



CESPU
INSTITUTO UNIVERSITÁRIO
DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Potencial regenerativo do periodonto através as células estaminais do ligamento periodontal

Olivia Selima Rezgoun

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

—

Gandra, junho de 2023

Olivia Selima Rezgoun

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

**Potencial regenerativo do periodonto através as
células estaminais do ligamento periodontal**

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.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer aos meus pais Khaled e Françoise e à minha irmã Andrea, por todo o amor e apoio que me deram ao longo da minha vida, nada disto teria sido possível sem vocês.

Gostaria também de agradecer a todas as pessoas que conheci aqui, que me encheram a cabeça de memórias felizes.

Obrigada ao Professor Doutor Fernando Ferreira pela sua ajuda na realização deste trabalho de fim de curso.

Um agradecimento a Instituição e ao corpo docente por nos terem guiado com bondade durante estes cinco anos.

Resumo

Introdução : A regeneração de órgãos e tecidos através de terapias celulares que recorrem a células estaminais é um método que está a ganhar popularidade. De facto, para restaurar um sistema como o periodonto, as células estaminais, graças às suas propriedades de autorrenovação e de diferenciação em vários tipos de células, podem responder com êxito a este desafio. As células estaminais do ligamento periodontal revelam-se um bom candidato graças à sua facilidade de obtenção e às suas propriedades.

Objetivo : O objetivo desta revisão sistemática integrativa é determinar se as células estaminais do ligamento periodontal podem tornar-se uma ferramenta clínica útil na regeneração do periodonto danificado.

Materiais e métodos : Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados PubMed e b-on, com um limite temporal de 5 anos, da qual foram selecionados 18 artigos para elaboração deste trabalho. Foram analisadas as propriedades das células estaminais, o seu método de utilização e os fatores que influenciam a regeneração dos tecidos periodontais.

Resultados : As células estaminais do ligamento periodontal mostraram ser aptas a obter uma regeneração muito satisfatória do osso alveolar, do cemento e do ligamento periodontal. Esta regeneração pode ser otimizada através da adição de moléculas adjuvantes e da utilização de materiais de transplante adaptados.

Conclusão : A regeneração dos tecidos periodontais utilizando células estaminais do ligamento periodontal tem muitas vantagens, mas como a maioria dos estudos foi realizada em sujeitos animais, é necessário continuar as investigações em humanos para verificar se esta terapia pode tornar-se uma solução na prática clínica futura.

Palavras chaves : células estaminais, células estaminais do ligamento periodontal, regeneração periodontal, engenharia tecidual

Abstract

Introduction : Organ and tissue regeneration through cell therapies using stem cells is a method that is increasing in popularity. Indeed, to restore a system such as the periodontium, stem cells, thanks to their self-renewal properties and their differentiation into various cell types, can successfully meet this challenge. Stem cells from the periodontal ligament prove to be a suitable candidate thanks to their ease of obtainability and their properties.

Objective : The aim of this integrative systematic review is to determine whether periodontal ligament stem cells can become a useful clinical resource in the regeneration of the damaged periodontium.

Materials and methods : To achieve this objective, a literature search was conducted in PubMed and b-on databases, with a time limit of 5 years, from which 18 articles were selected for preparation of this paper. The properties of stem cells, their method of use and the factors that influence the regeneration of periodontal tissues were analysed.

Results : The stem cells of the periodontal ligament have shown to be able to obtain a very satisfactory regeneration of the alveolar bone, cementum and periodontal ligament. This regeneration can be optimised by the addition of adjuvant molecules and the use of an adapted transplantation materials.

Conclusion : In conclusion, regeneration of periodontal tissues using periodontal ligament stem cells has many advantages, but as most of the studies were performed in animals subjects, further investigations in humans are needed to verify if this therapy can become a solution in future clinical practice.

Keywords : stem cells, periodontal ligament stem cells, periodontal regeneration, tissue engineering

Índice geral

I.	Introdução.....	1
II.	Objetivo.....	2
III.	Materiais e métodos.....	3
IV.	Resultados.....	4
V.	Discussão.....	19
A.	Células estaminais do ligamento periodontal.....	19
1.	Isolamento e condições de pré culturas.....	19
2.	Propriedades.....	19
B.	Células estaminais do ligamento periodontal na regeneração periodontal.....	20
1.	Material de transplante.....	20
2.	Enxertos de células.....	21
3.	Co-transplantações.....	22
4.	Modulações das propriedades celulares.....	23
C.	Limitações.....	24
VI.	Conclusão.....	25
VII.	Referencias bibliograficas.....	26

Índice de figuras

Figura 1. Fluxograma PRISMA.....3

Índice de tabela

Tabela de artigos.....7

Lista de abreviaturas, siglas e acrónimos

(h)GMSC : Células estaminais da gengiva (humanas)

(h)PDLSC : Células estaminais do ligamento periodontal (humanas)

