al., 2018; Lopes et al., 2018a).

As técnicas disponíveis e mais descritas na literatura atualmente para a regeneração óssea são: a regeneração óssea guiada (ROG); a distração óssea (DO); a utilização de blocos ósseos (onlay grafting, inlay ou interposicionais; a utilização de MSCs ou terapia celular, promovendo a formação de tecido ósseo *in vivo*; elevação do pavimento do seio maxilar (*sinus lift*); a expansão da crista alveolar (*ridge splitting*); a preservação de alvéolo dentário (*socket preservation*) e a técnica interposicional mandibular (*mandibular interpositional grafting*). A decisão da terapêutica escolhida está dependente da determinação e do conhecimento aprofundado do cirurgião, nas técnicas e nos materiais disponíveis (Atef et al., 2019a; Brozek et al., 2018; Roseti et al., 2017; Starch-Jensen & Becktor, 2019a; Tan et al., 2019; Testori et al., 2019a; Urban et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Para se conseguir uma eficiente e correta regeneração de tecido ósseo são necessários três elementos: matriz extracelular; moléculas sinalizadoras do processo de reparação como BMPs, adesinas, hormonas, vitaminas e fatores de crescimento; células que sejam afetadas pelos fatores de crescimento. Estas células são células indiferenciadas, tais como células estaminais, células parcialmente diferenciadas, como pré-osteoblastos e fibroblastos, e ainda fibrócitos e osteócitos. As células podem ser separadas e multiplicadas numa cultura *in vitro*, antes de serem implantadas no defeito ósseo (Brozek et al., 2018).

Os fatores de crescimento mais descritos na literatura para a regeneração óssea e utilizados em Implantologia são: as proteínas morfogenéticas BMP-2, BMP-7 e os fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) (Ho-Shui-Ling et al., 2018b).

Após um material ser implantado, dá-se uma interação entre a corrente sanguínea e o biomaterial, levando a uma resposta inflamatória, como referido anteriormente. Imediatamente, ocorrem mudanças no fluxo sanguíneo resultando na proliferação de células e proteínas dos tecidos circundantes, induzindo a formação de um trombo. Este trombo é composto por plaquetas, fibras de fibrina e células sanguíneas, cuja combinação permite, ao trombo, formar uma base sanguínea provisória provida de uma matriz que é rica em fatores de crescimento, os quais recrutam e regulam células da medula óssea. Estas células gerem o processo de reparação de tecido ósseo (Perić Kačarević et al., 2020).

#### 2.6.4.1 Regeneração Óssea Guiada (ROG)

A regeneração óssea guiada presume que atinge o sucesso quando a re-população do defeito ósseo está exclusiva às células osteoprogenitoras, prevenindo a entrada no local de tecidos não osteogénicos (Elgali et al., 2017). Esta técnica pressupõe a utilização de membranas, ou barreiras, contendo características ideais: serem biocompatíveis; apresentarem capacidade de exclusão celular, evitando a invasão de tecidos epiteliais e conjuntivos; estabilidade mecânica e física; manutenção de um espaço destinado à migração das células do tecido ósseo circundante; e integração (Elgali et al., 2017).

As membranas utilizadas podem ser classificadas em dois grandes grupos: reabsorvíveis e não-reabsorvíveis (Elgali et al., 2017). As membranas reabsorvíveis podem ser, por exemplo, membranas de colagénio (reticuladas ou não) e ácido poliglicólico. No grupo das membranas não-reabsorvíveis estão incluídas as membranas d-PTFE, e-PTFE, malhas e folhas de titânio (Atef et al., 2020; Hameed et al., 2019).

A ROG tem por lógica criar um espaço isolado, com a membrana a estabilizar o coágulo e o enxerto, evitando a migração para o local de células epiteliais e de tecido conjuntivo. Atingido o pressuposto, as células osteogénicas proliferam, formando novo osso e minimizando a reabsorção óssea (Hameed et al., 2019).

Na literatura tem sido proposto diferentes misturas de enxerto ósseo particulado para esta técnica, no entanto, a utilização de membranas reabsorvíveis de colagénio está limitada a pequenos e moderados defeitos ósseos, devido à menor capacidade das mesmas em estabilização e criação de espaço (Atef et al., 2020; Hameed et al., 2019). Quando a intenção é gerar um aumento de osso em defeitos horizontais severos, ou que apresentem uma componente vertical combinada, a membrana recomendada terá de ter uma capacidade de estabilização superior, como é o caso das membranas à base de titânio, que representam o *gold standard* para esta técnica de regeneração óssea (Li et al., 2021; Urban & Monje, 2019).

No seu surgimento, eram utilizados como matrizes de enxertos ósseos autólogos, que com o avanço da medicina outros materiais de enxerto, como xenoenxertos, são correntemente utilizados. Desta forma, para o ganho de volume horizontal, vertical ou uma combinação de ambos, em defeitos ósseos de pequenas e médias dimensões, a sua necessidade determina o local, a origem e o tipo de enxerto a escolher por parte do clínico (Urban & Monje, 2019).

Com o avanço da investigação da engenharia tecidual, esta técnica cirúrgica combinada com a terapia celular de células estaminais mesenquimais, demonstrou resultados excelentes e promissores (Çolpak et al., 2019).

Neste contexto, a engenharia tecidual tem como princípio o uso combinado de células progenitoras (MSCs), matriz extracelular (*scaffold*) e/ou elementos moleculares (fatores de crescimento) envolvidos num processo fisiológico regenerativo para aplicação terapêutica. Especificamente na regeneração óssea, normalmente está envolvida a recolha de MSCs de uma fonte autóloga, ou de um banco de células, seguida da sua manipulação ou amplificação *ex vivo* e combinação com um biomaterial associado a uma matriz adequada para a implantação *in vivo* (Miguita et al., 2017; Shanbhag et al., 2019).

Çolpak et al, em 2019, realizaram um estudo comparativo histológico na realização da técnica de regeneração óssea guiada para aumento de volume ósseo vertical, utilizando um método tradicional bem estudado e previsível, que é a utilização de um xenoenxerto particulado de bovino em conjunto com uma membrana de colagénio e a utilização de células estaminais mesenquimais da polpa dentária (DPMSCs) com uma matriz associada a um enxerto ósseo particulado desproteínizado de bovino. Como resultados obtiveram que a utilização de MSCs demonstrou uma mineralização e maturação precoce de novo tecido ósseo formado (Çolpak et al., 2019).

Muitas outras técnicas cirúrgicas foram desenvolvidas para reconstruir ou prevenir defeitos ósseos alveolares, baseadas nos princípios da regeneração óssea guiada e podendo ser utilizadas em combinação, são elas: o levantamento do pavimento do seio maxilar (*sinus lift*); a expansão da crista alveolar (*ridge splitting*); e a preservação de alvéolo dentário (*socket preservation*) (Adamička et al., 2021).

#### **2.6.4.2 Elevação do Pavimento do Seio Maxilar – *Sinus Lift***

A técnica de elevação do pavimento do seio maxilar (*sinus lift*) é utilizada amplamente no tratamento de reabsorção óssea maxilar, que continua a representar um desafio clínico para a medicina regenerativa e medicina dentária devido à presença do seio maxilar (Rapone et al., 2022).

O seio maxilar constitui um espaço pneumático com forma piramidal onde se encontram, frequentemente, septos intra sinusais como forma de reforço. A delimitação

do seio maxilar é constituída por uma membrana, a membrana de *Schneider*, que está aderida ao osso subjacente. É uma membrana fina, caracterizada por ser revestida por epitélio pseudoestratificado ciliado (Testori et al., 2019b).

A técnica de elevação do pavimento do seio maxilar é usualmente designada por *sinus lift*, foi primeiramente descrita por Tatum, em 1976, e publicada por Boyne e James em 1980. É uma técnica simples, amplamente utilizada e previsível, que tem como finalidade a reabilitação de áreas edêntulas do maxilar posterior (Parnia et al., 2018; Testori et al., 2019b).

O objetivo principal da aplicação cirúrgica de um enxerto ósseo alveolar é promover o processo regenerativo natural do tecido ósseo, com a combinação de células, materiais de enxerto ósseo e fatores de crescimento (Rapone et al., 2022).

Várias formas de acesso têm sido estudadas para aplicar esta técnica, no entanto, a abordagem crestal e a técnica da janela lateral são as mais comuns (Parra et al., 2018).

A técnica da janela lateral consiste em realizar-se uma janela óssea, com recurso a instrumentos de corte rotativo ou piezoelétricos, na parede vestibular do seio maxilar. Em seguida, reposiciona-se a membrana de *Schneider* para uma posição mais elevada que facilite a colocação dos materiais de enxerto (Juzikis et al., 2018).

A abordagem crestal foi pela primeira vez proposta por Summers, em 1994 e é outra opção de tratamento na técnica *sinus lift* que pressupõe a realização de um acesso e a utilização de osteótomos, que permite a elevação da membrana de *Schneider*, não só pela compactação gerada pela pressão dos osteótomos, mas também da inserção de enxerto pelo acesso (Elia & Barakat, 2018).

Outras modificações a estas abordagens foram propostas, de modo a reduzir as complicações mais comumente associadas, como a perfuração da membrana de *Schneider*, utilizando equipamentos descritos como atraumáticos e não invasivos, como é o caso da cirurgia piezoelétrica, descrita por Wallace et al, em 2007 (Lumbau et al., 2021).

A escolha pela técnica cirúrgica a ser aplicada, bem como dos materiais utilizados, estão dependentes do nível de experiência do cirurgião e do conhecimento das técnicas e dos materiais disponíveis, da anatomia individual do seio maxilar e das possíveis contraindicações e complicações possíveis de ocorrer (Testori et al., 2019b).

