



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Células Estaminais na Regeneração Óssea Maxilar

Inês Filipa Violas de Melo

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Gandra, 5 de junho de 2020



CESPU

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Inês Filipa Violas de Melo

Dissertação conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Dentária (Ciclo Integrado)

Células Estaminais na Regeneração Óssea Maxilar

Trabalho realizado sob a Orientação de Professor Doutor Fernando Ferreira

Declaração de Integridade

Eu, acima identificado, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste trabalho, confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri a qualquer forma de falsificação de resultados ou à prática de plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria do trabalho intelectual pertencente a outrem, na sua totalidade ou em partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores foram referenciadas ou redigidas com novas palavras, tendo neste caso colocado a citação da fonte bibliográfica.

Declaração do Orientador

Eu, **Fernando Ferreira**, com a categoria profissional de **Professor Auxiliar** do Instituto Universitário de Ciências da Saúde, tendo assumido o papel de Orientador da Dissertação intitulada *Células Estaminais na Regeneração Óssea Maxilar*, do Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, **Inês Filipa Violas de Melo**, declaro que sou de parecer favorável para que a Dissertação possa ser depositada para análise do Arguente do Júri nomeado para o efeito para Admissão a provas públicas conducentes à obtenção do Grau de Mestre.

Gandra, 31 de maio de 2020

O Orientador

Agradecimentos

Obrigada,

Primeiramente aos meus pais Cristina e Rui Melo, por todo o apoio que me deram não só durante o decorrer deste curso, mas durante toda a minha vida e pelo sacrifício que fizeram para me dar tudo o que podiam, sem eles nunca tinha conseguido. Esta vitória é nossa.

Ao Orlando, pelo carinho e amor que me demonstrou, que esteve sempre do meu lado quando precisei e me deu força quando me faltou.

À minha binómia de curso e muito amiga Inês Gonçalves, os cinco anos de curso sem ela teriam sido muito piores, apoiamo-nos mutuamente sempre que precisamos não só na faculdade como na nossa vida.

Às minhas amigas Catarina Parada e Catarina Barbosa que fizeram com que a faculdade parecesse mais leve com elas ao lado. Partilhamos, as quatro, muitos momentos que não vamos esquecer.

Aos meus amigos do coração que já me acompanham há muitos anos, viram-me crescer e eu a eles.

Um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Doutor Fernando Ferreira, pela disponibilidade e por toda a ajuda na concretização deste trabalho que leva à minha concretização do curso.

E por fim a esta instituição e aos docentes que nos acompanharam durante os cinco anos do curso.

Resumo

O objetivo deste estudo foi realizar uma revisão de literatura integrativa sobre a eficácia das células estaminais na regeneração óssea maxilar e se a sua utilização apresenta vantagens em relação a outros métodos de regeneração. Uma pesquisa foi realizada na base de dados *PubMed* usando a combinação dos termos científicos: *stem cells, bone regeneration, maxillary bone defects, tissue engineering e scaffold*. A pesquisa identificou 171 artigos, dos quais 18 foram considerados relevantes para este estudo. Estes artigos forneceram dados importantes sobre a regeneração óssea maxilar, os tipos de células estaminais usadas, o seu manuseamento e se a sua utilização foi vantajosa. As células estaminais mesenquimais mais usadas foram as BMSC provenientes da crista ilíaca, obtidas maioritariamente por aspiração seguida de centrifugação e a maior parte dos artigos referia uma comparação com um grupo controlo. Na reparação de defeitos ósseos alveolares e periodontais, o volume e a densidade de osso formado estavam aumentados no grupo teste, bem como a sua formação foi mais rápida e a qualidade do osso era melhor. Na regeneração óssea com elevação do seio maxilar, o mesmo se verificou. Podemos concluir que o uso de células estaminais tem vantagens em relação ao uso de material de enxerto isolado. Ainda assim, com a falta de protocolos das técnicas de engenharia tecidual não podemos concluir que esta técnica deva ser usada em vez de outras técnicas de regeneração óssea maxilar.

Palavras-chave: *células estaminais, regeneração óssea, defeitos ósseos maxilares, engenharia tecidual, scaffold.*

Abstract

The aim of this study was to conduct a review of integrative literature on the efficacy of stem cells in maxillary bone regeneration and whether its use has advantages over other regeneration methods. A search was conducted in the PubMed database using the combination of scientific terms: *stem cells*, *bone regeneration*, *maxillary bone defects*, *tissue engineering* and *scaffold*. The research identified 171 articles, of which 18 were considered relevant for this study. These articles provided important data on maxillary bone regeneration, the types of stem cells used, their handling and whether their use was advantageous. The most commonly used mesenchymal stem cells were BMSC from the iliac crest, obtained mostly by aspiration followed by centrifugation and most of the articles referred a comparison with a control group. In the repair of alveolar and periodontal bone defects, the volume and density of bone formed were increased in the test group, as well as their formation was faster and the bone quality was better. In bone regeneration with elevation of the maxillary sinus, the same was verified. We can conclude that the use of stem cells has advantages over the use of isolated graft material. Still, with the lack of protocols of tissue engineering techniques we cannot conclude that this technique should be used instead of other maxillary bone regeneration techniques.

Keywords: *stem cells*, *bone regeneration*, *maxillary bone defects*, *tissue engineering*, *scaffold*.



Índice

1. Introdução	1
2. Objetivo	2
3. Materiais e Métodos	3
4. Resultados da pesquisa bibliográfica	5
5. Discussão	23
5.1 Células estaminais mesenquimais (MSC).....	23
5.1.1 Células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMSC)	23
5.1.1.1 BMSC da crista ilíaca	24
5.1.1.2 BMSC dos ossos orofaciais	24
5.1.2 Células estaminais do tecido dentário.....	25
5.1.3 Células estaminais da mucosa oral.....	26
5.1.4 Células estaminais/progenitoras do periósteo.....	27
5.1.5 Células estaminais do tecido adiposo (ASC)	28
5.2 Propriedades das células estaminais.....	29
5.2.1 Acessibilidade	29
5.2.2 Imunomodulação.....	29
5.3 Fatores que influenciam a terapia de regeneração com células estaminais	29
5.3.1 Sobrevivência das células transplantadas	29
5.3.2 Condições de pré-cultura das células.....	30
5.3.3 Resposta imunológica ao enxerto celular	31
5.4 Banco de células estaminais	31
5.5 Regeneração óssea.....	32
5.6 Células estaminais na regeneração óssea	34
6. Conclusão	37
Bibliografia	39

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Diagrama da seleção de artigos na base de dados PubMed.....</i>	<i>3</i>
<i>Figura 2 Fontes de células estaminais adultas na região oral e maxilofacial.....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 3 Técnicas e componentes da engenharia tecidual na área da regeneração óssea</i>	<i>33</i>

Índice de Tabelas

<i>Tabela 1 Resultados quanto às características celulares e do scaffold.</i>	<i>6</i>
<i>Tabela 2 Resultados referentes à regeneração óssea para reparação de defeitos ósseos alveolares e periodontais.</i>	<i>15</i>
<i>Tabela 3 Resultados referentes à regeneração óssea para elevação do seio maxilar</i>	<i>20</i>

Abreviaturas

MSC – Células estaminais mesenquimais

BMSC – Células estaminais mesenquimais da medula óssea

DPSC – Células estaminais mesenquimais da polpa dentária

PDLSC – Células estaminais mesenquimais do ligamento periodontal

ASC – Células estaminais mesenquimais do tecido adiposo

SHED – Células estaminais de dentes decídu

os extraídos

DFSC – Células estaminais mesenquimais do folículo dentário

GMSC – Células estaminais mesenquimais da gengiva

SCAP – Células estaminais da papila apical

TGPC – Células progenitoras do gérmen dentário

iPSC – Células estaminais pluripotentes induzidas

BFP – Corpo adiposo da bochecha/Bucal fat pad

HA/TCP – Hidroxiapatita/Tricálcio Fosfato

β -TCP – β -Tricálcio Fosfato

BMP – Proteína morfogenética óssea

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's medium

IMEM – Iscove's Modified Dulbecco's medium

1. Introdução

O processo irreversível da reabsorção do osso alveolar apresenta-se como um desafio para a colocação de implantes.(1,2) Esta reabsorção pode ser causada por remodelação do osso por trauma(3–8), infeção(4,5,7), extração de dentes(3,4,6,8–10), doença periodontal(3,11,12) ou doenças congénitas. (3,6–8)

Em consequência destes processos ocorre uma perda óssea severa, e um volume de osso inadequado para restaurar estes espaços com substitutos dentários funcionais e estéticos. Nestes casos, é necessária a reconstrução óssea alveolar seguida de reabilitação protética para restabelecer a forma, função e estética destas regiões.(6,8)

Para a reconstrução óssea alveolar, o osso autógeno, colhido de locais intraorais ou extraorais, tem sido a principal escolha na regeneração óssea devido às suas propriedades osteogénicas, osteocondutoras e osteoindutoras.(1,2,9,13–16) Este osso produz uma revascularização e integração total do enxerto, bons resultados funcionais(4) e apresenta riscos mínimos de rejeição(2,4,15). Contudo, uma grande desvantagem do enxerto autógeno é a necessidade de um segundo local cirúrgico que leva a morbidez pós-operatória.(4,5,18,19,7,8,10,13–17) Outras desvantagens do seu uso são a quantidade insuficiente(3,5,7–9,13,14) e a reabsorção depois de um longo período.(3,13) O osso autógeno pode ser colhido da tuberosidade maxilar(4,9), sínfise mandibular(4,9,17) e região posterior da mandíbula(4), ramo(4,9,17) e área retromolar(4). Quando não está disponível na zona intraoral, zonas extraorais como a crista ilíaca(4,9,13,17), a tíbia, o fémur(4) e as costelas(4,9) também podem ser considerados. A incapacidade de conseguir obter o enxerto autógeno leva os clínicos a considerar o aloenxerto ou o xenoenxerto.(4,5,13,14,17) Estes materiais osteocondutores são desprovidos de células, fatores de crescimento(8,13,14), requerem longos tempos de integração(14) e o tempo de cicatrização é mais longo quando comparado com o osso autógeno.(13)

Nos últimos anos, técnicas de engenharia tecidual têm usado células estaminais mesenquimais em combinação com um *scaffold* osteocondutor como material de enxerto.(7,14) Esta abordagem foi identificada como uma alternativa promissora ao enxerto com osso autógeno.(10,19)