ADSC : Células estaminais derivadas de adiposidade

Bm-MSC : Células estaminais da medula óssea

CAL : Perda de aderência clínica

CFU : Colony Forming Units

DFSC : Células estaminais foliculares dentárias

DPSC : Células estaminais de polpa dentária

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EX-4 : Exendin-4

HUVEC : Células endoteliais da veia umbilical humana

IL 10 : Interleucina 10

MaR1 : Maresin-1

MBCP : Micro/Macro-Porous Biphasic Calcium Phosphate

Micro CT : Micro Tomografia Computadorizada

MSC : Células estaminais mesenquimais

MSM : Methylsulfonylmethane

PCL : Polycaprolactone

PDGF BB : Platelet-Derived Growth Factor-BB

PDL : Ligamento periodontal

PDMS : Polydimethylsiloxane

PLGA-PEG-PLGA : Poly (D,L-lactide-co-glycolide)-poly (ethylene glycol)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) hydroge

PPD : Profundidade de bolsa

PRF : Platelet Rich Fibrin

qRT-PCR : Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

rhBMP-2 : Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2

RvE1 : Resolvin E1

SDF-1 : Stromal cell-derived factor-1

SEM : Scanning Electron Microscopy

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

UCMSC : Células estaminais de cordão umbilical de tecido perinatal associado ao nascimento

XBS : Xenogenic Bone Sibstitute

I. Introdução

O periodonto é um complexo de várias estruturas cujo papel principal é de fornecer um suporte aos dentes. Dentro dessas estruturas, incluiu-se o cemento é um tecido conjuntivo avascular que reveste as raízes dos dentes e que serve principalmente em fixar as fibras do ligamento periodontal, que é um tecido conjuntivo que permite segurar os dentes dentro do alvéolo, suportar as forças mastigatórias, atuar como recetor sensorial necessário para o correto posicionamento dos maxilares durante a mastigação e é um reservatório celular para a homeostasia tecidual. O osso alveolar, contém os alvéolos dentários que permitem com a ajuda do ligamento periodontal de manter os dentes ancoradas (1).

Os tecidos periodontais estão interconectados, por essa razão qualquer infeção pode prejudicar a homeostasia do periodonto. As doenças periodontais compreendem uma ampla gama de condições inflamatórias que afetam os tecidos periodontais que podem levar à perda dentária (2). A periodontite, que é definida como "*doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental*"(3) afeta uma faixa etária que estende-se dos adolescentes aos idosos, em vários graus de agressividade, tendo em conta que a sua prevalência aumenta com a idade, a gestão desse problemática é crucial (4). A doença influencia a qualidade de vida do paciente, nomeadamente as funções de mastigação, estética da boca, mas também a condição sistêmica do paciente (5). A doença periodontal pode ser controlada através uma motivação a higiene, profilaxia e remoção dos fatores agravantes (6). Além disso, a terapia convencional consiste em raspagem e alisamento radicular que pode ser combinado com terapias mais recentes de regeneração periodontal (7).

O conceito de regeneração periodontal consiste em restaurar função e saúde da tríade periodontal : osso alveolar, ligamento periodontal e cemento. Essa regeneração pode ser alcançada com enxertos de biomateriais mas também com terapia através as células estaminais mesenquimais que são células estaminais adultas que têm propriedades de autorrenovação e diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos in vitro (8).

O ligamento periodontal contém uma importante fonte de células estaminais, essenciais para a homeostasia celular do periodonto (1). O estudo do comportamento in vitro das PDLSC revelou que possuíam capacidades de diferenciação em progenitores da osteogênese, cementogênese e também na formação de fibras parecidas aos do ligamento periodontal (9). A terapia celular faz-se a maioria do tempo semeando células num scaffold que ira preencher o defeito (10,11). Esse enxerto pode ser acompanhado ou não de substancias adjuvantes (12,13) que vão promover o crescimento das células e tornar o ambiente mais favorável à regeneração do complexo periodontal (14,15).

O objetivo desta investigação é de estudar o potencial regenerativo que nos-oferece a terapia com células estaminais do ligamento periodontal, nomeadamente se pode tornar-se uma ferramenta clínica útil para o tratamento de periodontos danificados no futuro.

II. Objetivo

Objetivo principal : A utilização das células estaminais do ligamento periodontal pode ser uma ferramenta clínica útil na regeneração do parodonte danificado ?

Objetivos secundários :

- Como obter uma regeneração tecidular do periodonto através das PDLSC ?
- Quais são as razões de continuar a desenvolver terapias com essas células ?

III. Materiais e métodos

Foi efetuada uma pesquisa eletrónica nas bases de dados de publicações científicas PubMed usando as combinações dos seguintes termos científicos com o conetor booleano AND : ((periodontal ligament[MeSH Terms]) AND (periodontal regeneration[MeSH Terms])) AND (stem cell[MeSH Terms]).

Foi feita uma pesquisa adicional abrangente da literatura na base de dados b-on com termos científicos seguintes : (ti:(periodontal ligament stem cells)) AND (ti:(periodontal tissue regeneration)).