A complicação cirúrgica mais ocorrente na elevação do pavimento do seio maxilar (*sinus lift*) é a perfuração da membrana de *Schneider* (Testori et al., 2019b). Segundo a literatura, o rácio de perfuração da membrana é de 25%, quando são utilizados

instrumentos rotatórios. A perfuração desta membrana pode ocorrer na preparação da janela lateral (especificamente com instrumentos rotatórios) e manipulação da própria membrana; pressão excessiva da membrana na impactação de materiais de enxerto ósseo (Testori et al., 2019b). A forma mais comum de complicação é a utilização de uma membrana de colagénio reabsorvível, no entanto, estão descritas na literatura outras opções de materiais a serem utilizados (Testori et al., 2019b).

Como já foi referido anteriormente, o material descrito como *gold standard* é o enxerto ósseo autólogo, usado em blocos ou particulado, por apresentar propriedades biológicas e mecânicas excelentes, no entanto, pode sofrer reabsorção do enxerto e apresenta disponibilidade limitada. Além das limitações mencionadas, morbilidade da zona dadora e risco de infeção local são descritas como limitações ao uso de enxerto ósseo autólogo (Rapone et al., 2022).

Vários são os materiais disponíveis para a técnica de *sinus lift*. A combinação de tecido ósseo autólogo e xenoenxerto tem sido estudado em vários estudos histológicos, demonstrando-se que a utilização xeno enxerto de bovino desproteínizado promove a viabilidade e proliferação celular (Rapone et al., 2022). Outra possibilidade é a utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) ou fibrina rica em plaquetas (PRF), o que foi demonstrado *in vitro* e *in vivo*, capacidade de cicatrização tecidual, promovendo o processo de regeneração óssea, homeostase óssea e vascularização para o tratamento de defeitos ósseos (Rapone et al., 2022).

A terapia celular com células estaminais tem vindo a crescer exponencialmente, devido aos resultados promissores demonstrados *in vitro* e *in vivo*, a utilização de células estaminais mesenquimais (MSCs) em combinação com uma matriz osteocondutiva ou materiais osteoindutivos, constitui uma terapia excelente para a regeneração óssea. De acordo com a literatura, vários artigos revelam que a utilização de células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMMSCs) são uma nova e promissora técnica para a abordagem do *Sinus Lift* (Lumbau et al., 2021; Parnia et al., 2018).

Zhou et al, realizaram um estudo clínico, no qual testaram a diferenciação osteoblástica das BMMSCs *in vitro*. Os resultados demonstraram ter havido uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado (Parnia et al., 2018).

Baseando-se nos resultados obtidos, a técnica de *Sinus Lift*, com utilização de MSCs em combinação com xenoenxertos ósseos, associados à capacidade osteogénica, a maturação óssea e ao processo de mineralização demonstraram ser superiores e, como tal,

foi proposta a terapia celular como uma opção viável de tratamento para o aumento de volume ósseo do seio maxilar (Parnia et al., 2018).

#### 2.6.4.3 Enxerto de Bloco

A melhor técnica documentada para a correção de um defeito ósseo horizontal, vertical ou combinados é a utilização de enxerto ósseo autólogo em bloco, na qual são utilizados parafusos de fixação do bloco ao leito nativo, para que se obtenha uma estabilização do enxerto, fundamental para o sucesso da técnica (Chiapasco & Casentini, 2018; Hameed et al., 2019).

A utilização de enxertos ósseos autólogos em bloco é considerada uma técnica *gold standard* por apresentar propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese. No entanto, a técnica está limitada à disponibilidade das zonas dadoras e à morbidade associada à colheita do enxerto (Hameed et al., 2019; Starch-Jensen & Becktor, 2019b).

O comportamento biológico desta técnica é bem conhecido na literatura e combina os processos de remodelação osteoclástica e integração osteoblástica, levando à cicatrização e incorporação do enxerto. A única situação clínica com pouca indicação para aplicação da técnica é a existência de um defeito ósseo irregular, de grandes dimensões (Chiapasco & Casentini, 2018).

Durante o processo de cicatrização, existe reabsorção do enxerto, considerada como sendo um processo natural (Zaki et al., 2018).

No processo de incorporação do enxerto, a interface entre o enxerto e o local recetor é preenchido numa primeira fase com tecido ósseo esponjoso recém-formado. De seguida, é formado novo tecido ósseo, dentro do enxerto, pela formação dos chamados cortes de cone, que representam uma conexão em túnel entre o tecido ósseo nativo e o enxerto (Chiapasco & Casentini, 2018).

O enxerto autólogo de crista ilíaca sofre maior reabsorção quando comparado com outros enxertos da cavidade oral, no entanto, as fontes dadoras intraorais apresentam pouca disponibilidade, o que está pouco indicado na reconstrução de mandíbulas severamente atroficas (de Santis et al., 2017).

Os blocos ósseos podem ser colhidos de zonas dadoras extra e intraorais, sendo a sua escolha dependente do volume ósseo necessário, do tipo de defeito ósseo, o tipo de enxerto (cortical ou esponjoso), da origem e da morbidade associada. Como zonas dadoras intraorais de blocos autógenos temos: a sínfise mandibular, o mento, o ramo mandibular e tuberosidade maxilar; as zonas extraorais são: crista ilíaca, calvária, tíbia e a fíbula (Atef et al., 2019b).

Além de enxertos autólogos, enxertos alogénicos e xenogénicos podem ser utilizados (Plonka et al., 2018).

A utilização de membranas como barreira protetora dos enxertos em bloco tem sido amplamente sugerida, de forma a reduzir a taxa de reabsorção, no entanto, a literatura também correlaciona a utilização de membranas com maior taxa de complicações, nomeadamente a deiscência da ferida e a exposição da própria membrana (Zaki et al., 2018).

A revascularização do enxerto é fundamental para manter a vitalidade do mesmo. Este recebe vasos sanguíneos a partir do tecido conjuntivo circundante, sendo uma causa para a reabsorção do próprio enxerto (Zaki et al., 2018).

A técnica cirúrgica de enxerto ósseo em bloco pode ser dividida na técnica onlay e inlay (Louis & Sittitavornwong, 2019). A técnica onlay pressupõe a fixação do enxerto em bloco na crista alveolar ou na região vestibular do rebordo, enquanto a técnica inlay presume a colocação sob o pavimento do seio maxilar ou das fossas nasais (Louis & Sittitavornwong, 2019).

A utilização de enxertos em bloco onlay está bem documentada na literatura. A hipótese de enxertos interposicionais relaciona-se com o contacto íntimo entre as partes laterais do enxerto e a zona recetora, resultando numa maior área de interação. Adicionalmente, ao existir uma maior área de contacto, o processo de angiogénese é acelerado, induzindo o aumento do potencial de osteoindução e osteocondução. A angiogénese do enxerto onlay dá-se principalmente numa única direção, podendo ser uma explicação para a taxa de reabsorção do enxerto de bloco ser superior na técnica onlay do que na técnica inlay (Atef et al., 2019b).

A técnica onlay faz uso de uma incisão subperiosteal, expondo a zona alveolar, onde então é fixado e bem-adaptado o enxerto em bloco ao tecido ósseo nativo e, qualquer gap existente entre o local recetor e o enxerto ósseo, pode ser coberto utilizando enxerto ósseo particulado, usualmente alolenxertos ou xenoenxertos (Louis & Sittitavornwong, 2019).

Na técnica inlay a incisão é de espessura total e a osteotomia é realizada a nível horizontal e oblíquo. Após a osteotomia, o segmento de tecido ósseo é transportado e levantado no sentido coronal, preservando vascularização, segue-se a implantação do enxerto ósseo entre o segmento ósseo e o tecido ósseo basal. Tal como na técnica onlay, na técnica inlay, os espaços entre o enxerto ósseo e o tecido ósseo nativo podem ser preenchidos com diferentes tipos de enxertos ósseos particulados (Atef et al., 2019b).

#### **2.6.4.4 Técnica Interposicional Mandibular**

A correção de deformidades esqueléticas e dentárias maxilofaciais usualmente inclui intervenções na maxila e na mandíbula. A osteotomia de LeFort I é utilizada para corrigir discrepâncias horizontais, verticais e transversais. O reposicionamento da maxila cria um espaço interposicional ósseo, a regeneração óssea através de enxerto interposicional origina um stop mecânico, providenciando uma matriz para a ossificação secundária, acelerando a união óssea (Sharma & Stringer, 2019).

O enxerto ósseo interposicional, também denominado como osteotomia em sanduíche, foi pela primeira vez descrito em 1976, por Schettler, que utilizou esta técnica para o aumento de volume ósseo vertical da mandíbula anterior edêntula (Louis & Sittitavornwong, 2019). Esta técnica consiste na separação de parte superior da crista mandibular (processo alveolar) da parte inferior. Após a osteotomia, é interposicionado material de enxertia óssea no espaço criado, sendo que esta técnica é normalmente realizada com enxertos ósseos de bloco (de Groot et al., 2018).

#### **2.6.4.5 Distração Óssea**

A distração óssea (DO) é uma técnica que permite a reparação natural do tecido ósseo, com crescimento e formação gradual de novo tecido ósseo, preenchendo um espaço criado pela separação local (lenta e sob tensão) de um segmento ósseo. A distração do segmento ósseo pode ser realizada na direção vertical e/ou na horizontal. As vantagens

desta técnica incluem não necessitar de um local dador, reduzindo a morbidade pós-operatória, a manutenção de um fluxo sanguíneo apropriado e o aumento simultâneo de tecidos moles e duros e a correção de defeitos ósseos verticais (Hameed et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Na técnica de distração óssea (DO), tanto tecidos duros como tecidos moles sofrem aumento, o segmento ósseo é mobilizado de maneira semelhante à utilização de enxertos ósseos interposicionais. O distrator é fixo ao segmento ósseo basal e ao segmento ósseo a ser deslocado através de parafusos, com um gap de aproximadamente de 1 a 2 mm (Hameed et al., 2019; Louis & Sittitavornwong, 2019).

O dispositivo de distração é ativado, passado uma semana da cirurgia, sendo feita a distração de 1mm por dia, dividido em duas ativações de 0,5mm a cada 12h (Louis & Sittitavornwong, 2019).