A terapia tecidual normalmente refere-se à colheita de células estaminais multipotentes de uma fonte autóloga, como a medula óssea, e a sua subsequente cultura e expansão *in vitro* para fornecer um número adequado destas células para a regeneração do tecido perdido.(5,9,10,14)

Estas células estaminais são dependentes de duas propriedades: autorrenovação e pluripotência. A autorrenovação é a capacidade das células de se dividir enquanto mantêm um estado de indiferenciação, a pluripotência é a capacidade de se diferenciar numa variedade de células maduras. Na vida pós-natal as células estaminais passam a ser multipotentes, o que significa uma diferenciação em múltiplos, mas limitados tipos de células.(10,13)

De acordo com a engenharia tecidual, o substituto do osso deve ter características biológicas e morfológicas o mais semelhantes possível com o osso autógeno e a fabricação do enxerto ósseo ideal requer a manipulação de 3 componentes essenciais: células osteogénicas, fatores de crescimento e *scaffolds* osteocondutores.(1,5,13) Em particular, a terapia tecidual tem como objetivo alcançar a regeneração óssea, sem usar osso autógeno de zonas extra, a partir de *scaffolds* semeados com células osteogénicas.(13) Estas células adultas não possuem preocupações éticas, o que faz delas o tipo de células preferencial na medicina regenerativa.(1,13)

2. Objetivo

As células estaminais usadas em conjunto com *scaffolds* na engenharia tecidual apresentam-se como um método mais eficaz na regeneração óssea maxilar que os métodos mais utilizados atualmente?

3. Materiais e Métodos

Foi feita uma pesquisa abrangente da literatura na base de dados *PubMed* (via *NATIONAL LIBRARY of MEDICINE*), a partir de 2015 até dezembro de 2019, que incluía artigos com referência da ação das células estaminais na regeneração óssea maxilar, usando as combinações de palavras: "stem cells" AND "bone regeneration" AND "maxillary bone defects", "bone marrow stem cells" AND "mesenchymal" AND "maxillary bone regeneration", "stem cells" AND "maxillary bone regeneration" AND "tissue engineering", "stem cells" AND "scaffold" AND "maxillary bone regeneration" e "stem cells" AND "implants" AND "maxillary bone regeneration".

Os critérios de seleção da pesquisa de artigos incluíam ensaios clínicos (*clinical trials*) e revisões sistemáticas publicados em inglês. A seleção da literatura incluía ensaios clínicos em animais e humanos. O título e o resumo dos artigos identificados foram submetidos a uma avaliação preliminar para determinar se atendiam aos critérios de inclusão. Em seguida, os artigos selecionados foram lidos na íntegra e analisados consoante o objetivo do estudo.

Através de uma pesquisa manual foram analisados mais 8 artigos de interesse para o trabalho, dando um total de 26 artigos analisados na íntegra.

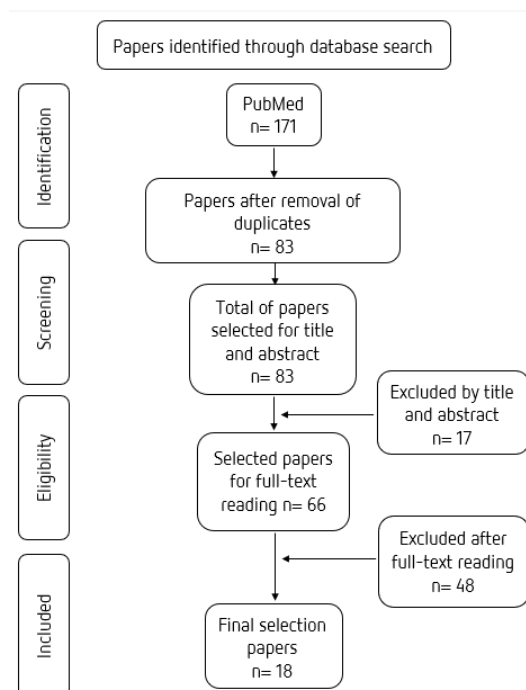


Figura 1 Diagrama da seleção de artigos na base de dados PubMed

4. Resultados da pesquisa bibliográfica

A pesquisa bibliográfica identificou um total de 171 artigos na plataforma *PubMed* como mostrado na Fig. 1. Depois de ler os títulos e os *abstracts* dos artigos, 17 foram excluídos porque não atendiam aos critérios de inclusão. Os restantes 66 artigos potencialmente relevantes foram lidos na íntegra. Desses artigos, 48 foram excluídos porque não forneceram dados relevantes para o presente estudo. Assim, 18 artigos foram incluídos nesta revisão.(2,3,16–23,6–8,10–12,14,15)

Dos 18 artigos selecionados, 11(7,8,22,10–12,16,18–21) (61,1%) investigavam a regeneração óssea usando células estaminais na reparação de defeitos ósseos alveolares e periodontais e 7(2,3,6,14,15,17,23) (38,9%) avaliavam a regeneração óssea na elevação do seio maxilar.

Os resultados mais relevantes indicam que:

Quanto às características celulares e do *scaffold* exibidas nos artigos selecionados:(2,3,16–23,6–8,10–12,14,15)

- Dos 18 artigos, 12(3,6,22,23,7,8,10,12,14,18–20) (66,7%) referiram a utilização de BMSC na regeneração óssea, sendo que 10(3,6,8,12,14,18–20,22,23) (83,4%) artigos referem a sua proveniência da crista ilíaca, 1(10) (8,3%) da tíbia e fêmur e outro(7) (8,3%) da mandíbula. 4(2,15,17,21) (22,2%) artigos utilizaram as ADSC, sendo a sua origem a parede abdominal em 3(2,15,17) (75%) artigos e o tecido adiposo da bochecha em 1(21) (25%) artigo. Também foram utilizadas as DPSC de dentes decíduos num artigo(16) (5,55%) e as iPSC.noutro artigo(11) (5,55%).
- Quanto ao método de obtenção destas células, 7(6,8,14,19,20,22,23) (38,9%) artigos usaram o método de aspiração e centrifugação, 3(3,12,18) (16,7%) usaram apenas o método de aspiração, 2(17,21) (11,1%) artigos o método de lipoaspiração, 2(2,15) (11,1%) combinaram a lipoaspiração com centrifugação, 2(7,10) (11,1%) artigos utilizaram a fragmentação do osso, 1(16) (5,55%) utilizou a extirpação de células da polpa e 1(11) (5,55%) artigo não mencionou a sua metodologia de colheita das células.
- Comparando o meio de cultura utilizado, 9(8,11,14,15,17–20,22) (50%) artigos não utilizaram meio de cultura para o crescimento das células, 6(3,7,10,11,21,23) (33,3%) artigos referenciaram a utilização de meio de cultura DMEM, 1(16) (5,55%) artigo usou

- meio de cultura RPMI, 1(6) (5,55%) usou meio de cultura IMDM e outro(12) (5,55%) usou α -MEM.
- Dos 18 artigos, 3(7,21,23) (16,7%) artigos referenciaram o número de passagens no meio de cultura (2-3 passagens) e 15(2,3,17-20,22,6,8,10-12,14-16) (83,3%) artigos não mencionaram o número de passagens.
 - Verificamos também se as células foram modificadas por diferenciação osteogénica, 5(7,11,16,21,23) (27,8%) artigos referiram esta diferenciação, sendo que a maior parte dos artigos usava como suplementação dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato e 13(2,3,19,20,22,6,8,10,12,14,15,17,18) (72,2) artigos não referiram o uso de diferenciação osteogénica.
 - Quanto ao tipo de *scaffold* utilizado, 5(18) (27,8%) artigos referiram o uso de materiais aloplásticos, sendo 4(2,3,6,17) (80%) deles β -TCP e 1(18) (20%) PCL, 4(8,19,21,23) (22,2%) artigos utilizaram xenoenxertos, 2(14,15) (11,1%) artigos usaram aloenxertos e 4(7,11,12,16) (22,2%) artigos utilizaram materiais naturais. 3(10,20,22) (16,7%) artigos não mencionaram o uso de *scaffold*.
 - Analisando o número de células implantadas no *scaffold*, o valor variou entre os 4×10^4 e os 50×10^6 , 5(3,6,18,20,22) (27,8%) artigos não referiram quantidades de células. Estas células foram cultivadas no *scaffold* previamente à implantação entre 5 minutos a 48 horas, sendo que 4(2,6,15,17) (22,2%) artigos referiram 30 minutos como tempo de cultura das células no *scaffold* e 3(11,12,21) (16,7%) artigos mencionaram 48 horas. 6(8,10,14,19,20,22) (33,3%) artigos não faziam referência ao tempo de cultura das células nos materiais de enxerto.
 - Dos artigos selecionados, 5(11,14,15,22,23) (27,8%) artigos usaram fatores de crescimento e 13(2,3,19-21,6-8,10,12,16-18) (72,2%) artigos não mencionaram o seu uso.
 - Por fim, 14(2,3,17,19,22,23,6,8,10-12,14-16) (77,8%) artigos usaram como comparação um grupo de controlo e 4(7,18,20,21) (22,2%) artigos não referiram usar grupo de controlo.

Tabela 1 Resultados quanto às características celulares e do *scaffold*.