Foi colocado como limite temporal das publicações 5 anos, compreendidos entre 2018 e 2022 na língua inglesa e portuguesa.

Os critérios de seleção da pesquisa de artigos incluíam relatórios de casos e 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. Posteriormente, os artigos selecionados foram lidos na íntegra e analisados consoante ao objetivo do estudo.

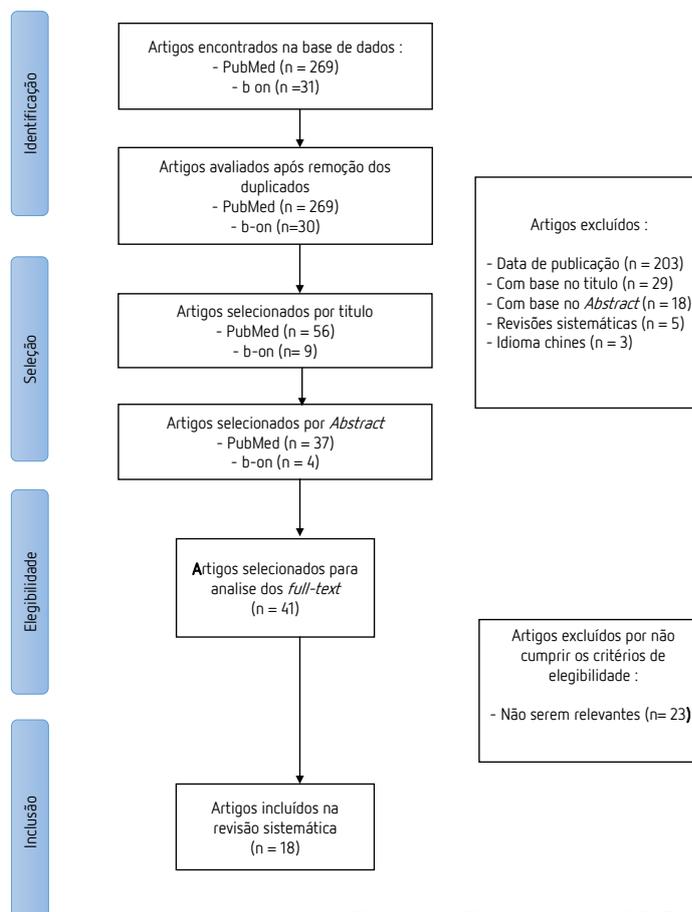


Figura 1. Fluxograma PRISMA

IV. Resultados

A pesquisa bibliográfica feita nas bases de dados eletrônicas PubMed e b-on identificou um total de 300 artigos, como referenciado no fluxograma acima. Depois da remoção do duplicata, eliminou-se um total de 203 artigos por estar publicados antes de 2018. Depois de ler os títulos e os abstracts dos artigos, 55 foram excluídos porque não atendiam aos critérios de inclusão. Os restantes 41 artigos potencialmente relevantes foram lidos integralmente. Desses artigos, foram excluídos 23 porque não forneceram dados relevantes para o presente estudo. Desta forma, 18 artigos foram selecionados na elaboração nesta revisão sistemática integrativa.

Dos 18 artigos escolhidos, 4 (22,2%) (15–18) investigavam as propriedades e o comportamento das células das células estaminais do ligamento periodontal, dentro dos quais 1 (5,5%) (15) focaliza-se sobre as características de diferenciação e o crescimento celular, 1 (5,5%) (18) trata das propriedades anti inflamatórias das células e os 2 (50%) (16,17) restantes observam se é possível de modular o comportamento celular em relação a adição de adjuvantes.

14 artigos (77,7%) (9–14,19–26) abordavam os efeitos do transplante de células estaminais do ligamento periodontal na regeneração do periodonto através varias comparações, incluído 6 (33,3%) (11,14,23–26) artigos que comparam diferentes tipos de células estaminais na regeneração de periodonto, 8 (44,4%) (9,10,12,13,19–22) artigos que comparam a regeneração obtida entre diferentes materiais de transplantes semeados com células estaminais do ligamento periodontal.

A maioria dos estudos encontrados foram testes em animais, 12 (66,6%) (9,10,12–14,16,17,19,20,23,25,26) artigos usaram ratos como sujeito de estudo, 1 (5,5%) (11) artigo refere fazer teste em ovinos, foi encontrado 1 (5,5%) (21) ensaio clinico com sujeitos humanos e os 4 (22,2%) outros artigos foram testes laboratoriais.

A proveniência das células estaminais e feita por raspagem de ligamento periodontal diretamente nos dentes, 13 (72,2%) (9,10,13–15,18–24,26) artigos usaram ligamento periodontal humano apos extração dentaria planificada, dentro dos quais 7 (38,8%) (13,18,20–22,24,26) artigos mencionaram usar 3° molares, 5 (27,7%) (9,10,15,19,23) artigos usaram molares e pré-molares e 1 (5,5%) (14) artigo não especifica o tipo de dente escolhido. 4 (22,2%) (11,12,16,17) artigos investigavam sobre ligamento periodontal animal, 3 (16,6%) (12,16,17) artigos trabalharam com ligamento periodontal de ratos e 1 (5,5%) (11) artigo com ligamento periodontal de ovino. Existe também 1 (5,5%) (25) artigo que não menciona a proveniência das suas células estaminais.