É necessária uma altura mínima de 6 a 7mm acima do nervo alveolar inferior para evitar lesionar o nervo ou fraturar o segmento ósseo ou a mandíbula (Louis & Sittitavornwong, 2019). A limitação principal desta técnica é não poder ser utilizada para aumento de volume ósseo vertical e horizontal simultaneamente (Hameed et al., 2019; Plonka et al., 2018).

O princípio básico da DO inclui um período de latência (aproximadamente sete dias) para a cicatrização pós-cirúrgica dos tecidos moles, a fase de distração propriamente dita, em que o tecido ósseo é segmentado e os dois segmentos sofrem uma separação gradual e incremental (num rácio de 1mm por dia através da ativação do distrator) e, uma fase de consolidação que se entende pela formação de tecido ósseo no novo espaço criado (3 a 4 meses) (Louis & Sittitavornwong, 2019).

#### **2.6.4.6 Expansão da Crista Alveolar – *Ridge Splitting***

A técnica de expansão da crista alveolar (*ridge splitting*) é uma alternativa às técnicas descritas para aumento de volume ósseo horizontal, incluindo a distração óssea, tendo um resultado e processo de cicatrização semelhante a esta (Starch-Jensen & Becktor, 2019b).

Nentwing, em 1986, reportou uma técnica de divisão óssea da crista alveolar em que, simultaneamente, permitiu a expansão da crista e a inserção de implantes. O

procedimento cirúrgico consiste na divisão das paredes ósseas corticais da crista alveolar, criando um espaço no meio, no qual se inserem implantes dentários e biomateriais. (Waechter et al., 2017).

Perante uma crista alveolar estreita, a expansão do osso alveolar por divisão (*split*) longitudinal, é uma técnica que pode ser utilizada para o aumento de espessura da crista, pressupondo que as placas de tecido ósseo cortical, vestibular e lingual, não estejam fundidas e que esteja presente tecido ósseo esponjoso (Starch-Jensen & Becktor, 2019b). A existência deste tecido ósseo esponjoso é fulcral para facilitar não só a introdução dos instrumentos para a expansão da crista alveolar, mas também, de modo a garantir uma vascularização suficiente durante a fase de cicatrização (Starch-Jensen & Becktor, 2019b).

Deste modo, as indicações para esta técnica requerem uma espessura mínima da crista alveolar de cerca de 3 mm. Cristas alveolares que apresentem reabsorção severa, com falta de elasticidade ou a presença da linha oblíqua externa na região mandibular posterior, dificultam a expansão e o deslocamento da crista alveolar por falta de volume ósseo medular. Esta técnica é recomendada nos casos em que a altura da crista alveolar é adequada, porém a largura é insuficiente (Starch-Jensen & Becktor, 2019b; Waechter et al., 2017).

Como materiais disponíveis para esta técnica cirúrgica temos: cinzéis, osteótomos e dispositivos piezocirúrgicos (Starch-Jensen & Becktor, 2019b; Waechter et al., 2017).

A principal vantagem desta técnica, comparando com os princípios da ROG, ou enxerto em bloco, é precisamente o tempo de tratamento reduzido e a redução da morbidade, porque não é necessário efetuar a colheita de tecido ósseo de um local dador. De acordo com a literatura atual a reconstrução horizontal de cristas alveolares com a técnica de *ridge splitting* é um procedimento cirúrgico efetivo, previsível, com resultados rápidos, apresentando um alto índice de sucesso na reabilitação com implantes dentários, consegue-se uma expansão da crista alveolar atrófica, não apresentado complicações biológicas e cirúrgicas (Starch-Jensen & Becktor, 2019b; Waechter et al., 2017).

Assim sendo, a técnica de expansão da crista alveolar é mais previsível em aumentos de volume ósseo maxilares, devendo-se à cortical óssea e ao tecido ósseo medular ser mais esponjoso e associado a maior vascularização. De acordo com a literatura mais recente, verificou-se existir um maior ganho de volume ósseo no maxilar do que na mandíbula (Starch-Jensen & Becktor, 2019b).

#### 2.6.4.7 Preservação do Alvéolo Dentário – *Socket Preservation*

A exodontia está indicada quando um dente não apresenta uma condição para ser restaurado ou não pode ser mantido em boca, por um período longo, devido à função ou estética (Juodzbaly et al., 2019)

O início do processo de cicatrização do alvéolo, após a extração dentária, é clinicamente observado com a formação de um coágulo sanguíneo, finalizado pelo encerramento epitelial. Este processo pode preservar as dimensões ósseas originais, com formação de tecido ósseo sem intercorrências, no entanto, mesmo a técnica cirúrgica mais conservadora pode causar reabsorção óssea, implicando a necessidade da utilização de técnicas para aumento de volume ósseo (Juodzbaly et al., 2019; Stumbras et al., 2019).

Como descrito anteriormente, a exodontia ativa uma cascata de acontecimentos biológicos, inerentes à resposta do organismo, mediada por fatores inflamatórios pós-cirúrgicos, como consequência ocorre um processo biológico de atrofia óssea, processo este que ocorre nas primeiras semanas imediatamente após a extração, e que se prolonga por toda a vida (Stumbras et al., 2019).

Diferentes estudos demonstram os seus resultados ao avaliar a perda óssea alveolar, ao longo do tempo e, em média a reabsorção do alvéolo nos primeiros três meses representa dois terços da área da crista óssea residual, sendo que no primeiro ano apresenta uma reabsorção óssea de 50% na sua largura (Juodzbaly et al., 2019).

Para diminuir a reabsorção alveolar pós-extração e/ou restaurar as paredes do alvéolo lesionadas, vários protocolos de tratamento têm sido recomendados, visando limitar a severidade de reabsorção óssea, no entanto nenhuma técnica permite prevenir a sua ocorrência a 100% (Juodzbaly et al., 2019).

As técnicas de preservação do alvéolo dentário incluem: o preenchimento do mesmo com biomateriais (associado a tecido ósseo particulado), geralmente denominado de ARP-SG (na língua nativa *alveolar ridge preservation via socket grafting*); com associação ou não a membranas de barreira (Avila-Ortiz et al., 2019).

A regeneração óssea, como explicado anteriormente, requer a migração de células específicas para a zona de cicatrização, de modo a promover o substrato biológico necessário para a neoformação óssea. A migração celular, proliferação e diferenciação são reguladas por um número de fatores solúveis, em coordenação com sinais

extracelulares, suporte tridimensional, vascularização e matrizes (Pranskunas et al., 2019).

As MSCs têm sido analisadas como terapia potencial para a preservação e regeneração alveolar. Pranskunas et al, em 2019, realizaram uma revisão sistemática na qual analisaram a preservação alveolar utilizando fatores de crescimento e células estaminais. Nesta revisão descreveram três estudos onde se utilizaram células estaminais mesenquimais (MSCs), recolhidas da crista ilíaca, diferindo no processo de cultura e purificação, na qual os autores apresentaram resultados positivos, com a técnica utilizada, para a preservação do alvéolo dentário (Pranskunas et al., 2019).

## 2.7 Aplicação de Células Estaminais Mesenquimais

O desenvolvimento técnico mais significativo em engenharia tecidual nas técnicas de regeneração óssea, consiste na produção de uma matriz biológica na qual o biomaterial é colonizado por células específicas (Battafarano et al., 2021).

As matrizes são consideradas uma estrutura ou meio de cultivo para as células estaminais, que também servem como agente ativo para essas células no processo de implantação *in vivo* (Yorukoglu et al., 2017).

As MSCs desempenham um papel fundamental ao tornarem-se osteoblastos e condrócitos com capacidade de formação de tecido ósseo, que em seguida sofrem ossificação endocondral, sendo, portanto, mais adequadas que as ESCs e iPSCs e até mesmo que osteoblastos (número limitado e potencial de proliferação reduzido) para a regeneração de tecido ósseo com terapia celular (Battafarano et al., 2021).

A aplicação de MSCs para regeneração óssea consiste na transplantação de células estaminais mesenquimais da medula óssea (BM MSCs) e a administração de MSCs expandidas numa cultura *in vitro* (Battafarano et al., 2021).

Nestas abordagens, as MSCs são implantadas com um enxerto ósseo sintético, de modo a ocorrer regeneração *in situ*. A utilização de matrizes facilita a incorporação de MSCs para o defeito ósseo e reduz o risco de formação de tecido ósseo ectópico (Battafarano et al., 2021).

A diferenciação de células estaminais na linhagem osteogénica pode ser dividida em três fases principais: pico numérico de células, diferenciação celular e produção de osteocalcina e osteopontina (OPN) (Lopes et al., 2018a).

Na medula óssea, as BMMSCs residem num nicho específico, como descrito anteriormente, composto por uma variedade de células de suporte, incluindo células progenitoras hematopoiéticas, osteoclastos, células imunitárias e sanguíneas. A diferenciação osteogénica de MSCs é influenciada por fatores segregados por osteoblastos e osteócitos, no entanto, a cultura *in vitro* de MSCs com osteócitos tem revelado um potencial de diferenciação superior quando comparado com uma cultura de MSCs em conjunto com osteoblastos, no entanto, a proliferação celular é maior na cultura contendo osteoblastos (Lopes et al., 2018a).

A manutenção de um microambiente funcional no nicho ósseo, depende do nível preciso da linhagem hierárquica de HSCs e MSCs, para que a osteoblastogénese e a hematopoiese se mantenham em constante equilíbrio. Dessa forma, os osteoblastos que expressem de forma positiva N-caderina, interagem com HSCs auxiliando a ancoragem destas células ao nicho osteoblástico (Lopes et al., 2018b).

Na literatura científica existe um consenso no procedimento protocolar para a diferenciação osteogénica de MSCs *in vitro*, pela adição ao meio de cultura de uma monocamada confluyente de dexametasona, ácido ascórbico ou  $\beta$ -glycerofosfato (Yorukoglu et al., 2017).