Autor (Ano)	(Estudo animal/humano) Propósito	Tipo de células estaminais usadas	Método de obtenção das células	Método de cultura utilizado	Número de passagens	Se existiu diferenciação osteogénica Meio de cultura utilizado	Tipo de scaffold utilizado	Quantidade de células por scaffold	Quanto tempo foram cultivadas as células no scaffold	Utilização de fatores de crescimento/PRP/PRF...	Grupo de controlo
Ahn et al., (2018)	(Humano) Regeneração de um defeito alveolar tratado com um scaffold 3D paciente-específico (PCL reabsorvível semeado com BMSC da crista ilíaca)	BMSC da crista ilíaca	Aspiração	----	----	----	PCL impresso em 3D	----	20 minutos	----	----
Bertolai et al., (2016)	(Humano) Testar a hipótese de que o enxerto de BMMSCs e PRP autólogos pode levar ao aumento da regeneração óssea e ao tempo de cicatrização reduzido	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	----	----	----	----	----	----	PRP	Ausência de células estaminais
Colangeli et al., (2018)	Estudo em pacientes que realizaram biopsias de lesões maxilares seguido de regeneração óssea	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	----	----	----	----	----	----	----	----

Khojasteh et al., (2018)	(Humano) Aplicação clínica de ADSC derivadas do corpo adiposo da bochecha (BFP) em combinação com a regeneração óssea guiada (GBR) para reconstrução de defeitos alveolares de grandes dimensões devido a extração de múltiplos dentes impactados	ADSC do SVF	Lipoaspiração do tecido adiposo da bochecha	Meio de cultura DMEM e 10% de sêrum humano autógeno	3	Sim	Xenoenxerto NBBM particulado	10 ⁵	48 horas	-----	-----
Mashimo et al., (2019)	(Animal) Avaliação da eficácia da transplantação de BMMSC no alvéolo pós extração dentária para remodelação óssea	BMSC da tíbia e fêmur de ratos	Fêmur e tíbia são dissecados e esmagados em fragmentos	Meio de cultura DMEM, 0,2% de collagenase. Centrifugação. Meio de cultura DMEM, 10% FBS, 1% de penicilina/ Estreptomicina.	-----	-----	-----	4x10 ⁴	-----	-----	Ausência de células
Jahanbin et al., (2016)	(Animal) Aplicação de DPSC de dentes decíduos humanos para reconstrução de defeitos alveolares em ratos e examinação do potencial de regeneração	DPSC de dentes decíduos humanos	Extração do 2º molar decíduo anquilosado. Células extraídas da polpa por método enzimático (solução de 2mg/mL de collagenase tipo 1, 2mg/mL de dispase + Centrifugação	Meio de cultura RPMI, 15% de sêrum bovino fetal, 100u/mL de penicilina, 100mg/mL estreptomicina, 2mM de Lglutamina e 2mM de aminoácidos não essenciais	-----	Meio de cultura suplementado com 100nM de dexametasona, 5µM de ácido ascórbico, 0,5mM de β-glicerofosfato e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100mg/mL de estreptomicina)	Membrana de Colagénio	10 ⁶	24 horas	-----	Enxerto de osso autógeno da crista ilíaca ou membrana de colagénio sozinha

Pelegrin et al., (2016)	(Humano) Avaliação da reconstrução da maxila anterior atrófica usando enxertos particulados com ou sem concentrado de medula óssea aspirado (BMAC)	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	-----	-----	-----	Xenoenxerto particulado	4mL	-----	-----	Xenoenxerto particulado
Redondo et al., (2017)	(Humano) Tratamento de quistos maxilofaciais com BMSC autólogas expandidas numa matriz 3D	BMSC da mandíbula	Biopsia óssea + Fragmentação	Meio de cultura DMEM, 10%FBS, 100u/mL de penicilina, 100u/mL estreptomomicina	3	DMEM, 10%FBS, 100u/mL de penicilina, 100u/mL estreptomomicina + 0,1 µM de dexametasona, 50µM de ácido ascórbico e 10µM de β-glicerofosfato	Sérum de sangue venoso	5-10 milhões/disco	24 horas	-----	-----
Valdivia et al., (2017)	(Humano) Tratamento de defeitos ósseos mandibulares com BMSC e xenoenxerto em bloco	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	-----	-----	-----	Xenoenxerto em blocos	10mL	-----	-----	Xenoenxerto sem células estaminais
Bertolai et al., (2015) 5	(Humano) Testar a hipótese de que a combinação de FDDB com MSC e PRP autólogos leva ao aumento da regeneração óssea e diminui o tempo de cicatrização, reproduzindo o desempenho do osso autólogo	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	-----	-----	-----	Aloenxerto FDDB	15mL	-----	PRP	Aloenxerto FDDB sem células estaminais

Farré-Guasch et al., (2018)	(Humano) Mostrar a viabilidade, segurança e potencial eficácia do uso de implantes com o uso de scaffold de cálcio-fosfato com ADSC em SVF isolado	ADSC da SVF	Lipoaspiração da parede abdominal	-----	-----	-----	β-TCP	2x10 ⁵	30 minutos	-----	β-TCP sem células estaminais
Kaigler et al., (2015)	(Humano) Determinar se as BMSC são seguras e eficazes no tratamento de deficiências ósseas de grande dimensão da maxila edêntula	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	Meio de cultura IMDM, 10% FBS, 10% sêrum de cavalo e 5μM de hidrocortisona	-----	-----	β-TCP	-----	30 minutos	-----	β-TCP sem células estaminais
Katagiri et al., (2015)	(Animal) Examinar a eficácia das MSC na elevação do seio maxilar usando um modelo animal para testar a viabilidade e osteocondutividade para futuro uso clínico	BMSC da crista ilíaca	Aspiração	Meio de cultura DMEM com 50 mL/L de suplemento de crescimento de células mesenquimais, 10% de FBS, 10mL de L-glutamina e 0,5mL de mistura de penicilina e estreptomicina	-----	-----	β-TCP	-----	5 minutos	-----	β-TCP + PBS

Prins et al., (2016)	(Humano) Investigação da viabilidade, segurança e eficácia da combinação de scaffold de cálcio-fosfato com SVF autólogo, no procedimento cirúrgico na elevação do seio maxilar	ADSC da SVF	Lipoaspiração da parede abdominal + Centrifugação	-----	-----	-----	β-TCP	20x10 ⁶	30 minutos	-----	β-TCP sem células estaminais
Solakoglu et al., (2019)	(Humano) Se a combinação de ADSC autólogas não modificadas, PRGF-2 e um scaffold osteoindutivo é superior à combinação de PRGF-2 e scaffold osteoindutivo na regeneração óssea guiada (GBR)	ADSC da SVF	Lipoaspiração da parede abdominal + Centrifugação	-----	-----	-----	Aloenxerto MCBPA	50x10 ⁶	30 minutos	PRGF-2	Aloenxerto + PRGF-2
Wang et al., (2017)	(Animal) Comparação do efeito de fatores de crescimento concentrados (CGFS)/Bio-oss®, BMSC/Bio-Oss® e Bio-Oss® sozinho na regeneração óssea na elevação do seio maxilar num modelo canino.	BMSC da crista ilíaca	Aspiração + Centrifugação	Meio de cultura DMEM, 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina	2	Meio de cultura DMEM, 10% FBS, 50μM de ácido ascórbico, 0,1μM de dexametasona, 10mM de β-glicerofosfato de sódio e 1% de penicilina/estreptomicina	Xenoenxerto Bio-Oss®	2x10 ⁶ cél/mL	4 horas	CGFs (Fatores de crescimento concentrados)	Bio-Oss® sozinho, Bio-Oss® + CGFs

Chien et al., (2018)	(Animal) Terapêutica de regeneração periodontal in vivo que consiste na combinação de iPSCs, hidrogel e BMP-6	iPSC de fibroblastos retirados de ratos	-----	Meio de cultura DMEM, 15% de FBS, 100mM de aminoácidos não essenciais, 0,55mM de 2-mercaptoetanol e antibióticos	----	DMEM, 15% de FBS 50µg/mL de ascorbato-2-fosfato, 10nmol/L de dexametasona e 10mmol/L de β-glicerofosfato	Hidrogel	4,8x10 ⁵	48 horas	BMP-6	Hidrogel sozinho, hidrogel + BMP-6
Liu et al., (2016)	(Animal) Avaliação da eficácia da regeneração periodontal num defeito alveolar em cães usando scaffolds CH com infiltração de BMSC	BMSC da crista ilíaca	Aspiração	Meio de cultura α-MEM	-----	-----	Hidroxiapatita-α-colagénio (CH)	2x10 ⁵ cél/mL	48 horas	-----	Ausência de scaffold, CH sem células estaminais

Na regeneração óssea para reparação de defeitos ósseos alveolares e periodontais:

- Dos 11 artigos selecionados, 3(11,12,16) (27,3%) artigos mencionaram a realização dos defeitos ósseos anteriormente ao procedimento de regeneração óssea e 8(7,8,10,18–22) (72,7%) artigos referiram que os defeitos ósseos já estavam presentes.
- Quanto à localização dos defeitos ósseos, a maxila foi referida em 6(8,10,11,16,18,19) artigos (54,5%) e a mandíbula em 1(7) artigos (9,1%), sendo que alguns artigos mencionavam tanto a maxila como mandíbula (4(12,20–22) artigos (36,4%)).
- Verificamos também se os artigos utilizavam design *split-mouth*, 9(7,10,11,16,18–22) (81,8%) artigos não utilizaram esta técnica e 2(8,12) (18,2%) artigos mencionaram a sua utilização.
- Comparando os diâmetros dos defeitos ósseos, os valores variaram entre os 5mm e os 6cm e 4(8,10,18,19) (36,4%) artigos não referenciaram o diâmetro dos defeitos.
- 3(8,19,21) (27,3%) artigos realizaram reabilitação protética com implantes entre os 4-12 meses posteriormente à cirurgia de regeneração óssea, 8(7,10–12,16,18,20,22) (72,7%) artigos não realizaram esta reabilitação.
- Analisando os exames complementares de diagnóstico realizados, 4(7,18,21,22) (36,4%) artigos realizaram ortopantomografia, 7(7,8,18–22) (63,6%) artigos realizaram CBCT, 8(8,10–12,16,19,21,22) (72,7%) artigos realizaram exame histológico, 3(7,8,19) (27,3%) artigos realizaram biopsias ósseas e 3(10–12) (27,3%) artigos realizaram *Micro-CT* para observar os resultados do procedimento de regeneração óssea efetuado anteriormente.
- Os artigos selecionados acompanharam os estudos num período entre as 6 semanas e 48 meses.
- Quando comparados os resultados dos grupos testes (contendo células estaminais) com os grupos controlo nos artigos selecionados, 5(7,8,18,20,21) (45,5%) artigos referiram que os grupos teste tinham maior densidade óssea, 4(11,12,19,20) (36,4%) artigos referiram que o osso regenerado do grupo teste apresentava maior volume mas 2(12,19) (18,2%) deles mencionaram que esta diferença não era significativa, 3(10,16,22) (27,3%) artigos mencionaram que a formação do osso era mais rápida, 2(11,16) (18,2%) indicaram que também a quantidade de osso formado era maior, este osso também se apresentava mais mineralizado e mais maduro em 3(8,10,12) (27,3%) artigos, era mais vascularizado (2(12,21) (18,2%) artigos) e que a sua cicatrização acontecia mais

rapidamente em 2(10,22) (18,2%) artigos. O grupo controlo contrariamente ao grupo teste era mencionado em 4(8,11,12,16) (36,4%) artigos com formação de tecido conjuntivo fibroso e num(8) (9,1%) artigo com partículas de material de enxerto visíveis. 1(8) (9,1%) artigo mencionou que no mesmo período as partículas desse material de enxerto, no grupo teste, não eram visíveis.