O tamanho dos defeitos a reabilitar varia entre 1mm e 7mm ao máximo, sendo que os defeitos foram criados cirurgicamente em 12 (66,6%) (9–14,16,17,19,20,25,26) artigos, 1 (5,5%) (23) artigo menciona que não houve criação de defeito mas apenas um transplante subcutâneo, e 1 (5,5%) (21) artigo no qual o defeito já estava presente.

Em relação a regeneração periodontal, 11 (61, 1%) (9,11,12,15,17,19,20,22,23,25,26) artigos referem obter uma regeneração de fibras de ligamento periodontal, 13 (72,2%) (9,11,12,15,17–20,22–26) artigos mencionaram uma regeneração de cemento e 16 (88,8%) (9–18,20,22–26) artigos indicam uma regeneração do osso alveolar. A regeneração das estruturas do periodonto foi comprovada por expressão genica de genes relacionados a osteogénese e cementogénese graças a qRT-PCR, a análise com Micro Tomografia Computadorizada mostra a quantidade e densidade do novo osso formado e a análise imunohistoquímica em alta ampliação permitiu trazer ao primeiro plano a formação de novas fibras de ligamento periodontal e de cemento. Apesar disso 1 (5,5%) (21) artigo, não mencionava regeneração das estruturas do periodonto, mas tratava duma melhoria dos parâmetros clínicos avaliados.

Com o propósito de obter essa regeneração periodontal, 5 (27,7%) (9–12,22) artigos usaram scaffold para transplantar as células estaminais do ligamento periodontal no defeito, cujo 2 (11,1%) (12,22) artigos testavam materiais autólogos, 1 (5,5%) (9) artigo mencionava um material xénogénico, 2 (11,1%) (10,11) tratavam de materiais sintetizados. 4 (22,2%) (9,10,12,22) artigos usaram comparação somente com grupo controle (scaffold desprovida de células) e demonstraram uma regeneração significativamente aumentada relativamente aos grupos de controle. O outro (5,5%) (11) artigo usava também grupo controle mas o comparativo foi feito com outras células estaminais (nomeadamente da gengiva e da medula óssea), a formação de novo tecido periodontal apareceu significativamente aumentada nomeadamente na regeneração de fibras de ligamento periodontal fazendo das PDLSC as células de primeira escolha na regeneração desse tecido. Enquanto a formação óssea, ocorreu um desenvolvimento significativamente subido de osso mais denso e muito parecido ao osso alveolar nos grupos testes mas não houve diferenças significativas entres as células estaminais do ligamento periodontal e da medula óssea.

9 (50%) (10,13,14,16,18–20,23,26) artigos observaram a regeneração através a utilização de substancias adjuvantes, 5 (27,7%) (10,18–20,26) mencionaram o uso de adjuvante em combinação com scaffold, que foi benéfica porque comparados ao grupos controle (scaffold com células mas sem adjuvante) houve uma formação aumentada significativa de novos tecidos periodontais, especialmente o osso que apareceu mais denso, ademais ocorreu uma formação de novos vasos sanguíneos em 2 (11,1%) (19,26) artigos. Por outro lado, 1 (5,5%) (18) artigo referenciava que o uso de adjuvantes pode influenciar o ambiente inflamatório por restauração das propriedades de diferenciação celular mas também por up-regulação de genes relacionados a osteogénese e cementogénese.

4 (22,2%) artigos abordavam o tratamento das células com adjuvante previamente durante o tratamento (13,14,16,18,23), observamos em conjunto desses artigos uma formação precoce de novo osso alveolar, bem como uma densidade óssea significativamente aumentada comparado aos grupos controle sem adjuvante, 1 (5,5%) (14) artigo mencionava o facto de promover a osteoclastogénese de maneira a modular a homeostasia óssea e substituir um osso alveolar velho por um novo osso alveolar mais denso.