Diversos métodos podem ser utilizados para a colonização e cultura destas células, por exemplo, as MSCs podem ser desenvolvidas num meio de cultura numa matriz previamente criada ou, noutro caso, ser realizada a deposição simultânea de MSCs e biomateriais (Battafarano et al., 2021).

As abordagens de diferenciação de células estaminais em células ósseas funcionais são baseadas em estímulos externos, que incluem plataformas mineralizadas/mineralizáveis, semelhante ao processo de ossificação endocondral (Lopes et al., 2018b).

Yuan et al, em 2010, introduziram a ideia de cerâmica baseada em fosfato de cálcio como estratégia de ser um biomaterial osteoindutivo. O fosfato de cálcio com diferentes composições químicas, como hidroxiapatita, fosfato tricálcico, e mistura de ambos (fosfato de cálcio bifásico) foram testados na sua capacidade em induzir a diferenciação *in vitro* de MSCs, tal como a capacidade de formação óssea *in vivo* (Lopes et al., 2018b).

Zhang et al deduziram que as BMMSCs demonstram um potencial osteogénico superior às ATMSCs, quando introduzidas numa matriz tridimensional bio mimética composta por policaprolactona e fosfato tricálcico, cultivadas num meio de cultura com fatores de diferenciação osteoblástica (Luby et al., 2019).

Em suma, numa primeira fase as MSCs autólogas ou alógenas são isoladas e expandidas *in vitro*, de modo a garantir população celular suficiente e adequada. De seguida, são estimuladas para induzirem a diferenciação osteogénica e incorporadas num biomaterial, podendo conter moléculas como fatores de crescimento. Em alternativa, as MSCs podem ser implantadas, para que este processo se desenvolva *in vivo*. Idealmente a escolha da técnica a realizar, por parte do cirurgião, deve ter como objetivo a promoção de um ambiente propício para que exista uma estimulação contínua, de forma que estas células formem novo tecido ósseo (Ho-Shui-Ling et al., 2018b).

As BMMSCs são as células estaminais mesenquimais (MSCs) mais utilizadas desde a descoberta desta população celular, há mais de 50 anos. Consequentemente são as mais utilizadas frequentemente para a regeneração óssea, quer no estado original de recolha ou após cultura e expansão *in vitro*. Como matrizes, segundo a literatura, as mais utilizadas são enxertos ósseos, os materiais aloplásticos e matrizes de colagénio (Ho-Shui-Ling et al., 2018b).

O processo de cicatrização óssea combinado com a terapia celular de MSCs, tem sido melhorado através biomateriais como por exemplo: materiais metálicos, cerâmicas polímeros e materiais compostos. Desai et al, demonstraram a eficácia da técnica de aspiração de medula óssea, com recolha de BMMSCs, combinada com a utilização de uma matriz de tecido ósseo desmineralizado para o tratamento de disjunções da tibia com *gaps* de fratura menores que 5 mm (Battafarano et al., 2021).

Em seguida serão apresentados dois casos clínicos exemplificativos da utilização de MSCs para regeneração óssea em Medicina Dentária, figuras 15 a 21.

No caso clínico 1 (figuras 15 a 18), a técnica cirúrgica utilizada foi a elevação do pavimento do seio maxilar para correção de defeito ósseo vertical maxilar posterior, através da técnica da “janela lateral” e utilização de um xenoenxerto de origem bovina associado a células estaminais mesenquimais alógenas.

No caso clínico 2 (figuras 19 a 21), foi aplicada a técnica de aspiração de BMMSCs autólogas da região anterior da crista ilíaca, associado a um xenoenxerto de origem bovina para regeneração óssea de defeito ósseo vertical maxilar para aumento do pavimento do seio maxilar pela técnica da “janela lateral”.

### Caso clínico #1

#### *Sinus Lift com Aplicação de Células Estaminais Mesenquimais (MSCs)*

*(Gentilmente fornecido pelos Professores Doutores Dennis Smiler e Alexander Salvoni)*



Figura 15. a) - Vista intracirúrgica da “janela lateral” para acesso ao seio maxilar. b) - MSCs de origem alógena (MSC-TP, Chara Biologics, inc).

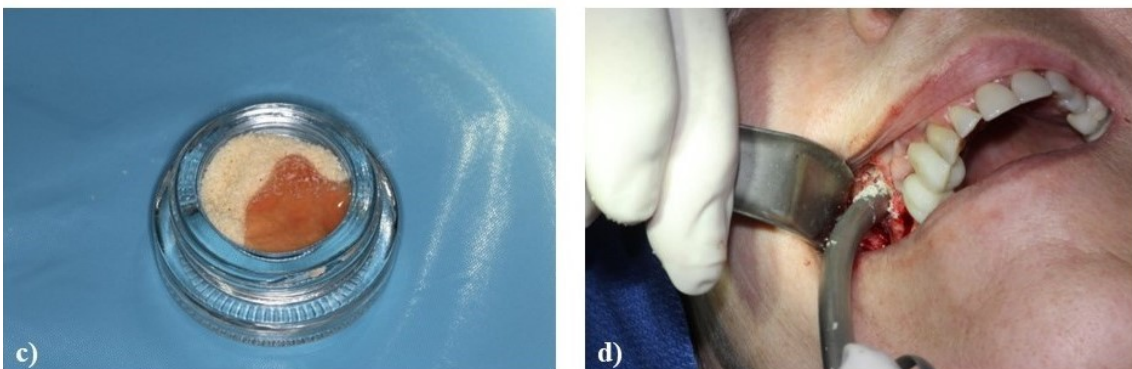


Figura 16. c) – Xenoenxerto bovino particulado e MSC-TP. d) – Imagem intracirúrgica da aplicação de xenoenxerto bovino e MSC-TP homogeneizado no seio maxilar.

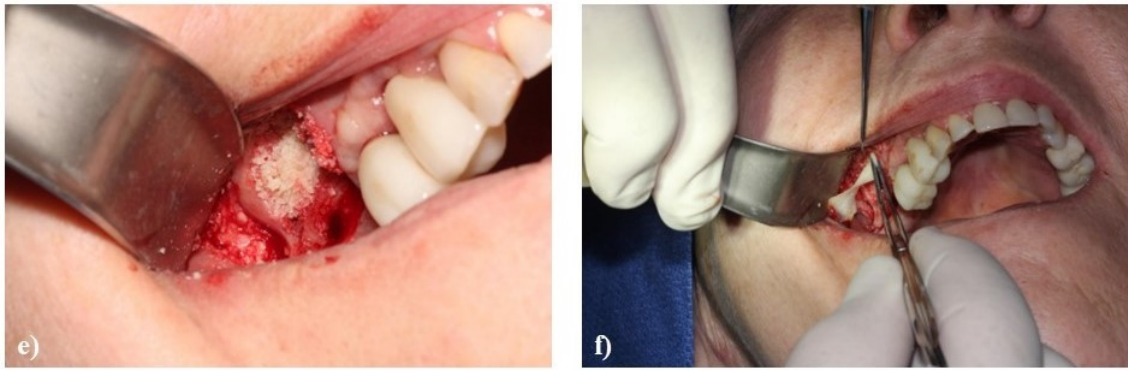


Figura 17. e) – Imagem intracirúrgica dos dois biomateriais adequadamente compactados. f) – Vista intracirúrgica da aplicação de membrana de colagénio para encerramento da “janela lateral”.

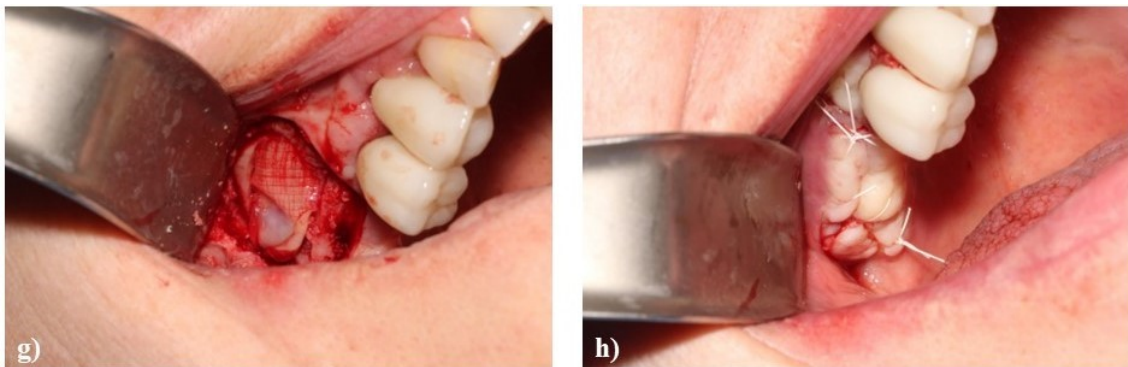
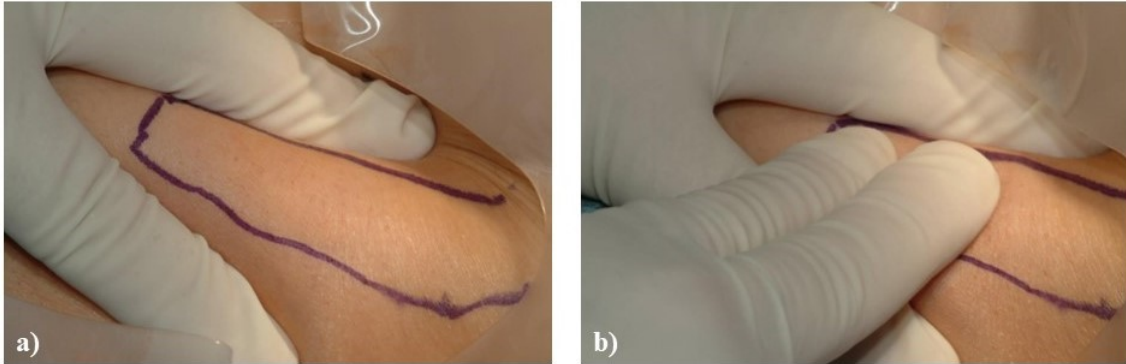


Figura 18. g) – Vista intracirúrgica do encerramento da “janela lateral” com membrana de colagénio. h) – Vista intraoperatória do encerramento da ferida operatória com sutura PTFE.