- Nos resultados dos artigos que mencionaram regeneração periodontal, todos eles (2(11,12) (18,2%) artigos) mencionaram que no grupo teste o cimento, o osso alveolar e o ligamento periodontal se formaram mais rapidamente quando comparado com o grupo controlo e que a sua formação era mais organizada. Quando comparada a quantidade de osso formado, 1(12) (9,1%) artigo referiu que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

Tabela 2 Resultados referentes à regeneração óssea para reparação de defeitos ósseos alveolares e periodontais.

Autor (Ano)	Se realizou defeito ósseo	Localização do defeito ósseo	Design split-mouth	Diâmetro dos defeitos ósseos	Reabilitação protética (quanto tempo depois)	Exames complementares realizados	Tempo de acompanhamento	Diferenças entre o controlo e o teste
Ahn et al., (2018)	Não	Zona dos pré-molares, 2º quadrante	Não	-----	-----	ORTO, CBCT	6 meses	Novo osso formado que ocupou 45% do espaço do defeito ósseo; Densidade mineral do novo osso 604HU e osso circundante 806HU.
Bertolai et al., (2016)	Não	Maxila ou mandíbula	Não	Superior a 3cm	-----	ORTO, CBCT, exame histológico	24 meses	Após 12 meses ossificação de 85-90% dos defeitos da mandíbula (metade do tempo comparado com o controlo) e perda de osso vestibular nos defeitos maxilares; Exame histológico mostrou formação de novo osso completa; Cicatrização óssea mais rápida que o grupo controlo
Chien et al., (2018)	Sim	Zona do 1º molar, na maxila	Não	6mm	-----	Micro-CT, exame histológico	6 semanas	Maior quantidade de tecidos ósseos formados e maior volume ósseo no grupo com células estaminais; Este osso também era muito mais trabecular; O grupo com as células estaminais também mostrou capacidade de formação de novo cemento e novo ligamento periodontal, ao contrário dos grupos controlo (formação de tecido conjuntivo)

Colangeli et al., (2018)	Não	Maxila ou mandíbula	Não	Superior a 2cm ³	-----	CBCT	6 meses	Volume de novo osso formado com média de 2,44cm ³ ; Densidade de osso trabecular muito alta (média de 1137HU)
Jahanbin et al., (2016)	Sim	Zona anterior da maxila	Não	7mm	-----	Exame histológico	6 semanas	Máximo formação de novo osso foi no grupo teste e quantidade aumentada de tecido conjuntivo fibroso do controlo com scaffold sozinho
Khojasteh et al., (2019)	Não	Maxila e mandíbula	Não	Superior a 6cm	Sim – 6/12 meses depois	ORTO, CBCT, exame histológico.	10 meses 48 meses	Caso 1-Boa adaptação do substituto ósseo, com tecido ósseo denso e trabeculado e bem vascularizado aos 7 meses; Osteointegração dos implantes aos 10 meses. Caso 2- Igual ao caso 1, mas osteointegração aos 48 meses.
Liu et al., (2016)	Sim	Zona dos segundos pré-molares	Sim	5mm	-----	Micro-CT, exame histológico	6 meses	Aos 3 meses formação de novo osso alveolar, ligamento periodontal e cimento foi visível no grupo teste e no grupo de scaffold, o grupo controlo apresentou quantidade de novo osso diminuída e formação de tecido conjuntivo. Aparecimento de vasos sanguíneos rodeados de osteoblastos e ligamento periodontal bem organizado no grupo teste. Aos 6 meses o novo osso era mineralizado e completamente maduro e havia completa separação entre as 3 camadas de osso alveolar, ligamento periodontal e cimento no grupo teste. Na altura de novo osso, o grupo teste teve resultados mais altos que o grupo

								de scaffold, mas não significativo. O mesmo aconteceu no novo cimento. Neste caso as células estaminais não aumentaram a regeneração periodontal em comparação com o grupo de scaffold.
Mashimo et al., (2019)	Não	Zona dos primeiros molares, 1º quadrante	Não	-----	-----	Micro-CT, exame histológico	6 semanas	Às 6 semanas os tecidos moles cicatrizaram mais rápido no grupo teste, mas nada estatisticamente significativo. A formação de novo osso ocupou o alvéolo na totalidade no grupo teste às 2 semanas e no grupo controlo às 3 semanas.
Pelegrine et al., (2016)	Não	Zona anterior da maxila	Não	-----	Sim – 4 meses depois	CBCT, biópsias ósseas, exame histológico	8 meses	Tanto aos 4 meses como aos 8 meses a largura do osso foi maior no grupo controlo, mas não estatisticamente significativo. O grupo teste contém mais tecido mineralizado que o grupo controlo e menos tecido não mineralizado.
Redondo et al., (2018)	Não	Zona posterior da mandíbula	Não	2-4cm	-----	ORTO, CBCT, biópsias ósseas	8 meses	A densidade óssea após 7 meses de cirurgia foi estatisticamente significativamente maior que no grupo controlo.
Valdivia et al., (2017)	Não	Zona posterior da maxila	Sim	-----	Sim – 7 meses depois	CBCT, biópsias ósseas, exame histológico	7 meses	Grupo teste apresentava uma superfície mais compacta de novo osso, sem presença de material de enxerto. O grupo controlo apresentava uma superfície irregular e com partículas de enxerto ainda visíveis. O grupo controlo apresentava formação de novo osso pouco uniforme rodeado com tecido conjuntivo. Maior presença de osteócitos.

Na regeneração óssea para elevação do seio maxilar:

- Dos 7 artigos selecionados, a altura do osso antes da cirurgia de elevação do seio maxilar variou entre 3-8mm, sendo que 3(3,17,23) (42,9%) artigos não fizeram menção à altura inicial do osso.
- 5(2,3,14,15,17) (71,4%) artigos usaram o design *split-mouth* para a comparação das técnicas e 2(6,23) (28,6%) artigos não usaram esta técnica.
- A execução de reabilitação protética com implantes foi realizada em 5(2,6,14,15,17) (71,4%) artigos num período posterior à cirurgia de 3 meses a 1 ano. 2(3,23) (28,6%) artigos não reabilitaram proteticamente depois da cirurgia.
- Quando foi comparada a sobrevivência dos implantes entre os grupos de teste e os grupos de controlo, nenhum artigo fez referência a este parâmetro.
- Analisando os exames complementares de diagnóstico realizados, 4(2,6,14,15) (57,1%) artigos referenciaram a realização de ortopantomografia, 4(2,6,14,23) (57,1%) artigos realizaram CBCT, 5(2,6,14,15,17) (71,4%) artigos mencionaram a realização de biopsias ósseas, que foram realizadas entre 3 meses a 1 ano após a cirurgia, 6(3,6,14,15,17,23) (85,7%) artigos realizam exames histológicos e 3(2,6,23) (42,9%) artigos realizaram *Micro-CT* para observação dos resultados referentes à cirurgia efetuada.
- Apenas 1(6) (14,3%) artigo mencionou a altura final do osso após a cirurgia (17mm).
- Os artigos selecionados acompanharam o estudo num período entre as 8 semanas e os 3 anos.
- Quando comparados os resultados dos grupos testes (contendo células estaminais) com os grupos controlo nos artigos selecionados para elevação do seio maxilar, 4(3,6,15,23) (57,1%) artigos referenciaram que a quantidade de osso formada foi maior no grupo teste e 1(2) (14,3%) artigo referiu que não houve diferenças estatisticamente significativas entre grupos na quantidade de osso. 3(2,17,23) (42,9%) artigos mencionaram que o volume ósseo foi maior no grupo teste, que o osso se apresentou mais denso em 2(6,15) (28,6%) artigos, também 2(3,14) (28,6%) artigos mencionaram que o osso era mais mineralizado e maduro e 1(17) (14,3%) artigo indicou que o osso era mais vascularizado, mas sem diferenças estatisticamente significativas. 1(3) (14,3%) artigo referiu que a formação de osso foi mais rápida no grupo teste e outro(15) (14,3%)

artigo mencionou que o osso regenerado no grupo teste tinha maior densidade de células. O grupo controlo contrariamente ao grupo teste apresentava-se, em 2(14,15) (28,6%) artigos, com formação de tecido conjuntivo fibroso e em 3(3,14,15) (42,9%) artigos o material de enxerto era visível em partículas. No grupo teste, 1(3) (14,3%) artigo referiu que no mesmo período o material de enxerto já não era visível.

- 1(23) (14,3%) artigo comparou a quantidade de osso formado no grupo teste e num grupo que continha fatores de crescimento, a quantidade de osso foi semelhante nestes grupos.

Tabela 3 Resultados referentes à regeneração óssea para elevação do seio maxilar

Autor (Ano)	Altura inicial do osso	Design split-mouth	Reabilitação protética (quando tempo depois)	Sobrevivência dos implantes (Teste VS Controlo)	Exames complementares	Altura final do osso (quanto tempo depois)	Tempo de observação do estudo	Diferenças entre o Controlo e o Teste
Bertolai et al., (2015)	Inferior a 5mm	Sim	Sim – 3 meses depois	-----	ORTO, CBCT, biopsias ósseas (3 meses), exame histológico	-----	3 meses	Grupo controlo apresenta partículas de enxerto visíveis, pouca formação de novo osso e muito tecido conjuntivo fibroso. (ação apenas osteocondutora) O grupo teste apresenta o enxerto incorporado no osso recém-formado sem presença de tecido conjuntivo
Farré-Guash et al., (2018)	-----	Sim	Sim – 6 meses depois	-----	Biopsias ósseas (6 meses), exame histológico	-----	9 meses	Maior volume ósseo total em 80% do grupo teste comparado com o controlo e maior quantidade de vasos sanguíneos, mas não com diferença significativa
Kaigler et al., (2015)	Inferior a 5mm	Não	Sim – 4 meses depois	-----	ORTO, CBCT, Micro-CT, biopsias ósseas (4 meses), exame histológico	Média de 17mm	6 meses	Não houve diferenças significativas na altura radiográfica do osso pós-cirurgia entre os 2 grupos. Grupo controlo mostrou que quanto maior o defeito e a quantidade de scaffold usado, menor a qualidade e densidade do osso formado. O contrário ocorreu no grupo teste, mostrando que a qualidade e densidade do osso era muito maior.