Autor (ano de publicação)	Tipo de espécie	Objetivos	Alvos da regeneração	Dimensão e tipo de defeito	Material de transplante/ fatores adjuvantes	Efeitos terapêuticos	Conclusão
Jin S et al (2020)	Ratos	Avaliar as alterações biológicas nos PDLSC (de ratos) quando estão sujeitas ao movimento dentário induzido por força mecânica in vivo e força compressiva in vitro.	Osso alveolar	Molas de níquel-titânio (0,2 mm de espessura, 1 mm de diâmetro, 4 mm de comprimento; Tecnologia Inteligente) foram ligadas entre o primeiro molar superior direito e os incisivos.	-	<ul style="list-style-type: none"> • O primeiro molar contralateral serve de controle. • A aplicação de força in vivo aumenta a proporção de células, comprovado por duplo imunofluorescência. • As células submetidas à força mecânica têm forte capacidade de proliferação, um aumento da diferenciação osteoclástica e geram a migração dos macrófagos, comprovado por contagem de células e qRT-PCR. 	O movimento dentário tem um impacto sobre as características biológicas das PDLSC, nomeadamente a proliferação, a diferenciação, o ambiente inflamatório e a modelação do osso.
Liu J et al (2019)	Ratos	Observar as mudanças dos macrófagos depois a transplantação de PDLSC (de ratos)	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal	O defeito foi formado utilizando uma broca dentária de baixa velocidade até que as raízes do primeiro e segundo molares fossem expostas. A dimensão do defeito era de cerca de 5 mm × 1,5 mm × 0,8 mm.	<ul style="list-style-type: none"> • Bio-Gide® 	<ul style="list-style-type: none"> • As células mostraram capacidade de diferenciação osteogênica e adiposa comprovado por análise de citometria de fluxo. • Ocorreu formação de novo osso no defeito cirúrgico, comprovado por Micro CT. • Aparecimento de "cementum like structure" e fibras de colágeno orientadas que se inserem no cimento recém formado, comprovado por análise histológica. • Modificação precoce do microambiente inflamatório aumentando os macrófagos anti inflamatórios por efeito parácrino comprovado por imunofluorescência, ELISA e citometria de fluxo. 	A transplantação de PDLSC provocou mudanças no microambiente de inflamatório modificando macrófagos no recrutamento dos macrófagos anti inflamatórios e os não ativados para promover a regeneração dos tecidos periodontais.

Park J et al (2020)	Ratos	Investigar se as folhas de hPDLSC humanas pré-tratadas com rhBMP 2 (recombinant human bone morphogenic protein-2) poderiam promover eficazmente a regeneração da camada mineralizada com PDL incorporado para promover o cimento dentário humano funcional e o complexo periodontal	Osso alveolar, ligamento periodontal e cimento	Sem defeito criado, transplantação subcutânea.	<ul style="list-style-type: none"> • Micro/Macro-Porous Biphasic Calcium Phosphate (MBCP) Cylindrical Block • Recombinant Human BMP-2 (rhBMP2) 	<ul style="list-style-type: none"> • As células mostraram capacidade de diferenciação osteogénica, adiposa e condrogénica, foi comprovado por análise imunohistoquímica. • As hPDLSC inibem a proliferação de linfócitos in vitro, comprovado por análise imunohistoquímica. • As folhas de PDLSC pré-tratadas com rhBMP-2 promoveram uma deposição significativa de colagénio e formação de camadas mineralizadas in vitro, comprovado por análise imunohistoquímica. • As folhas de hPDLSC pré-tratadas com rhBMP-2 promoveram a formação de estruturas mineralizadas de tipo cimento in vivo, comprovado por análise imunohistoquímica. 	Este estudo demonstrou que o pré-tratamento com rhBMP-2 melhorou o destino das folhas de hPDLSC ao promover a formação fisiológica de tecido fibroso em orientações específicas e fibras de tipo cimento a fim de restaurar as capacidade funcional do periodonto.
Ha S et al (2020)	Ratos	Explorar os efeitos do MSM na proliferação de hPDLSC e a diferenciação em osteoblastos in vitro e in vivo.	Osso alveolar	O defeito redondo de 4 mm de diâmetro foi feito com uma broca de trefina no centro do calvário.	<ul style="list-style-type: none"> • Methylsulfonyl methane (MSM) • Esponja de colágeno 	<ul style="list-style-type: none"> • A proliferação das hPDLSC foi melhorada por concentrações de MSM até 25mM e o maior nível de proliferação foi obtido por concentrações de MSM de 10 mM, comprovado por citometria de fluxo. • O MSM numa concentração de 10mM promove a diferenciação das hPDLSCs em células osteoblastos in vitro, comprovado por Western blot. • O transplante de hPDLSC, esponja de colágeno e MSM induziu formação óssea nos ratos, comprovado por Micro CT. 	MSM em concentração adequada MSM, induz os hPDLSCs a proliferar e diferenciarem-se em osteoblastos in vitro e melhorar a formação óssea in vivo.