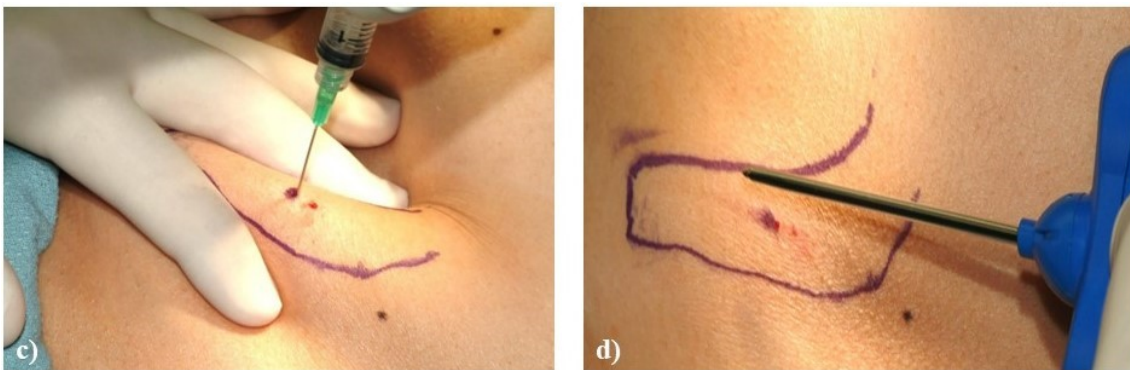
## Caso clínico #2

*Aspiração de BMMSCs (Células Estaminais Derivadas da Medula Óssea)*

*(Gentilmente fornecido pelos Professores Doutores Dennis Smiler e Alexander Salvoni)*



*Figura 19. a) – Imagem da delimitação geográfica da crista ilíaca anterior. b) – Imagem da palpação e identificação da crista ilíaca anterior.*



*Figura 20. c) – Imagem da anestesia do local da aspiração. d) – Imagem da seringa de aspiração de BMMSCs.*



*Figura 21. e) – Imagem do depósito da seringa de aspiração contendo BMMSCs. f) – Imagem da associação das BMMSCs a xenoenxerto particulado.*

## **2.8 Regulamentação e Criopreservação de Células Estaminais**

Em 1991 foi formado o primeiro banco público de tecidos e células estaminais, o New York Blood Center, nos Estados Unidos. Seguido do mesmo surgiram outros bancos públicos na Europa, como em Paris e Milão, acompanhados pela expansão precoce de bancos privados (Petrini, 2014).

Portugal e Espanha presenciam um sistema misto, onde se caracterizam pela existência de dois tipos de bancos de criopreservação de células estaminais (do cordão umbilical), no entanto, existem países na Europa, como França, Itália ou Irlanda em que é proibida a existência de bancos privados, uma vez que os devidos comités de ética biológica consideram o armazenamento de células estaminais, em bancos privados, para uso autólogo, como prejudicial ao sistema público de doações. No entanto, Espanha é um país exemplo que, apesar de ser permitido a existência de bancos de células privados, as amostras preservadas são obrigatoriamente disponibilizadas para uso público (Petrini, 2014).

Existe ainda um modelo de bancos de armazenamento de células estaminais, o banco familiar. Este promove o armazenamento para uso familiar, existente em poucos países, considerando-se um alargamento dos bancos privados (Petrini, 2014).

O conselho da Europa, em 2004, recomendou se forem estabelecidos bancos de sangue do cordão umbilical, estes têm o dever de ser baseados em doações altruístas e

voluntárias, sendo utilizados para transplantes alogénicos e a possibilidade de se realizar investigações relacionadas com o mesmo (Petrini, 2014).

O conceito de banco híbrido define-se pelos princípios de um banco público e privado, isto é, uma quantidade de amostra é preservada para uso privado (para o próprio dador ou familiares) e a outra porção é disponível para o público. Como exemplos temos o Virgin Bank, no Reino Unido e o StemCyte, nos Estados Unidos (Petrini, 2014).

Em Portugal foi criado o Banco Público de Células do Cordão Umbilical (BPCCU), conhecido por Lusocord, em 2009. Foi reconhecido como o primeiro e único banco público de células estaminais até à data. A partir de 2012, passou a estar sob controlo do Instituto Português do Sangue e da Transplantação (IPST) e dedica-se à receção, análise, processamento, criopreservação e distribuição de dádivas de sangue do cordão umbilical que cumpram os princípios exigidos, organização e todas as exigências da legislação nacional, a partir das diretivas europeias associadas a esta atividade. Até 2016 o BPCCU ainda não tinha a certificação internacional, e apresentava 466 amostras de células estaminais crio preservadas, sendo que o número mínimo exigido para o pedido de certificação é de 500. A relação internacional de todos os bancos públicos é assegurada pela EuroCord, sediada em Paris (Ana Maia, 2017).

A colheita, atualmente, é realizada em quatro unidades hospitalares nacionais: o Centro Hospitalar Universitário de São João no Porto, o Centro Hospitalar Universitário do Porto – Centro Materno Infantil do Norte no Porto, a Unidade Local de Saúde de Matosinhos – Hospital Pedro Hispano em Matosinhos e o Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca na Amadora. Estas unidades asseguram a gestão e qualidade deste serviço. A recolha e a criopreservação integram um serviço gratuito ficando, as amostras, à disposição de todos os cidadãos (Instituto Português do Sangue e da Transplantação [IPST], 2020).

O IPST, de acordo com o Decreto-Lei nº124, 29 de dezembro de 2011, passou a integrar as obrigações da prévia Autoridade para os Serviços de Sangue e Transplantação, sendo que a autorização de unidades e processos em relação à dádiva, colheita, análise, preservação e distribuição e a sua regulamentação e controlo dos padrões de qualidade e segurança estão a encargo da Direção Geral de Saúde (DGS), segundo a Lei nº 12, de 26 de março de 2009.

Em Portugal operam algumas instituições privadas:

- Future Health Bio Bank (<https://futurehealthbiobank.com/pt> )
- Bebevida (<https://bebevida.com/>)

- Crioestaminal (<https://www.crioestaminal.pt/> )
- Criodente (células estaminais dentárias – DMSCs - <https://criodente.com/>)
- BebéCord (<https://www.bebecord.pt/index/> )

### III. Conclusão

Ao realizar esta revisão bibliográfica consegui perceber que apesar do grande desenvolvimento, intensa investigação, inúmeros estudos e ensaios clínicos realizados desde os finais dos anos noventa, que a utilização de células estaminais mesenquimais na medicina dentária ainda constitui uma terapêutica pouco presente na prática clínica diária. No que respeita à utilização de MSCs na medicina, a sua utilização está bem representada, sobretudo nas técnicas de colheita associadas aos nascimentos para criopreservação em bancos específicos e eventual utilização posterior.

Estas células têm a capacidade de autorrenovação e apresentam potencialidade de se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, não estando limitadas à diferenciação na linhagem germinativa da mesoderme.

Existem vários locais para colheita de MSCs, extraorais e intraorais, no entanto, os locais de colheita mais utilizados são a medula óssea e o tecido adiposo, principalmente por constituírem locais com elevada contagem de células por grama e apresentarem maior quantidade de ensaios com resultados positivos realizados. Os estudos realizados *in vitro* com utilização de MSCs de origem dentária mostram resultados bastante positivos e promissores para a sua futura utilização. Nesse sentido deve-se continuar o trabalho de investigação e análise dos diferentes locais de colheita, evitando a morbidade associada às fontes usuais de MSCs.

A seleção das fontes autólogas ou alógenas isoladas para colheita de MSCs podem ser provenientes de bancos públicos ou privados de criopreservação, no entanto, ambas as técnicas apresentam resultados semelhantes.

A regeneração e modelação óssea constituem um processo complexo, biológico e fisiológico, presente em diversas situações clínicas de defeitos ósseos originados por doenças tumorais, traumatismos, malformações congénitas, exodontias traumáticas e ainda em casos clínicos de reabilitação oral pré-implantar e pré-prostética, nos quais está indicada a reconstrução desses mesmos defeitos.

De acordo com a literatura atual, a utilização de técnicas cirúrgicas com utilização de células estaminais mesenquimais associadas a diferentes biomateriais, podem melhorar consideravelmente a qualidade da regeneração óssea. As técnicas cirúrgicas que utilizam MSCs com maior frequência são a formação óssea guiada, a

elevação do pavimento do seio maxilar, a preservação do alvéolo dentário e os enxertos ósseos em bloco. Outras técnicas, como a distração óssea, situam-se numa fase promissora de investigação, em que se observa a publicação e a continuação de estudos *in vivo* em modelos animais com resultados positivos, representando um papel crucial no desenvolvimento da terapêutica.

Os resultados de estudos realizados e publicados, quando comparados com a utilização de uma técnica cirúrgica sem associação de MSCs, e com a mesma técnica utilizando estas células, permitiram concluir que ocorreu uma aceleração do processo de regeneração óssea acompanhada de uma melhor formação óssea.

Deste modo, os resultados encontrados neste trabalho de pesquisa, mostraram-se bastante promissores, ao comprovarem o potencial de utilização destas células, quer nos estudos *in vitro* quer nos estudos *in vivo* e demonstram a importância da continuação da investigação desta temática na comunidade científica, para que num futuro próximo seja frequente a sua utilização na prática clínica em medicina dentária.