Katagiri et al., (2015)	-----	Sim	Não	-----	Exame histológico	-----	8 semanas	A quantidade de osso formado foi sempre maior no grupo teste no que no grupo controlo. Às 2 semanas todo o material de enxerto tinha sido substituído por novo osso, às 4 semanas o novo osso maduro ocupava a cavidade na sua totalidade no grupo teste. No grupo controlo, às 4 semanas o novo osso formado era muito diminuído e imaturo e as partículas de enxerto permaneceram, mas às 8 semanas o osso já ocupava a totalidade da cavidade e era maduro.
Prins et al., (2016)	Inferior a 8mm	Sim	Sim – 6 meses depois	-----	ORTO, CBCT, biopsias ósseas (6 meses), Micro-CT	-----	2,5 anos	Comparando a altura radiográfica o grupo controlo obteve maior altura de osso que o grupo teste, mas não estatisticamente significativo. O exame micro-CT mostrou que a percentagem BV/TV era maior no grupo teste e que a percentagem GV/TV era maior no grupo controlo, com diferenças estatisticamente significativas.
Solakoglu et al., (2019)	3mm	Sim	Sim – 1 ano depois	-----	ORTO, biopsias ósseas (6 meses, 1 ano), exame histológico	-----	3 anos	Na biopsia retirada aos 6 meses o grupo controlo apresentava mais fragmentos de enxerto, mais tecido fibroso e menos densidade celular, ao contrário do grupo teste que continha grandes quantidades de células e condensações osteogénicas (osteoblastos). Na biopsia retirada passado 1 ano os resultados eram similares, mas menos fragmentos de enxerto e mais novo osso formado que deixou se ser esponjoso e passou a ser lamelar no grupo controlo. O grupo teste resultou numa maior quantidade de osso formado quando comparado com o grupo controlo.

Wang et al., (2017)	-----	Não	Não	-----	CBCT, Micro-CT, exame histológico	-----	6 meses	<p>A quantidade de novo osso formado foi semelhante no grupo teste e no grupo dos fatores de crescimento, mas maior que no grupo controlo. O mesmo aconteceu quando comparada a percentagem BV/TV. Também a dureza estava mais aumentada nestes dois grupos que no grupo controlo com enxerto sozinho, isto pode significar que o osso nestes grupos é mais maduro. A quantidade de fragmentos de material de enxerto era maior no grupo que continha enxerto apenas</p>
---------------------	-------	-----	-----	-------	-----------------------------------	-------	---------	--

5. Discussão

5.1 Células estaminais mesenquimais (MSC)

As MSC estão entre as células estaminais mais promissoras na aplicação clínica.(24) Originalmente foram descobertas na medula óssea, mas posteriormente descobriu-se a sua presença noutros tecidos como a pele, o tecido adiposo e tecidos dentários.(24)

Células estaminais adultas ou células estaminais mesenquimais pluripotentes, derivadas de diferentes tecidos adultos, têm capacidade de autorrenovação e proliferação, que se corretamente estimuladas conseguem diferenciar-se em linhagens de células específicas.(13,22)

De acordo com o ISCT (Sociedade Internacional de Terapia Celular), as MSC devem aderir ao meio de cultura quando mantidas em condições de cultura standard, devem expressar as proteínas de superfície CD105, CD73, CD90 e não expressar CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-DR. E também devem ter a capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*.(20,22,24)

Apesar das MSC apresentarem vida finita e entrarem em senescência(13,20) mais rápido que as células embriológicas, as técnicas *in vitro* permitem a sua expansão em número suficiente para uso clínico mantendo o seu fenótipo indiferenciado.(13) As MSC não possuem características imunogénicas ou tumorigénicas,(13) além disso, não existe nenhuma preocupação ética ou legal no seu uso clínico.(1,13)

5.1.1 Células estaminais mesenquimais da medula óssea (BMSC)

A medula óssea adulta contém BMSC, células progenitoras raras com multipotência. As BMSC possuem alta capacidade de replicação, capacidade de diferenciação em vários tipos de células e consegue formar osso *in vivo*, o que faz delas uma ótima fonte de células estaminais para a terapia de regeneração óssea.(12,24) A sua origem pode vir da crista ilíaca ou de ossos orofaciais.(24)

5.1.1.1 BMSC da crista ilíaca

As BMSC da crista ilíaca foram estudadas extensamente e demonstraram capacidade de diferenciação em linhagens osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, miogénicas e neurogénicas de origem não mesenquimal.(20,24)

Em 1999, *Pittenger et al.* caracterizou BMSC da crista ilíaca humana como células estaminais multipotentes demonstrando o seu isolamento e expansão em cultura e diferenciação em linhagens osteogénicas, adipogénicas e condrogénicas.(24)

As BMSC da crista ilíaca podem ser isoladas através de aspiração da medula óssea, um procedimento invasivo para os doadores. Ainda assim, são as células estaminais mais usadas nos procedimentos dentários.(24)

Um declínio no potencial osteogénico das BMSC da crista ilíaca parece ocorrer com o avanço da idade, o que sugere que a idade do dador é um fator importante na eficácia da formação de osso.(20,21,24)

5.1.1.2 BMSC dos ossos orofaciais

Apesar da crista ilíaca ser a fonte principal de BMSC, estas também conseguem ser isoladas a partir da medula óssea orofacial da maxila ou mandíbula. A sua obtenção pode vir de diversos procedimentos dentários como a colocação de implantes, a extração de terceiros molares e extirpação de quistos.(24) Neste tipo de BMSC a idade do dador parece não ter efeito sobre o padrão de expressão genética, o que significa que a colheita pode ser feita em todas as idades.(20,24)

Observações clínicas e estudos experimentais em animais indicam que o enxerto obtido da área craniofacial para enxerto autólogo fornece melhores resultados e maior volume de osso que enxerto da crista ilíaca. Isto pode ser devido à origem dos tecidos, a maxila e mandíbula têm origem nas células da crista neural craniana e a crista ilíaca tem origem na mesoderme.(4,24)

Colónias de MSC dentais, craniofaciais, epiteliais e da mucosa oral, aparecem em maior quantidade que as BMSC da mandíbula e da crista ilíaca.(1)

Akintoye et al. demonstrou que as BMSC dos ossos orofaciais tinham maior capacidade de proliferação e diferenciação osteogénica quando comparadas com as BMSC da crista ilíaca do mesmo indivíduo.(24) Esta diferenciação osteogénica pode ser induzida por suplementação com dexametasona, ácido L-ascórbico e β -glicerofosfato.(1)

Um estudo animal também indicou que as BMSC orofaciais da mandíbula de um rato formaram nódulos ósseos maiores e mais mineralização óssea que as BMSC dos ossos longos.(24) Estas propriedades das BMSC orofaciais podem fornecer vantagens para a regeneração óssea orofacial.(24)

5.1.2 Células estaminais do tecido dentário

As células estaminais do tecido dentário estão divididas em dois grupos, células estaminais epiteliais e células estaminais mesenquimais. As células estaminais epiteliais estão localizadas no loop cervical do ápex do dente, e conseguem diferenciar-se em ameloblastos que produzem esmalte, mas o seu uso não foi ainda reportado em humanos.(24)

Até há data várias fontes de células estaminais mesenquimais foram identificadas. Em 2000, as MSC da polpa dentária (DPSC) foram as primeiras a ser identificadas, seguidas das MSC de dentes decíduos extraídos (SHED).(24) Tanto as DPSC como as SHED possuem propriedades de células estaminais como multidiferenciação e autorrenovação.(24) As SHED também induzem a formação de matriz semelhante a osso, recrutando células hospedeiras, isto pode ser devido à natureza dos dentes decíduos, que fazem reabsorção da raiz e posterior formação de osso em volta da raiz.(24)

As DPSC conseguem-se diferenciar em osteoblastos, células semelhantes a células adiposas, células do músculo liso, dentina e células semelhantes ao complexo dentina-polpa.(25) Também já revelaram potencial condrogénico *in vitro*. A sua multipotência, proliferação, disponibilidade e quantidade de células mostrou que estas células podem ser melhores na regeneração óssea, quando comparadas com as BMSC.(25)

O ligamento periodontal é outra fonte de MSC dos tecidos dentários, e as células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC) podem ser isoladas de dentes extraídos. As PDLSC demonstram capacidade de regenerar tecidos periodontais como, cimento,

ligamento periodontal e osso alveolar em estudos com modelos animais,(11,12,24) apesar de alguns estudos sugerirem que o local de colheita das células tem influência no tipo de regeneração, por exemplo, PDLSC da superfície do osso alveolar apresentam maior regeneração de osso comparado com PDLSC da superfície da raiz.(24)

Outras fontes de MSC dos tecidos dentários são o folículo dentário, um saco dentário que contém o dente em desenvolvimento e contém as células estaminais do folículo dentário (DFSC), com capacidade de regeneração periodontal.(24)

Ikeda et al. identificou no gérmen do terceiro molar na fase de sino as células progenitoras do gérmen dentário (TGPC), células estaminais estas, com alta proliferação e capacidade de diferenciação *in vitro* das três linhagens de folhetos germinativos incluindo osteoblastos, células neurais e hepatócitos.(24)

Células estaminais da papila apical (SCAP) foram encontradas no tecido da papila, na parte apical da raiz de dentes em desenvolvimento.(24) Estudos comprovaram que as SCAP demonstraram melhor proliferação e melhor regeneração de matriz dentinária *in vitro* que as DPSC, o que sugere que tecidos dentários em desenvolvimento são uma melhor fonte de células estaminais que tecidos dentários desenvolvidos. É de referir que estes tecidos são normalmente descartados na prática clínica, apesar destas células serem heterogêneas contendo células em vários estados de diferenciação como células estaminais verdadeiras, células progenitoras e possivelmente fibroblastos.(24)

5.1.3 Células estaminais da mucosa oral

A mucosa oral é composta por epitélio escamoso estratificado e abaixo por tecido conjuntivo, a lâmina própria.(24) Até à data estão identificadas dois tipos de células estaminais da mucosa oral, a primeira, células estaminais/progenitoras orais epiteliais, parecem ser unipotentes, o que significa que só se conseguem diferenciar em células epiteliais, mas possuem clonogenicidade (capacidade de duplicação) e capacidade de regeneração de um enxerto mucoso oral muito organizado e altamente estratificado em *ex vivo*, o que sugere que podem ser úteis em enxertos intraorais.(24)