Zhao B et al (2020)	Ratos	Investigar sobre a regeneração do periodonto com membrana PCL (Polycaprolactone) libertadora de sinvastatina carregada de hPDLSC.	Ligamento periodontal e cimento.	Não referido	<ul style="list-style-type: none"> • Polycaprolactone (PCL) membrane scaffold • Sinvastatina • Ceramic Bovine Bone 	<ul style="list-style-type: none"> • A liberação de sinvastatina ocorreu ao longo do período de estudo (28 dias) e aproximadamente 80% do fármaco foi liberado, comprovado por fórmula matemática. • A diferenciação osteogênica das hPDLSC in vitro foi aumentada pela liberação de sinvastatina, e maior acumulação de matriz mineralizada in vitro, comprovado por análise imunohistoquímica. • A membrana carregada de sinvastatina promoveu a formação de "cementum like" tecido e fibras de colagénio bem aderidas ao novo cimento, comprovado por análise imunohistoquímica. 	As membranas libertadoras de sinvastatina estão aqui seguras e eficazes na regeneração do complexo ligamento periodontal e cimento
Pan J et al (2019)	Ratos	Investigar as propriedades das hPDLSC sobreexpressores de PDGF-BB (Platelet-derived growth factor-BB) encapsulados num hidrogel termossensível, a fim de tratar defeitos ósseos alveolares.	Osso alveolar	Incisão longitudinal de 1 cm entre a mucosa alveolar e o palato duro. O defeito alveolar 7x4x3 mm ³ foi gerado a seguir usando uma trituradora manual de baixa velocidade e um bit de corte lateral.	<ul style="list-style-type: none"> • Thermosensitiv e PLGA-PEG-PLGA (poly (D,L-lactide-co-glycolide)-poly (ethylene glycol)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) hydrogel • PDGF-BB (Platelet-derived growth factor-BB) 	<ul style="list-style-type: none"> • As sobre expressão de PDGF-BB nas hPDLSC aumenta a proliferação e diferenciação osteoclástica, comprovado citometria de fluxo e análise imunohistoquímica. • Imunofluorescência mostrou que o hidrogel é compatível com o crescimento celular. • As hPDLSC têm boa aderência no hidrogel termossensível, comprovado por SEM (Scanning Electron Microscopy). • A análise micro CT (computed Tomography) e histológica revelam que as hPDLSC que exprimem PDGF BB no hidrogel são as que mais preencherem o 	Os hPDLSC que foram modificados para sobreexpressar o PDGF-BB podem secretar continuamente este fator de crescimento, o que permite aumentar a proliferação, angiogênese, e diferenciação osteogênica destes hPDLSC. Verificámos ainda que um hidrogel PLGA-PEG-PLGA termossensível representa um portador ideal para estes hPDLSC, e determinamos que

						defeito ósseo e que as 8 semanas pós intervenção a regeneração óssea atinge 70%.	estas células são capazes de mediar a regeneração óssea alveolar melhorada in vivo.
Iwasaki K et al (2019)	Ratos	Investigar a regeneração periodontal, após o transplante de âmnio e hPDLSC.	Ligamento periodontal, cimento e osso alveolar	Uma incisão extra oral foi feita no fundo da mandíbula para expor a placa vestibular. A raiz mesial do primeiro molar mandibular para a raiz mesial do segundo molar foram removidas utilizando instrumentos rotatórios. Cada defeito era de 2 mm de altura e 3 mm de largura.	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana âmnio descelularizada 	<ul style="list-style-type: none"> • A análise com Micro CT revela que houve formação de novo osso no defeito com o transplante com membrana âmnio e hPDLSC, a formação óssea foi sempre encontrada no fundo do defeito periodontal e a área exposta da superfície da raiz foi reduzida às 4 semanas. • A análise histológica mostra uma nova formação de tecido fino tipo cimento e foram visíveis fibras perpendicularmente orientadas na superfície da raiz desnudada do grupo. • A análise por imunofluorescência nos-indica que as 4 semanas pós intervenção as hPDLSC encontram-se majoritariamente na superfície exterior do osso alveolar regenerado e no espaço do ligamento periodontal. • A análise por Western Blot demonstra que a quantidade de hPDLSC decresce com o tempo. 	No presente estudo, demonstramos que a regeneração periodontal é induzida pelo transplante de hPDLSCs utilizando tecnologia de transferência celular. Um número limitado de hPDLSCs transplantados foi detetado em defeitos periodontais após quatro semanas, e a drástica incorporação das células não foi encontrada sugerindo um efeito parácrino das hPDLSC.
Duan X et al (2018)	Ratos	Investigar a viabilidade do PRF (Platelet-Rich Fibrin) para a engenharia de tecidos periodontais observando os	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal	O osso que cobria o primeiro molar, a mandíbula vestibular, foi removido utilizando uma broca dentária a	<ul style="list-style-type: none"> • PRF membrana gel. 	<ul style="list-style-type: none"> • PRF promove a proliferação de PDLSC in vitro, comprovado por citometria de fluxo. • A análise histológica mostra que o transplante PRF + PDLSC favoreceu a regeneração do osso alveolar que preenche quase o 	As PRF combinadas com PDLSC de rato podem melhorar muito a restauração de defeitos periodontais de rato, promovendo a formação de cimento, osso alveolar