#### IV. Bibliografia

- Adamička, M., Adamičková, A., Danišovič, L., Gažová, A., & Kyselovič, J. (2021). Pharmacological Approaches and Regeneration of Bone Defects with Dental Pulp Stem Cells. *Stem Cells International*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/4593322>
- Ahamad, N., & Singh, B. B. (2021). Calcium channels and their role in regenerative medicine. *World Journal of Stem Cells*, 13(4), 260–280. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i4.260>
- Albrektsson. (2019). Are Oral Implants the Same As Teeth? *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1501. <https://doi.org/10.3390/jcm8091501>
- Alessandrini, M., Preynat-Seauve, O., de Briun, K., & Pepper, M. S. (2019). Stem cell therapy for neurological disorders. *South African Medical Journal*, 109(8b), 70. <https://doi.org/10.7196/SAMJ.2019.v109i8b.14009>
- Alghamdi, H. (2018). Methods to Improve Osseointegration of Dental Implants in Low Quality (Type-IV) Bone: An Overview. *Journal of Functional Biomaterials*, 9(1), 7. <https://doi.org/10.3390/jfb9010007>
- Alshenaiber, R., Cowan, C., Barclay, C., & Silikas, N. (2021). Analysis of Residual Ridge Morphology in a Group of Edentulous Patients Seeking NHS Dental Implant Provision—A Retrospective Observational Lateral Cephalometric Study. *Diagnostics*, 11(12), 2348. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122348>
- Aly, R. M. (2020). Current state of stem cell-based therapies: an overview. *Stem Cell Investigation*, 7, 8–8. <https://doi.org/10.21037/sci-2020-001>
- Ana Maia. (2017). Banco público pode avançar este ano para certificado internacional. *Diário de Notícias*.
- Ansari, S., Seagroves, J. T., Chen, C., Shah, K., Aghaloo, T., Wu, B. M., Bencharit, S., & Moshaverinia, A. (2017). Dental and orofacial mesenchymal stem cells in craniofacial regeneration: The prosthodontist's point of view. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 118(4), 455–461. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2016.11.021>
- Atef, M., Osman, A. H., & Hakam, M. (2019a). Autogenous interpositional block graft vs onlay graft for horizontal ridge augmentation in the mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(4), 678–685. <https://doi.org/10.1111/cid.12809>

Atef, M., Osman, A. H., & Hakam, M. (2019b). Autogenous interpositional block graft vs onlay graft for horizontal ridge augmentation in the mandible. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 21(4), 678–685. <https://doi.org/10.1111/cid.12809>

Atef, M., Tarek, A., Shaheen, M., Alarawi, R. M., & Askar, N. (2020). Horizontal ridge augmentation using native collagen membrane vs titanium mesh in atrophic maxillary ridges: Randomized clinical trial. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 22(2), 156–166. <https://doi.org/10.1111/cid.12892>

Attia, N., & Mashal, M. (2020). *Mesenchymal Stem Cells: The Past Present and Future* (pp. 107–129). [https://doi.org/10.1007/5584\\_2020\\_595](https://doi.org/10.1007/5584_2020_595)

Avila-Ortiz, G., Chambrone, L., & Vignoletti, F. (2019). Effect of alveolar ridge preservation interventions following tooth extraction: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 195–223. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13057>

Bacakova, L., Zarubova, J., Travnickova, M., Musilkova, J., Pajorova, J., Slepicka, P., Kasalkova, N. S., Svorcik, V., Kolska, Z., Motarjemi, H., & Molitor, M. (2018). Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>

Bahney, C. S., Zondervan, R. L., Allison, P., Theologis, A., Ashley, J. W., Ahn, J., Miclau, T., Marcucio, R. S., & Hankenson, K. D. (2019). Cellular biology of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(1), 35–50. <https://doi.org/10.1002/jor.24170>

Bakhshandeh, B., Zarrintaj, P., Oftadeh, M. O., Keramati, F., Fouladiha, H., Sohrabi-jahromi, S., & Ziraksaz, Z. (2017). Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 33(2), 144–172. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1430464>

Bartolucci, J., Verdugo, F. J., González, P. L., Larrea, R. E., Abarzua, E., Goset, C., Rojo, P., Palma, I., Lamich, R., Pedreros, P. A., Valdivia, G., Lopez, V. M., Nazzal, C., Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Brobeck, M. J., Patel, A. N., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2017). Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure. *Circulation Research*, 121(10), 1192–1204. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310712>

Battafarano, G., Rossi, M., de Martino, V., Marampon, F., Borro, L., Secinaro, A., & del Fattore, A. (2021). Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue

Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1128. <https://doi.org/10.3390/ijms22031128>

Berebichez-Fridman, R., & Montero-Olvera, P. R. (2018). Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos University Medical Journal [SQUMJ]*, 18(3), 264. <https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002>

Brown, C., McKee, C., Bakshi, S., Walker, K., Hakman, E., Halassy, S., Svinarich, D., Dodds, R., Govind, C. K., & Chaudhry, G. R. (2019). Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), 1738–1755. <https://doi.org/10.1002/term.2914>

Brozek, R., Kurpisz, M., & Koczorowski, R. (2018). Application of stem cells in dentistry for bone regeneration. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 69(1), 23–33. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.1.03>

Cheng, S., Nethi, S. K., Rathi, S., Layek, B., & Prabha, S. (2019). Engineered Mesenchymal Stem Cells for Targeting Solid Tumors: Therapeutic Potential beyond Regenerative Therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 370(2), 231–241. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.259796>

Chiapasco, M., & Casentini, P. (2018). Horizontal bone-augmentation procedures in implant dentistry: prosthetically guided regeneration. *Periodontology 2000*, 77(1), 213–240. <https://doi.org/10.1111/prd.12219>

Chu, C., Wei, S., Wang, Y., Wang, Y., Man, Y., & Qu, Y. (2019). Extracellular vesicle and mesenchymal stem cells in bone regeneration: recent progress and perspectives. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(1), 243–250. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36518>

Çolpak, H. A., Gönen, Z. B., Özdamar, S., Alkan, A., & Kütük, N. (2019). Vertical ridge augmentation using guided bone regeneration procedure and dental pulp derived mesenchymal stem cells with simultaneous dental implant placement: A histologic study in a sheep model. *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*, 120(3), 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2018.12.011>

Dao, T. T.-T., Nguyen, C. T.-H., Vu, N. B., Le, H. T.-N., Nguyen, P. D.-N., & van Pham, P. (2019). *Evaluation of Proliferation and Osteogenic Differentiation of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in Porous Scaffolds* (pp. 207–220). [https://doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_343](https://doi.org/10.1007/5584_2019_343)

Dave, J. R., & Tomar, G. B. (2018). Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 46(5), 429–468. <https://doi.org/10.1615/CritRevBiomedEng.2018027342>

de Groot, R. J., Oomens, M. A. E. M., Forouzanfar, T., & Schulten, E. A. J. M. (2018). Bone augmentation followed by implant surgery in the edentulous mandible: A systematic review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 45(4), 334–343. <https://doi.org/10.1111/joor.12605>

de Santis, E., Silva, E. R., Martins, E. N. C., Favero, R., Botticelli, D., & Xavier, S. P. (2017). Healing at the Interface Between Autologous Block Bone Grafts and Recipient Sites Using n-Butyl-2-Cyanoacrylate Adhesive as Fixation: Histomorphometric Study in Rabbits. *Journal of Oral Implantology*, 43(6), 447–455. <https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-17-00108>

Dekker, H., Schulten, E. A. J. M., ten Bruggenkate, C. M., Bloemena, E., van Ruijven, L., & Bravenboer, N. (2018). Resorption of the mandibular residual ridge: A micro-CT and histomorphometrical analysis. *Gerodontology*, 35(3), 221–228. <https://doi.org/10.1111/ger.12343>

Donnelly, H., Salmeron-Sanchez, M., & Dalby, M. J. (2018). Designing stem cell niches for differentiation and self-renewal. *Journal of The Royal Society Interface*, 15(145), 20180388. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0388>

Elgali, I., Omar, O., Dahlin, C., & Thomsen, P. (2017). Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European Journal of Oral Sciences*, 125(5), 315–337. <https://doi.org/10.1111/eos.12364>

Elian, S., & Barakat, K. (2018). Crestal endoscopic approach for evaluating sinus membrane elevation technique. *International Journal of Implant Dentistry*, 4(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s40729-018-0126-6>

Eskandarloo, A., Arabi, R., Bidgoli, M., Yousefi, F., & Poorolajal, J. (2019). Association between marginal bone loss and bone quality at dental implant sites based on evidence from cone beam computed tomography and periapical radiographs. *Contemporary Clinical Dentistry*, 10(1), 36. [https://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_185\\_18](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_185_18)

Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>

Gomez-Salazar, M., Gonzalez-Galofre, Z. N., Casamitjana, J., Crisan, M., James, A. W., & Péault, B. (2020). Five Decades Later, Are Mesenchymal Stem Cells Still Relevant? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00148>

Guglielmotti, M. B., Olmedo, D. G., & Cabrini, R. L. (2019). Research on implants and osseointegration. *Periodontology 2000*, 79(1), 178–189. <https://doi.org/10.1111/prd.12254>

Hameed, M. H., Gul, M., Ghafoor, R., & Khan, F. R. (2019). Vertical Ridge Gain with Various Bone Augmentation Techniques: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Prosthodontics*, 28(4), 421–427. <https://doi.org/10.1111/jopr.13028>

Han, J., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Australian Dental Journal*, 59, 117–130. <https://doi.org/10.1111/adj.12100>

Hanna, H., Mir, L. M., & Andre, F. M. (2018). In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0942-x>

Hassanzadeh, P., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2018). Tissue engineering: Still facing a long way ahead. *Journal of Controlled Release*, 279, 181–197. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.04.024>

Hernández-Monjaraz, B., Santiago-Osorio, E., Monroy-García, A., Ledesma-Martínez, E., & Mendoza-Núñez, V. (2018). Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin for Inducing Tissue Regeneration in Periodontitis: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 944. <https://doi.org/10.3390/ijms19040944>

Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P., & Picart, C. (2018a). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>

Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P., & Picart, C. (2018b). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>

Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP. (2020). *Onde posso doar sangue do cordão umbilical*. <https://www.ipst.pt/index.php/pt/bpccu-faq/152-onde-posso-doar-sangue-do-cordao-umbilical>

Juodzbaly, G., Stumbras, A., Goyushov, S., Duruel, O., & Tözüm, T. F. (2019). Morphological Classification of Extraction Sockets and Clinical Decision Tree for Socket Preservation/Augmentation after Tooth Extraction: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(3). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10303>

Juzikis, E., Gaubys, A., & Rusilas, H. (2018). Uses of maxillary sinus lateral wall bony window in an open window sinus lift procedure: literature review. *Stomatologija*, 20(1), 14–21.