O segundo tipo de células identificadas na mucosa oral foram as células estaminais da lâmina própria da gengiva, que está ligada diretamente ao periósteo do osso.(24) Em

2009, *Zhang et al.* caracterizou as MSC derivadas da gengiva, que exibiam clonogenicidade, autorrenovação e diferenciação multipotente similar às BMSC. Mas apesar desta aparência, as GMSC quando comparadas com as BMSC possuem mais rápida proliferação, mais estabilidade morfológica e não perdem as suas características de MSC com o aumento das passagens.(24)

5.1.4 Células estaminais/progenitoras do periósteeo

O periósteeo é um tecido conjuntivo especializado que tapa a superfície do tecido ósseo.(24) Possui capacidade osteogénica e a sua membrana consegue formar matriz extracelular mineralizada *in vitro* em condições apropriadas.(24) É constituído por duas camadas, a mais exterior que contém fibroblastos e fibras elásticas e a interior que contém MSC, células progenitoras osteogénicas, osteoblastos, fibroblastos, capilares e nervos simpáticos.(24) Apesar de um conjunto de células tão heterogéneo, estas células são capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e expressar marcadores típicos de MSC.(24) Isto diz-nos que células estaminais derivadas do periósteeo expandidas podem ser uteis para engenharia tecidual, especialmente para regeneração óssea.(24)

Um estudo comparativo *in vivo* de MSC de cães mostrou que as células do periósteeo conseguiam formar mais osso que as BMSC da crista ilíaca.(24)

Ágata et al. relatou que células do periósteeo combinadas com fatores de crescimento recombinantes proliferaram mais rápido e formaram mais osso que as BMSC em ratos.(24) Além disso enxertos de periósteeo mostraram uma formação de osso cortical, ao contrário do enxerto com medula óssea que forma osso esponjoso com uma estrutura semelhante a medula óssea, num defeito cranial de um rato, o que sugere que a fonte de células transplantadas pode influenciar as propriedades das estruturas regeneradas. Tendo estas células um bom potencial osteogénico, os dentistas têm-nas escolhido para a regeneração óssea orofacial.(24) Culturas de células estaminais de periósteeo têm sido usadas, na pesquisa clínica, no aumento da crista alveolar e elevação do seio maxilar, demonstrando sucesso na remodelação óssea e formação do osso lamelar, para posterior colocação do implante e tempo pós-operatório reduzido.(24)

5.1.5 Células estaminais do tecido adiposo (ASC)

O tecido adiposo é uma fonte abundante de MSC e tem sido investigada extensamente na medicina regenerativa. As MSC derivadas do tecido adiposo podem ser facilmente colhidas em grande quantidade por lipectomia ou lipoaspiração(17,24) de áreas como o pescoço, braços, abdômen, ancas, nádegas e coxas, sem morbidez local exagerada para o dador.(24)

O corpo adiposo da bochecha ou bola de bichat (BFP) é um tipo de tecido adiposo especializado, submucoso e vascularizado presente na cavidade oral, que está a ser investigado como uma boa fonte de enxerto para o reparo ósseo e periodontal na cirurgia oral.(21) O BFP mostrou ser uma fonte viável de ASC, capaz de se diferenciar em osteoblastos.(21) A sua colheita é feita por cirurgia oral, é fácil e causa menos morbidez e complicações locais.(21) Além disso, o seu tamanho parece ser consistente em todas as pessoas e não depende do peso ou distribuição da gordura corporal de cada pessoa.(21)

As ASC exibem características osteogénicas e são uma alternativa de MSC na medicina dentária, e a sua viabilidade na regeneração óssea orofacial e colocação de implantes já foi demonstrada.(24)

Pieri et al. demonstrou que a transplantação de ASC autólogas em conjunto com um *scaffold* inorgânico como o Bio-Oss® aumentou verticalmente a formação de osso e osteointegração dos implantes, no osso do crânio de coelhos, o que indica que as ASC podem ser uteis no aumento vertical do osso alveolar para a colocação de implantes.(24)

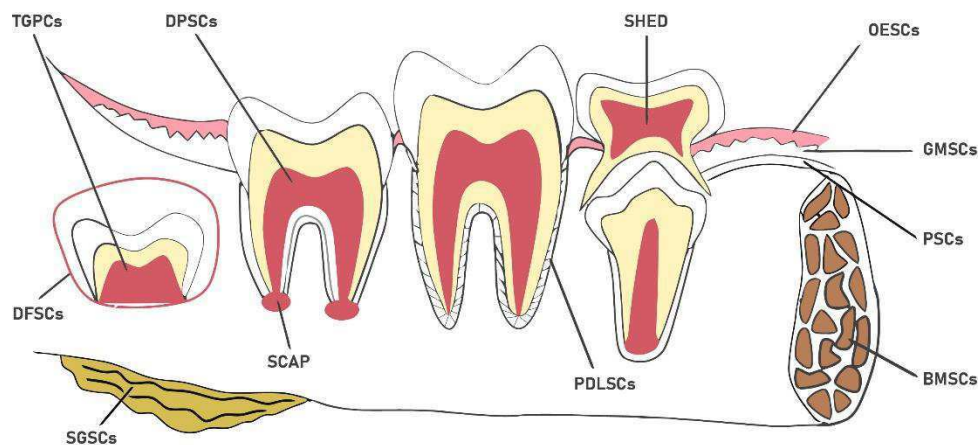


Figura 2 Fontes de células estaminais adultas na região oral e maxilofacial

5.2 Propriedades das células estaminais

5.2.1 Acessibilidade

Tendo em conta a acessibilidade, aspiração da medula óssea da crista ilíaca ou lipossucção de tecidos extraorais trazem limitações ao dentista devido a falta de especialização. Em contraste, as células da medula óssea orofacial, do periósteo e de tecidos dentários estão acessíveis aos dentistas. Mesmo assim, o isolamento das células destes locais requer a realização de procedimentos cirúrgicos, de extração do dente ou da polpa. Além disso, as células estaminais adultas estão presentes em pequenas quantidades e podem ser difíceis de isolar, purificar e expandir homogeneamente.(24)

5.2.2 Imunomodulação

Para além de reparação tecidular e regeneração, as MSC também possuem propriedades imunomodulatórias em animais e humanos, que estão ligadas à angiogénese, anti inflamação e anti apoptose. Assim, estas propriedades imunomodulatórias das MSC fazem delas mais atraentes que outros tipos de células estaminais na transplantação de células. Células estaminais mesenquimais como as DPSC, SHED, PDLSC, SCAP e GMSC têm propriedades imunomodulatórias semelhantes às BMSC. (24)

Recentes relatos sugerem que as MSC apresentam baixa imunogenicidade.(24)

As células estaminais têm capacidade de imunomodulação por imunoestimulação ou por imunossupressão. As MSC inibem a proliferação de linfócitos T que faz diminuir a secreção de citocinas como IL-2, IFN- γ e TNF- α , enquanto aumenta a produção de IL-4.(9)

5.3 Fatores que influenciam a terapia de regeneração com células estaminais

5.3.1 Sobrevivência das células transplantadas

Uma regeneração óssea bem-sucedida com células transplantadas requer um número suficiente de células com capacidade osteogénica e viabilidade celular para permitir que as células transplantadas produzam matriz extracelular para a regeneração de tecido.

Uma dose elevada de células implantadas teve melhores resultados na formação de novo osso quando comparado com doses médias ou baixas de células.(26)

Vários estudos animais sugerem que as células transplantadas morrem depressa ou migram para outro local. Quando MSC marcadas com fluorescente foram implantadas num *scaffold* de HA/TCP e implantadas subcutaneamente em ratos, o número de células transplantadas diminuiu gradualmente e ao fim de 14 dias as células já não conseguiam ser identificadas no local.(26)

Tasso et al.(26) investigou a resposta do hospedeiro à implantação subcutânea de BMSC num *scaffold* de cerâmica porosa num rato e demonstrou que dois tipos de células migraram para o local do *scaffold*, as CD31+ e as CD146+, para participar no desenvolvimento de novo tecido ósseo. A sobrevivência de células transplantadas é influenciada pelo suficiente fornecimento vascular. Assim, uma interação entre as células BMSC exógenas implantadas e as células estaminais/progenitoras residentes no hospedeiro parece ter um papel importante no aumento da vascularização para aumentar a sobrevivência das células e aumentar a regeneração óssea.

Por este motivo, pode-se assumir que as células estaminais transplantadas não são apenas uma fonte de osteoblastos responsáveis pela formação de osso, mas também conseguem estimular o organismo do hospedeiro a recrutar células endógenas, responsáveis pelo desenvolvimento do osso. O desenvolvimento de vasos sanguíneos é uma parte indispensável da formação de osso, eles transportam oxigénio, nutrientes e produtos de metabolismo e recrutam células progenitoras para a osteogénese.(9)

5.3.2 Condições de pré-cultura das células

A duração da pré-cultura *in vitro* tem um papel crucial na capacidade das BMSC de regenerarem osso.(26) *Ágata et al.*(26) descreveu que indução osteogénica de BMSC humanas por duas semanas aumenta a probabilidade de sucesso de formação de osso quando comparado com uma semana de indução. Em contraste, *Castano-Izquierdo et al.*(26) relatou que uma indução osteogénica de BMSC de ratos por 4 dias tinha melhor resultado na formação de osso *in vivo* que indução por 16 dias.

Condições de pré cultura ótimas para BMSC humanas manterem a sua sobrevivência na zona de transplantação ainda não são claras e mais estudos devem ser realizados para desenhar um protocolo para regeneração de osso com células estaminais.(26)

5.3.3 Resposta imunológica ao enxerto celular

É conhecido que a formação óssea com células transplantadas em animais não prediz a formação de osso em humanos. Uma possível razão para esta diferença é que a maior parte dos estudos animais usam animais imunocomprometidos, em que lhes faltam alguns componentes do sistema imunitário como células T e B, que estão presentes nos pacientes típicos.(26)

Liu et al.(26) descreveu que regeneração óssea mediada por BMSC é parcialmente controlada pelo microambiente local do hospedeiro no qual células imunitárias e citocinas inflamatórias afetam as BMSC.