		efeitos do PRF nos PDLSC de ratos.		alta velocidade. As raízes foram cuidadosamente desnudadas do PDL, do cimento subjacente e da dentina superficial. Um defeito periodontal de 4x3x2 mm ³ foi obtido.		defeito a 24 dias pós intervenção, camada fina de novo cimento celular cobrindo a superfície desnudada da raiz e as fibras de PDL regeneradas que separam o novo osso alveolar do novo cimento foram desordenadas e não perpendiculares à superfície da raiz.	e fibras de ligamento periodontal.
Liang Q et al (2021)	Ratos	Avaliar os efeitos da coterapia SDF-1/EX-4 sobre a proliferação, migração e diferenciação osteogênica das hPDLSC in vitro e o recrutamento de células endógenas, a osteoclastogênese precoce e a regeneração óssea in vivo.	Osso alveolar	Expusemos a superfície mandibular do rato e removemos os tecidos de suporte periodontal vestibular das raízes dos primeiros molares mandibulares. Foram preparados os defeitos da fenestração periodontal de 5 mm × 4 mm × 1 mm, localizados 1 mm abaixo da crista do osso alveolar e 1 mm atrás da frente da mandíbula.	<ul style="list-style-type: none"> • Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) • Exendin-4 (EX-4) • Medical collagen membranes (Zhenghai Biotechnology) 	<ul style="list-style-type: none"> • A análise PCR e Western Blot revelaram que a coterapia SDF-1/EX-4 aumenta a proliferação, a migração e a diferenciação osteogênica das hPDLSC. • A análise Micro CT mostra que a coterapia SDF-1/EX-4 promoveu a formação óssea precoce de um osso denso similar a um osso alveolar original. • A análise da imunofluorescência e qRT-PCR indica que a coterapia SDF-1/EX-4 promoveu a expressão proteica de marcadores relacionados com a osteogênese nos tecidos regenerados. 	A coterapia com SDF-1 e EX-4 aumentou a proliferação, quimiotaxia e diferenciação osteogênica dos hPDLSC in vitro. Além disso, a coterapia SDF-1/EX-4 induziu a osteoclastogênese precoce, promoveu a expressão de proteínas osteogênicas em tecidos ósseos recém-formados e melhorou a quantidade e a qualidade dos ossos regenerados in vivo.
Liu J et al (2020)	-	Investigar a diferenciação das	Osso alveolar, cimento e	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • As hPDLSC mostram de 	As hPDLSCs em meio osteogênico tinham altas

		hPDLSC em linhagens osteogênicas, fibrogênicas e cementogênicas para a regeneração do complexo periodontal : osso, cimento e ligamento periodontal, in vitro.	ligamento periodontal			diferenciação osteogênica, fibroblástica e cementoblástica comprovado por qT-PCR.	expressões de genes relacionados com os ossos e formaram nódulos minerais ósseos. As hPDLSCs em meio de diferenciação fibroblástica expressavam níveis mais elevados de genes relacionados com as fibras de ligamento periodontal. As hPDLSCs em meio cementogênico produziram cimento mineralizado e tinham altas expressões de genes relacionados com o cimento.
Du J et al (2018)	Ratos	Investigamos se o PRF (platelet- rich fibrin) é uma membrana adequada para fornecer aspirina localmente, e estudar se o complexo PRF/aspirina proporciona uma abordagem ideal para a regeneração funcional do tecido periodontal.	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal.	Elevação de retalhos bucais de espessura total com incisões sulculares dobráveis no primeiro molar maxilar. O osso alveolar entre a raiz mesial vestibular inferior e a raiz distal vestibular anterior foi removido utilizando uma broca cirúrgica e a raiz média vestibular extraída. A	<ul style="list-style-type: none"> • Platelet- rich fibrin • Aspirina (100113-201405, 99,8% de pureza) 	<ul style="list-style-type: none"> • A observação macroscópica mostra que o PRF e PRF+aspirina têm aspecto de gel. • A membrana PRF/aspirina tem capacidade de entregar aspirina, comprovado por absorvência. • A membrana PRF/aspirina aumenta a proliferação das hPDLSC, comprovado por observação microscópica e Western Blot. • A análise por Microtomografia Computadorizada revela que a 12 semanas pós implantação, os ratos que receberam a membrana PRF/aspirina houve a melhor regeneração óssea atingindo aproximadamente 15% de regeneração do defeito. • A análise histológica mostra que 	Este estudo demonstrou que o complexo PRF/aspirina poderia fornecer um microambiente físico químico adequado para aumentar a adesão e viabilidade das hPDLSC, e protegê-las do sistema imunitário do hospedeiro através de medicamentos anti-inflamatórios. O complexo PRF/aspirina promoveu a regeneração periodontal de defeitos em ratos.