Kangari, P., Talaei-Khozani, T., Razeghian-Jahromi, I., & Razmkhah, M. (2020). Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 492. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02001-1>

Kenkre, J., & Bassett, J. (2018). The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*, 55(3), 308–327. <https://doi.org/10.1177/0004563218759371>

Landry, D. W., & Zucker, H. A. (2004). Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 114(9), 1184–1186. <https://doi.org/10.1172/JCI23065>

Lei nº 12/2009, de 26 de março de 2009. *Diário da República, Série I (60)*. <https://dre.pt/dre/legislacao-consolidada/lei/2009-75286810>

Lei nº 124/2011, de 29 de dezembro de 2011. *Diário da República, Série I (249)*. <https://dre.pt/dre/legislacao-consolidada/decreto-lei/2011-66341485>

Li, L., Wang, C., Li, X., Fu, G., Chen, D., & Huang, Y. (2021). Research on the dimensional accuracy of customized bone augmentation combined with 3D-printing individualized titanium mesh: A retrospective case series study. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 23(1), 5–18. <https://doi.org/10.1111/cid.12966>

Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, 203, 96–110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>

Lin, W., Xu, L., Zwingenberger, S., Gibon, E., Goodman, S. B., & Li, G. (2017). Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2017.03.002>

Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M., & Fessler, R. G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(1), 3–32. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>

Lopes, D., Martins-Cruz, C., Oliveira, M. B., & Mano, J. F. (2018a). Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*, *185*, 240–275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>

Lopes, D., Martins-Cruz, C., Oliveira, M. B., & Mano, J. F. (2018b). Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*, *185*, 240–275. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.09.028>

López-Píriz, R., Cabal, B., Goyos-Ball, L., Fernández, A., Bartolomé, J. F., Moya, J. S., & Torrecillas, R. (2019). Current state-of-the-art and future perspectives of the three main modern implant-dentistry concerns: Aesthetic requirements, mechanical properties, and peri-implantitis prevention. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *107*(7), 1466–1475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36661>

Louis, P. J., & Sittitavornwong, S. (2019). Managing Bone Grafts for the Mandible. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, *31*(2), 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.12.008>

Luby, A. O., Ranganathan, K., Lynn, J. v., Nelson, N. S., Donneys, A., & Buchman, S. R. (2019). Stem Cells for Bone Regeneration. *Journal of Craniofacial Surgery*, *30*(3), 730–735. <https://doi.org/10.1097/SCS.00000000000005250>

Lumbau, A. I., Meloni, S. M., Tallarico, M., Melis, L., Spano, G., Baldoni, E., Koshovari, A., & Pisano, M. (2021). Implant Placement Following Crestal Sinus Lift with Sequential Drills and Osteotomes: Five Years after Final Loading Results from a Retrospective Study. *Journal of Functional Biomaterials*, *12*(1), 10. <https://doi.org/10.3390/jfb12010010>

Makary, C., Menhall, A., Zammarie, C., Lombardi, T., Lee, S. Y., Stacchi, C., & Park, K. B. (2019). Primary Stability Optimization by Using Fixtures with Different Thread Depth According To Bone Density: A Clinical Prospective Study on Early Loaded Implants. *Materials*, *12*(15), 2398. <https://doi.org/10.3390/ma12152398>

Marcus, A. J., & Woodbury, D. (2008). Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *12*(3), 730–742. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x>

Miguita, L., Mantesso, A., Pannuti, C. M., & Deboni, M. C. Z. (2017). Can stem cells enhance bone formation in the human edentulous alveolar ridge? A systematic review and meta-analysis. *Cell and Tissue Banking*, *18*(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s10561-017-9612-y>

Mohamed-Ahmed, S., Fristad, I., Lie, S. A., Suliman, S., Mustafa, K., Vindenes, H., & Idris, S. B. (2018). Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0914-1>

Mora, C., Serzanti, M., Consiglio, A., Memo, M., & Dell’Era, P. (2017). Clinical potentials of human pluripotent stem cells. *Cell Biology and Toxicology*, 33(4), 351–360. <https://doi.org/10.1007/s10565-017-9384-y>

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018a). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>

Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018b). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry Part A*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>

Naji, A., Eitoku, M., Favier, B., Deschaseaux, F., Rouas-Freiss, N., & Suganuma, N. (2019). Biological functions of mesenchymal stem cells and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(17), 3323–3348. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03125-1>

Nickenig, H.-J., Riekert, M., Zirk, M., Lentzen, M.-P., Zöllner, J. E., & Kreppel, M. (2022). 3D-based buccal augmentation for ideal prosthetic implant alignment—an optimized method and report on 7 cases with pronounced buccal concavities. *Clinical Oral Investigations*, 26(5), 3999–4010. <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04369-1>

Papayannopoulou, T., & Scadden, D. T. (2008). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood*, 111(8), 3923–3930. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-078147>

Parnia, F., Yazdani, J., & Maleki Dizaj, S. (2018). Applications of Mesenchymal Stem Cells in Sinus Lift Augmentation as a Dental Implant Technology. *Stem Cells International*, 2018, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2018/3080139>

Parra, M., Atala-Acevedo, C., Fariña, R., Haidar, Z. S., Zaror, C., & Olate, S. (2018). Graftless Maxillary Sinus Lift Using Lateral Window Approach. *Implant Dentistry*, 27(1), 111–118. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000695>

PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. (2002). *Childhood Medulloblastoma and Other Central Nervous System Embryonal Tumors Treatment (PDQ®): Health Professional Version*.

Perić Kačarević, Ž., Rider, P., Alkildani, S., Retnasingh, S., Pejakić, M., Schnettler, R., Gosau, M., Smeets, R., Jung, O., & Barbeck, M. (2020). An introduction

to bone tissue engineering. *The International Journal of Artificial Organs*, 43(2), 69–86. <https://doi.org/10.1177/0391398819876286>

Petrini, C. (2014). Umbilical cord blood banking: from personal donation to international public registries to global bioeconomy. *Journal of Blood Medicine*, 87. <https://doi.org/10.2147/JBM.S64090>

Plonka, A., Urban, I., & Wang, H.-L. (2018). Decision Tree for Vertical Ridge Augmentation. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 38(2), 269–275. <https://doi.org/10.11607/prd.3280>

Ponzetti, M., & Rucci, N. (2021). Osteoblast Differentiation and Signaling: Established Concepts and Emerging Topics. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 6651. <https://doi.org/10.3390/ijms22136651>

Pranskunas, M., Galindo-Moreno, P., & Padiál-Molina, M. (2019). Extraction Socket Preservation Using Growth Factors and Stem Cells: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(3). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10307>

Purwaningrum, M., Jamilah, N. S., Purbantoro, S. D., Sawangmake, C., & Nantavisai, S. (2021). Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, 22(6). <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e74>

Qing, Y., Li, R., Li, S., Li, Y., Wang, X., & Qin, Y. (2020). <p>Advanced Black Phosphorus Nanomaterials for Bone Regeneration</p>. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 2045–2058. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246336>

Rapone, B., Inchingolo, A. D., Trasarti, S., Ferrara, E., Qorri, E., Mancini, A., Montemurro, N., Scarano, A., Inchingolo, A. M., Dipalma, G., & Inchingolo, F. (2022). Long-Term Outcomes of Implants Placed in Maxillary Sinus Floor Augmentation with Porous Fluorohydroxyapatite (Algipore® FRIOS®) in Comparison with Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss®) and Platelet Rich Plasma (PRP): A Retrospective Study. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2491. <https://doi.org/10.3390/jcm11092491>

Rendra, E., Scaccia, E., & Bieback, K. (2020). Recent advances in understanding mesenchymal stromal cells. *F1000Research*, 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21862.1>

Rodríguez-Fuentes, D. E., Fernández-Garza, L. E., Samia-Meza, J. A., Barrera-Barrera, S. A., Caplan, A. I., & Barrera-Saldaña, H. A. (2021). Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*, 52(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>

Rokn, A. R., Labibzadeh, A., Ghohroudi, A. A. R., Shamshiri, A. R., & Solhjoo, S. (2018). Histomorphometric Analysis of Bone Density in Relation to Tactile Sense of the Surgeon During Dental Implant Placement. *The Open Dentistry Journal*, 12(1), 46–52. <https://doi.org/10.2174/1874210601812010046>

Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., & Grigolo, B. (2017). Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>

Sahakyants, T., & Vacanti, J. P. (2020). Tissue engineering: from the bedside to the bench and back to the bedside. *Pediatric Surgery International*, 36(10), 1123–1133. <https://doi.org/10.1007/s00383-020-04722-z>

Santosh, H., & Bose, A. (2019). Stem cells: Redefining the future of dentistry. *International Journal of Oral Health Sciences*, 9(2), 58. [https://doi.org/10.4103/ijohs.ijohs\\_20\\_19](https://doi.org/10.4103/ijohs.ijohs_20_19)

Shanbhag, S., Suliman, S., Pandis, N., Stavropoulos, A., Sanz, M., & Mustafa, K. (2019). Cell therapy for orofacial bone regeneration: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 162–182. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13049>

Shareghi-oskoue, O., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2021). Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells to treat premature ovarian failure. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 454. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02529-w>

Sharma, A. P., & Stringer, D. E. (2019). Autogenous Mandibular Bone Graft for Maxillary Le Fort I Osteotomy Interpositional Gap in Orthognathic Surgery: A Technique Case Series. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 77(5), 1068.e1-1068.e36. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2019.01.039>