5.4 Banco de células estaminais

O banco de células estaminais consiste em obter, manipular e guardar as células provenientes dos dentes decíduos, terceiros molares ou dos tecidos orofaciais dos pacientes numa instalação.(1)

Recentemente, bancos de tecidos ou células estaminais têm sido implementados em vários países, como no Japão, USA e Índia. Aquando da obtenção de tecidos maxilofaciais como o ligamento periodontal, tecidos pulpaes, papila apical, ou o dente em si, do paciente, podem ser criopreservados por aproximadamente 10 a 12 anos e reter o seu potencial regenerativo.(1) As células estaminais podem, posteriormente, ser isoladas do tecido/dente criopreservado quando for necessário realizar terapias regenerativas.(1) As células autólogas dadas aos pacientes vão ser reconhecidas como células hospedeiras e assim, devem ser toleradas pelo sistema imunitário.(26)

No entanto terapias tecidulares bem-sucedidas usando células estaminais provenientes de bancos de células ainda não foram relatadas. Além disso, é necessário haver legislação porque o seu uso pode nunca vir a ser preciso. O banco de células tem de ser responsável por determinar se as células criopreservadas mantêm a qualidade para

futura transplantação. Assim, criopreservação apropriada das células, tecidos e dentes é imperativo para realizar aplicações médicas, apesar de protocolos otimizados ainda não terem sido desenvolvidos.(1)

5.5 Regeneração óssea

Extração dentária é um procedimento dentário realizado frequentemente em casos de cáries extensas, doença periodontal avançada e raiz fraturada. A seguir a uma extração dentária, ocorre reabsorção da crista alveolar e atrofia.(10) Mudanças dimensionais subsequentes são mais pronunciadas na parede vestibular do que na parede palatina/lingual, devido ao fornecimento sanguíneo comprometido.(10) É nos primeiros 6 meses(1,9) após extração até ao primeiro ano que é contabilizado 50% de reabsorção da crista alveolar.(10)

Quando existem as condições certas, a terapia com implantes apresenta-se como a opção mais funcional, estética e previsível para a substituição de dentes perdidos.(6) Contudo, um fundamento determinante para o sucesso da colocação de implantes é a natureza quantitativa e qualitativa do osso de suporte.(6) É sabido que a maior parte dos pacientes que necessitam de implantes tenham osso insuficiente e que necessitem de enxerto para a sua colocação, e para aumentar a função, previsibilidade e longevidade.(6,8,17)

Aumento ósseo é a forma de tratamento que permite o aumento espacial do osso reabsorvido colocando um substituto ósseo na cavidade. As condições ideais para o crescimento de elementos osteogénicos (osteocondução), estimulação de células indiferenciadas para a sua transformação em osteoblastos (osteoindução) e a presença de osteoblastos capazes de sintetizar novo osso (propriedades osteogénicas) são necessárias para um processo de aumento correto e eficiente.(9)

De acordo com a tríade de *Lynch*, uma correta e eficiente regeneração óssea requer 3 elementos. O primeiro elemento é a base ou *scaffold*. O segundo elemento são as moléculas sinalizadoras que estão envolvidas no processo de cicatrização, como BMPs, adesinas, hormonas, vitaminas, fatores de crescimento, etc. O terceiro elemento são as células, que são afetadas pelos fatores de crescimento, que contém propriedades

potencialmente osteogênicas. Estas células são indiferenciadas como células estaminais, preosteoblastos e fibroblastos, e células diferenciadas, como os fibrócitos e osteócitos. As células estaminais podem ser separadas e multiplicadas in vitro antes da sua injeção no defeito ósseo.(9)

Independentemente da extensão ou severidade dos defeitos ósseos, o sucesso dos procedimentos de regeneração e reconstrução usados para os corrigir dependem da presença de células precursoras osteogênicas e vasculares presentes nos tecidos circundantes.(6) Durante a fase de cicatrização das terapias regenerativas, algumas células entram nos defeitos e diferenciam-se em osteoblastos que produzem matriz óssea e promovem vascularização.(6)

A terapia das células estaminais é uma estratégia promissora de engenharia tecidual para aumentar a regeneração tecidual e promover a formação de novo de tecidos duros e moles.(6)

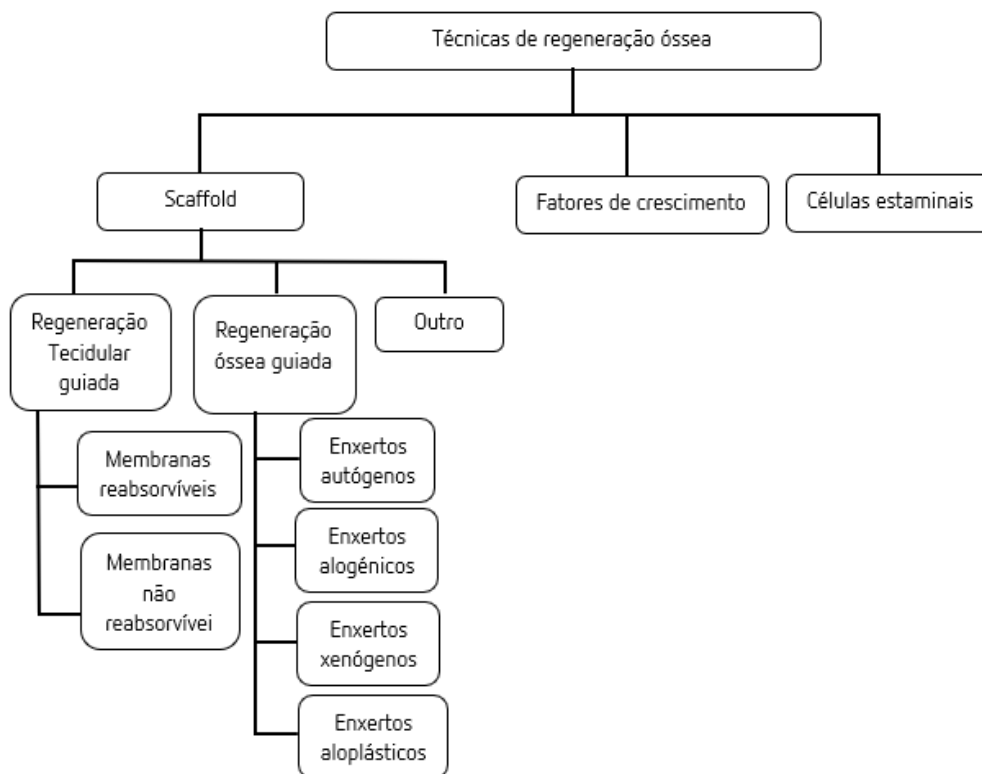


Figura 3 Técnicas e componentes da engenharia tecidual na área da regeneração óssea

5.6 Células estaminais na regeneração óssea

O enxerto autólogo é o golden standard para a reabilitação de defeitos ósseos(2,4,19,21,5,7,9,10,14–17) devido à sua rápida incorporação no hospedeiro, à presença de variados fatores de crescimento e às suas propriedades osteogênicas.(21) Contudo, existem grandes desvantagens como a necessidade de um segundo local cirúrgico, o seu volume limitado, morbidade, infecção(7,9,10,15,18,19,21) e aparecimento de cicatriz.(21) Além do mais, é estimado que 80% dos osteócitos não sobrevivam ao processo de transplantação entre o local dador e o local cirúrgico, e apresentem uma reabsorção entre 65-85%.(21) Além disso, de uma perspectiva biológica, a origem da crista ilíaca é a mesoderme, que gera osso por processo de ossificação endocondral, enquanto que o enxerto ósseo obtido da mandíbula gera osso muito mais rápido uma vez que o osso é gerado por processo de ossificação intramembranosa.(21)

A terapia tecidual com células estaminais é uma estratégia promissora para aumentar a formação de osso(2,9) providenciando células osteogênicas e secreção de sinais osteoindutivos para recrutar células dos tecidos circundantes.(2) Estas células, não só atuam diretamente na formação de osso, mas também atuam por libertação de citocinas, produção de matriz extracelular e promovem angiogénese.(20)

As células estaminais usadas nas técnicas de regeneração óssea são indispensáveis pelo menos até ao desenvolvimento de vasos sanguíneos. Estes vasos fornecem ao transplante oxigénio e nutrientes e eliminam produtos de metabolismo desnecessários.(9) Isto pode resultar em regeneração suficiente de osso num período mais curto que o previsto do que quando se usa substitutos ósseos apenas.

Neste momento, usando as técnicas de cultura celular, as MSC podem ser isoladas e expandidas com grande eficácia, induzindo o seu crescimento em várias linhagens, quando expostas a condições apropriadas de cultura.(13) Para expansão e separação *in vitro*, as culturas de MSC sofrem diversas passagens. As células são cultivadas num meio suplementado com soro autólogo ou soro fetal bovino e fatores de crescimento.(13)

As MSC têm características morfológicas fibroblásticas quando colocadas num meio de cultura de uma camada e tendem a aderir ao substrato de cultura, mudar o meio de cultura vai fazer com que células hematopoiéticas não aderidas sejam descartadas.(13) As MSC são identificadas pela sua adesão ao plástico e pela expressão de CD73, CD90, CD105,

e falta de expressão de HLA-DR e marcadores hematopoiéticos CD14, CD34, CD38, CD45.(13,20,22)

Como as MSC não têm divisões mitóticas ilimitadas *in vitro*, o número de passagens e expansão *in vitro* não deve exceder as cinco.(13) Normalmente a diferenciação osteogénica é iniciada com suplementação do meio com dexametasona, ácido ascórbico e β -fosfatoglicerol.(13) Além do mais, sais solúveis como as proteínas ósseas morfogénicas (BMPs) como as BMP-2, BMP-6 e BMP-9 também podem ser usadas.(13)

As células normalmente são semeadas num *scaffold* em três dimensões (3D) que vai guiar o seu crescimento e proliferação.(8,11–13) Até agora existem pelo menos 4 estratégias para a entrega de MSC no local designado:

1. As MSC podem ser replicadas e diferenciadas em meio de cultura e posteriormente semeadas num *scaffold* sólido 3D que pode ser implantado depois das células adquirirem adesão.
2. As MSC podem ser replicadas em meio de cultura, semeadas num *scaffold* sólido 3D e depois a combinação células-*scaffold* é colocada num meio de cultura de diferenciação para estimular a mudança para um fenótipo osteoblástico. Após a diferenciação, esta combinação está pronta para ser implantada.
3. As MSC podem ser replicadas e diferenciadas diretamente no *scaffold* 3D *in vitro* e depois do tempo de maturação a combinação células-*scaffold* pode ser implantada.
4. As MSC podem ser replicadas e diferenciadas *in vitro* e depois a combinação células-*scaffold* é incubada por um curto período para elaborar uma preparação injetável óssea.

Em todas as estratégias o *scaffold* detém um papel muito importante no fornecimento de substrato para as células ósseas migrarem, proliferarem, se diferenciarem e criarem osso novo.(13)

A expansão celular para aplicação clínica precisa de ser realizada num laboratório caro, é demorado e trabalhoso. Infelizmente, há um risco elevado de contaminação patogénica e transformação genética.(2)

Mecanismos que ocorrem no corpo durante a transplantação ainda não são totalmente conhecidos. Ainda não está estabelecido se o novo osso é formado pelas células estaminais transplantadas (papel osteogénico) ou se as células estaminais estimulam as células osteogénicas já presentes nos tecidos locais (papel osteoindutivo).(9)

Revisões sistemáticas de estudos animais recentes reportaram resultados favoráveis na técnica de terapia celular tanto para regeneração esquelética(5) como periodontal.(5) Descobertas semelhantes foram reportadas em estudos humanos para regeneração de osso alveolar.(5)

Porém, devido à grande variação na metodologia dos estudos, especialmente no que diz respeito à natureza das células e biomateriais usados, não existe na literatura a confirmação de efetividade da técnica de engenharia celular. Além do mais, preocupações relativamente aos aspetos éticos e custo-efeito têm limitado, em grande escala, a aplicação desta técnica.(5)

Um desenvolvimento contínuo para otimização desta técnica deve incluir: a origem das células estaminais, o protocolo de expansão, os suplementos usados e o material de *scaffold* para a distribuição das células.(6) Estes *scaffolds* devem ter uma reabsorção adequada e uma superfície osteocondutiva na qual pode ocorrer nova formação de osso. A junção entre estas duas disciplinas (células estaminais e *scaffold*) pode traçar o futuro da medicina regenerativa.(13)

6. Conclusão

As células estaminais aliadas aos materiais de enxerto já comumente usados, parecem ter várias vantagens na regeneração óssea de defeitos ósseos e periodontais: o novo osso formado parece formar-se mais rapidamente, com maior densidade e volume, mais mineralizado, maduro e vascularizado. Também se pode concluir que o uso destas células provocou uma reabsorção mais rápida do material de enxerto usado. Na regeneração periodontal os resultados não pareceram ter relevância na quantidade de osso formado, mas sim na rapidez com que existiu a regeneração e a sua qualidade.

As vantagens destas células na cirurgia de elevação do seio maxilar apresentam-se como uma maior quantidade de novo osso formado, com maior volume e densidade, osso mais mineralizado e maduro, mas que não existiu diferenças significativas na vascularização do novo osso. A formação deste osso foi mais rápida e com maior densidade celular. Existiu também referência à formação de tecido conjuntivo fibroso no grupo sem células estaminais contrariamente ao grupo que continha as células. Também se pode concluir que o uso destas células provocou uma reabsorção mais rápida do material de enxerto usado.

Assim, podemos concluir que o uso de células estaminais tem vantagens em relação ao uso de material de enxerto isolado. Ainda assim, com a falta de protocolos das técnicas de engenharia tecidual não podemos concluir que esta técnica deva ser usada em vez de outras técnicas de regeneração óssea maxilar.

Protocolos que indiquem a origem das células estaminais, métodos de expansão das células e materiais de enxerto adequados devem ser desenvolvidos para que esta técnica possa ser cada vez mais investigada e que cheguem a conclusões mais precisas que confirmem estes resultados.

Bibliografia

1. Mendi A, Uluturk H, Atac MS, Yilmaz D. Stem Cells for the Oromaxillofacial Area: Could they be a promising source for regeneration in dentistry? *Adv Exp Med Biol.* 2019;1144:101–21.
2. Prins H-J, Schulten EAJM, Ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J, Helder MN. Bone Regeneration Using the Freshly Isolated Autologous Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Combination With Calcium Phosphate Ceramics. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Oct;5(10):1362–74.
3. Katagiri W, Osugi M, Kinoshita K, Hibi H. Conditioned Medium From Mesenchymal Stem Cells Enhances Early Bone Regeneration After Maxillary Sinus Floor Elevation in Rabbits. *Implant Dent.* 2015 Dec;24(6):657–63.
4. Akintoye SO. The distinctive jaw and alveolar bone regeneration. *Oral Dis.* 2018 Mar;24(1–2):49–51.
5. Shanbhag S, Pandis N, Mustafa K, Nyengaard JR, Stavropoulos A. Alveolar bone tissue engineering in critical-size defects of experimental animal models: a systematic review and meta-analysis. *J Tissue Eng Regen Med.* 2017 Oct;11(10):2935–49.
6. Kaigler D, Avila-Ortiz G, Travan S, Taut AD, Padial-Molina M, Rudek I, et al. Bone Engineering of Maxillary Sinus Bone Deficiencies Using Enriched CD90+ Stem Cell Therapy: A Randomized Clinical Trial. *J Bone Miner Res.* 2015 Jul;30(7):1206–16.
7. Redondo LM, Garcia V, Peral B, Verrier A, Becerra J, Sanchez A, et al. Repair of maxillary cystic bone defects with mesenchymal stem cells seeded on a cross-linked serum scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018 Feb;46(2):222–9.
8. Valdivia E, Mendoza-Azpur G, Pando J, Cornejo H, Carrasco A, Nevins M, et al. Tissue Engineering Therapy for Atrophic Maxilla Using Minimally Manipulated CD90 and CD105 Bone Marrow Stem Cells: A Case Report. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2017;37(3):355–61.
9. Brozek R, Kurpisz M, Koczorowski R. Application of stem cells in dentistry for bone

- regeneration. *J Physiol Pharmacol.* 2018 Feb;69(1):23–33.
10. Mashimo T, Sato Y, Akita D, Toriumi T, Namaki S, Matsuzaki Y, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance bone marrow regeneration in dental extraction sockets. *J Oral Sci.* 2019;61(2):284–93.
 11. Chien K-H, Chang Y-L, Wang M-L, Chuang J-H, Yang Y-C, Tai M-C, et al. Promoting Induced Pluripotent Stem Cell-driven Biomineralization and Periodontal Regeneration in Rats with Maxillary-Molar Defects using Injectable BMP-6 Hydrogel. *Sci Rep.* 2018 Jan;8(1):114.
 12. Liu Z, Yin X, Ye Q, He W, Ge M, Zhou X, et al. Periodontal regeneration with stem cells-seeded collagen-hydroxyapatite scaffold. *J Biomater Appl.* 2016 Jul;31(1):121–31.
 13. Mangano FG, Colombo M, Veronesi G, Caprioglio A, Mangano C. Mesenchymal stem cells in maxillary sinus augmentation: A systematic review with meta-analysis. *World J Stem Cells.* 2015 Jul;7(6):976–91.
 14. Bertolai R, Catelani C, Aversa A, Rossi A, Giannini D, Bani D. Bone graft and mesenchymal stem cells: clinical observations and histological analysis. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2015;12(2):183–7.
 15. Solakoglu O, Gotz W, Kiessling MC, Alt C, Schmitz C, Alt EU. Improved guided bone regeneration by combined application of unmodified, fresh autologous adipose derived regenerative cells and plasma rich in growth factors: A first-in-human case report and literature review. Vol. 11, *World journal of stem cells.* United States; 2019. p. 124–46.
 16. Jahanbin A, Rashed R, Alamdari DH, Koohestanian N, Ezzati A, Kazemian M, et al. Success of Maxillary Alveolar Defect Repair in Rats Using Osteoblast-Differentiated Human Deciduous Dental Pulp Stem Cells. *J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Apr;74(4):829.e1-9.
 17. Farre-Guasch E, Bravenboer N, Helder MN, Schulten EAJM, Ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J. Blood Vessel Formation and Bone Regeneration Potential of the Stromal Vascular Fraction Seeded on a Calcium Phosphate Scaffold in the Human

- Maxillary Sinus Floor Elevation Model. Mater (Basel, Switzerland). 2018 Jan;11(1).
18. Ahn G, Lee J-S, Yun W-S, Shim J-H, Lee U-L. Cleft Alveolus Reconstruction Using a Three-Dimensional Printed Bioresorbable Scaffold With Human Bone Marrow Cells. *J Craniofac Surg*. 2018 Oct;29(7):1880–3.
 19. Pelegrine AA, Teixeira ML, Sperandio M, Almada TS, Kahnberg KE, Pasquali PJ, et al. Can bone marrow aspirate concentrate change the mineralization pattern of the anterior maxilla treated with xenografts? A preliminary study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(1):21–6.
 20. Colangeli W, Riccelli U, Giudice A, Barca I, Caruso D, Novembre D, et al. Jaw bones regeneration using mesenchymal stem cells. A single-center experience. *Ann Ital Chir*. 2018;89:20–3.
 21. Khojasteh A, Hosseinpour S, Rad MR, Alikhasi M. Buccal Fat Pad-Derived Stem Cells in Three-Dimensional Rehabilitation of Large Alveolar Defects: A Report of Two Cases. *J Oral Implantol*. 2019 Feb;45(1):45–54.
 22. Bertolai R, Catelani C, Signorini M, Rossi A, Giannini D. Mesenchymal stem cells in post-surgical cavities of large maxillary bone lesions. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2016;13(3):214–20.
 23. Wang F, Li Q, Wang Z. A comparative study of the effect of Bio-Oss((R)) in combination with concentrated growth factors or bone marrow-derived mesenchymal stem cells in canine sinus grafting. *J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 2017 Aug;46(7):528–36.
 24. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-- part I: stem cell sources. *J Prosthodont Res*. 2012 Jul;56(3):151–65.
 25. Jazayeri HE, Tahriri M, Razavi M, Khoshroo K, Fahimipour F, Dashtimoghadam E, et al. A current overview of materials and strategies for potential use in maxillofacial tissue regeneration. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017 Jan;70(Pt 1):913–29.
 26. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry-- Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res*. 2012 Oct;56(4):229–48.