Silva-Vargas, V., Delgado, A. C., & Doetsch, F. (2018). Symmetric Stem Cell Division at the Heart of Adult Neurogenesis. *Neuron*, 98(2), 246–248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.04.005>

Starch-Jensen, T., & Becktor, J. P. (2019a). Maxillary Alveolar Ridge Expansion with Split-Crest Technique Compared with Lateral Ridge Augmentation with Autogenous Bone Block Graft: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(4). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10402>

Starch-Jensen, T., & Becktor, J. P. (2019b). Maxillary Alveolar Ridge Expansion with Split-Crest Technique Compared with Lateral Ridge Augmentation with

Autogenous Bone Block Graft: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(4). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10402>

Stumbras, A., Kuliesius, P., Januzis, G., & Juodzbaly, G. (2019). Alveolar Ridge Preservation after Tooth Extraction Using Different Bone Graft Materials and Autologous Platelet Concentrates: a Systematic Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 10(1). <https://doi.org/10.5037/jomr.2019.10102>

Tan, W., Yu, B., Niu, F., & Gui, L. (2019). Mandibular Augmentation With a New Sandwich Osteotomy. *Journal of Craniofacial Surgery*, 30(4), 1314–1317. <https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000005097>

Testori, T., Weinstein, T., Taschieri, S., & Wallace, S. S. (2019a). Risk factors in lateral window sinus elevation surgery. *Periodontology 2000*, 81(1), 91–123. <https://doi.org/10.1111/prd.12286>

Testori, T., Weinstein, T., Taschieri, S., & Wallace, S. S. (2019b). Risk factors in lateral window sinus elevation surgery. *Periodontology 2000*, 81(1), 91–123. <https://doi.org/10.1111/prd.12286>

Tyurin-Kuzmin, P. A., Molchanov, A. Yu., Chechekhin, V. I., Ivanova, A. M., & Kulebyakin, K. Yu. (2020). Metabolic Regulation of Mammalian Stem Cell Differentiation. *Biochemistry (Moscow)*, 85(3), 264–278. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030025>

Uccelli, A., Moretta, L., & Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>

Urban, I. A., & Monje, A. (2019). Guided Bone Regeneration in Alveolar Bone Reconstruction. *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 31(2), 331–338. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2019.01.003>

Urban, I. A., Montero, E., Monje, A., & Sanz-Sánchez, I. (2019). Effectiveness of vertical ridge augmentation interventions: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 46, 319–339. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13061>

Venkei, Z. G., & Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *Journal of Cell Biology*, 217(11), 3785–3795. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807037>

Via, A. G., Frizziero, A., & Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, 2(3), 154–162.

Waechter, J., Leite, F. R., Nascimento, G. G., Carmo Filho, L. C., & Faot, F. (2017). The split crest technique and dental implants: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 46(1), 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2016.08.017>

Weber, F. E. (2019). Reconsidering Osteoconduction in the Era of Additive Manufacturing. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 25(5), 375–386. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0047>

Xie, Q., Liu, R., Jiang, J., Peng, J., Yang, C., Zhang, W., Wang, S., & Song, J. (2020). What is the impact of human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation on clinical treatment? *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 519. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02011-z>

Yorukoglu, A. C., Kiter, A. E., Akkaya, S., Satiroglu-Tufan, N. L., & Tufan, A. C. (2017). A Concise Review on the Use of Mesenchymal Stem Cells in Cell Sheet-Based Tissue Engineering with Special Emphasis on Bone Tissue Regeneration. *Stem Cells International*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/2374161>

Zaki, J., Alnawawy, M., Yussif, N., & Elkhadem, A. (2018). The Effect of Membrane Coverage on the Resorption of Autogenous Intraoral Block Grafts in Horizontal Ridge Augmentation: A Systematic Review of Literature and Meta-Analysis: Inevitability or an Iatrogenic Vulnerability? *Journal of Evidence Based Dental Practice*, 18(4), 275–289. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2017.11.001>

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

Zhang, L., Yang, G., Johnson, B. N., & Jia, X. (2019). Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomaterialia*, 84, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>

Zhao, K., Wang, F., Huang, W., Wang, X., & Wu, Y. (2017). Comparison of Dental Implant Performance Following Vertical Alveolar Bone Augmentation With Alveolar Distraction Osteogenesis or Autogenous Onlay Bone Grafts: A Retrospective Cohort Study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 75(10), 2099–2114. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2017.06.038>

## Anexos

### Re: Request to use your table in my Master Thesis



Bačáková Lucie <Lucie.Bacakova@fgu.cas.cz>

24/05/2022 15:17



Para: Giovanni Giroto

Dear Giovanni, of course, you can use the table.  
Good luck with your thesis!  
With best regards,  
Lucie Bacakova.

Stáhnout [Outlook pro Android](#)

---

**From:** Giovanni Giroto <Gio.Giroto@hotmail.com>  
**Sent:** Tuesday, May 24, 2022 11:28:59 AM  
**To:** [lucie.bacakova@fgu.cas.cz](mailto:lucie.bacakova@fgu.cas.cz) <[lucie.bacakova@fgu.cas.cz](mailto:lucie.bacakova@fgu.cas.cz)>  
**Subject:** Request to use your table in my Master Thesis

Dear Ms Lucie Bacakova

My name is Giovanni Giroto, I am a senior student of Dentistry at Instituto Universitário Egas Moniz, in Portugal. I'm developing my final Master Thesis about Bone Regeneration with mesenchymal stem cells and I would like to ask you if I could use your figure "Sources and potency of stem cells for regenerative therapies" in your article "Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review" on my Thesis.

I would of course reference it accordingly, and would much appreciate it.

Thank you in advance  
Best regards,  
Giovanni.



[World J Stem Cells](#). 2021 Apr 26; 13(4): 260–280.

Published online 2021 Apr 26. doi: [10.4252/wjsc.v13.i4.260](https://doi.org/10.4252/wjsc.v13.i4.260)

PMCID: PMC8080543

PMID: [33959218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33959218/)

## Calcium channels and their role in regenerative medicine

[Nassem Ahamad](#) and [Brij B Singh](#)

▾ [Author information](#) ▸ [Article notes](#) ▾ [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Nassem Ahamad, School of Dentistry, UT Health Science Center San Antonio, San Antonio, TX 78257, United States;

[Contributor Information](#).

Author contributions: Ahamad N and Singh BB wrote and edited this manuscript.

Supported by National Institute of Dental & Craniofacial Research, No. 1R21DE028265-01A1.

Corresponding author: Brij B Singh, PhD, Dean, Full Professor, School of Dentistry, UT Health Science Center San Antonio, 7703, Floyd Curl Dr., San Antonio, TX 78257, United States. [singhbb@uthscsa.edu](mailto:singhbb@uthscsa.edu)

[Copyright](#) ©The Author(s) 2021. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

This article is an open-access article that was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution NonCommercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial.

## RE: Request to use your article's figure on my Master Thesis



Singh, Brij B <SinghBB@uthscsa.edu>

26/05/2022 19:35



Para: Giovanni Girotto

Hi Giovanni,

I am Ok with it, but you need to contact the journal and take permission from the journal staff, as they have the rights for duplication.

Thanks

Brij

---

**From:** Giovanni Girotto <Gio.Girotto@hotmail.com>

**Sent:** Thursday, May 26, 2022 1:12 PM

**To:** Singh, Brij B <SinghBB@uthscsa.edu>

**Subject:** Request to use your article's figure on my Master Thesis

You don't often get email from [gio.girotto@hotmail.com](mailto:gio.girotto@hotmail.com). [Learn why this is important](#)

**\*EXTERNAL EMAIL\***

Dear Mr. Brij Singh

My name is Giovanni Girotto, I am a senior student of Dentistry at Instituto Universitário Egas Moniz, in Portugal.

I'm developing my final Master Thesis about Bone Regeneration with mesenchymal stem cells and I would like to ask you if I could use your figure "Stem cell properties and their types" in your article "Calcium channels and their role in regenerative medicine" on my Thesis.

## Re: Request to use your article's figure on my Master Thesis



Mahboobeh Razmkhah <mrazmkhah2@gmail.com>

27/05/2022 09:40



Para: Giovanni Girotto

Dear Giovanni,

Thank you for your email. No problem if you will get the reference as you mentioned.

Good Luck

Best wishes

MR

---

On Fri, May 27, 2022 at 12:06 AM Giovanni Girotto <[Gio.Girotto@hotmail.com](mailto:Gio.Girotto@hotmail.com)> wrote:

Dear Kangari Parisa

My name is Giovanni Girotto, I am a senior student of Dentistry at Instituto Universitário Egas Moniz, in Portugal.

I'm developing my final Master Thesis about Bone Regeneration with mesenchymal stem cells and I would like to ask you if I could use your figure "Mesenchymal stem cell (MSC) sources and applications" in your article "Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects" on my Thesis.

I would of course reference it accordingly, and would much appreciate it.

Thank you in advance

Best regards

## Re: Request to use your table's on my Master Thesis



Massimo DOMINICI <[mdominici@unimore.it](mailto:mdominici@unimore.it)>

07:35

Para: Giovanni Giroto Cc: [massimo.dominici@unimore.it](mailto:massimo.dominici@unimore.it)

Dear Giovanni,  
Yes, please do so  
Thanks for contacting and good luck for the master and your future  
Best Regards  
Massimo Dominici

From Massimo iPhone

Il giorno 25 lug 2022, alle ore 21:33, Giovanni Giroto <[Gio.Giroto@hotmail.com](mailto:Gio.Giroto@hotmail.com)> ha scritto:

Dear Mr. Massimo Dominici,

My name is Giovanni Giroto, I am a senior student of Dentistry at Instituto Universitário Egas Moniz, in Portugal.  
I'm developing my final Master Thesis about Bone Regeneration with mesenchymal stem cells and I would like to ask you if I could use your table "Summary of Criteria to identify MSC" in your article "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement" on my Thesis.

I would of course reference it accordingly, and would much appreciate it.

Thank you in advance  
Best regards,  
Giovanni.