				profundidade e a altura do defeito ósseo eram de 2 mm cada.		houve formação de novo cimento e fibras de colagénio tipo Sharpey ancoradas no novo cimento.	
Vaquette C et al (2019)	Ovinos	Avaliar a capacidade de 3 fontes de células : ligamento periodontal (PDLs), gengivais (GMSCs) e células mesenquimais derivadas da medula óssea (Bm-MSCs) - carregadas numa membrana bifásica para facilitar a regeneração num modelo de defeito periodontal do ovino cirurgicamente criado.	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal	Defeitos periodontais de deiscência criados cirurgicamente nos ovinos de 6 mm de altura x 5 mm de largura.	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana bifásica (electrospinning de solução para o compartimento periodontal e electrospinning de fusão para os compartimentos ósseos) 	<ul style="list-style-type: none"> • A observação através SEM mostra que o compartimento periodontal é fibroso e flexível e o compartimento ósseo é organizado aleatoriamente numa estrutura 3D altamente macroporosa com anéis de polímero dispostos de forma concêntrica. • A análise por Micro CT indica que os defeitos preenchidos pelas PDLSC e Bm-MSC mostram um preenchimento ósseo superior. • A análise histológica revela que nos sujeitos que receberam PDLSC, houve formação de novo cimento e ligamento periodontal e que o periodonto regenerado é vascularizado. • As imagens de alta amplificação e microscopia de luz polarizada mostram que as fibras de Sharpey estão ancoradas ao osso e cimento recém formados. • O transplante autólogo de PDLSC e Bm-MSC tiveram uma regeneração periodontal estatisticamente mais elevada comparada às GMSC. 	Foi demonstrado que a membrana bifásica estava bem integrada com os tecidos circundantes e resultou na regeneração periodontal. Utilizamos esta estrutura para comparar o desempenho de células de fontes diferentes e observamos que os Bm-MSCs e PDLs performaram de forma superior aos GMSCs.
Sánchez, N et al (2020)	Humanos	Avaliar a segurança e a eficácia clínica	Osso alveolar, ligamento	Presença de ≥1 dente com perda	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana de hidroxiapatita- 	<ul style="list-style-type: none"> • Os dentes mais tratados foram incisivos e caninos 	A utilização de PDL-MSC autólogos para fins de

		do uso de hPDLSC autólogos embebido numa membrana de hidroxiapatita-colágeno, para a regeneração de defeitos intra-ósseos de uma e duas paredes, quando comparado a membrana sozinha.	periodontal e cimento	de aderência clínica ≥ 6 mm e um defeito intra-ósseo de uma ou duas paredes. Presença de ≥ 2 mm de gengiva queratinizada no dente com o defeito.	colágeno <ul style="list-style-type: none"> Xenogenic Bone Substitute (XBS, Bio-Oss Collagen) 	seguidos pelos pré molares e molares. <ul style="list-style-type: none"> Nenhum paciente reportou efeito adverso relevante diferente dos "habituais" após uma cirurgia regenerativa. Não houve diferenças significativas no aspeto estético nem na qualidade de vida antes e após a intervenção. Observamos uma diminuição da CAL (Clinical Attachment Loss) assim como uma redução de PPD (Probing Pocket Depth) nos dois grupos mas o grupo com hPDLSC mostrou uma melhoria constante destes parâmetros clínicos durante 12 meses enquanto pelo grupo que recebeu somente a membrana, mostrou uma melhoria nos 6 primeiros meses mas com subsequente deterioração nos 6 meses seguintes. 	regeneração periodontal é segura, mas os resultados não demonstraram um benefício clínico acrescentado significativo após 12 meses, através deste protocolo de terapia celular, quando comparado com o controle.
Son H et al (2019)	-	Aplicar e avaliar um protocolo de descelularização que possa reter a integridade estrutural e remover eficazmente as células e o ADN, e testar in vitro o	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal.	-	<ul style="list-style-type: none"> Fatias de 3° molares sem cáries nem restauração. 	<ul style="list-style-type: none"> A análise histológica mostra que os protocolos são capazes de obter uma descelularização eficaz. A análise PCR revela que o protocolo de descelularização mais eficaz conseguiu reduzir de 60% a quantidade de ADN. Após semear as hPDLSC na 	As membranas de ligamento periodontal descelularizados de secções dentárias preservaram a sua estrutura, e o colagénio permaneceu na matriz extracelular. Têm também potencial para

		potencial de recelularização periodontal do modelo dentário humano descelularizado.				<p>membrana descelularizada, as células reabasteceram a membrana, comprovado por imunofluorescência.</p> <ul style="list-style-type: none"> • A expressão de genética de marcadores do osso alveolar, de cimento e do ligamento periodontal, foi aumentada, comprovado por qRT-PCR. 	recelularização e para induzir a expressão de genes relacionados com PDL e a regeneração óssea.
Zhang Y et al (2018)	-	Investigação de células estaminais MSCs derivadas de sete tipos diferentes de tecidos incluindo : células estaminais de polpa dentária (DPSCs), células estaminais do ligamento periodontal (PDLSCs), células estaminais mesenquimais gengivais (GMSCs) e células estaminais foliculares dentárias (DFSCs), células estaminais da medula óssea BM-MSCs e células estaminais derivadas de adiposidade (ADSCs) e um cordão umbilical de tecido perinatal associado ao nascimento	Osso alveolar	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Os marcadores de superfície específicos das células mesenquimais, foram expressos positivamente em todos os tipos de células, comprovado por citometria de fluxo. • A taxa de apoptose das hPDLSC baixa comparada a outras células. As hPDLSC têm o nível de expressão de proteínas pró apoptóticas o mais baixo, comprovado por Western Blot. • A coloração vermelha de Alizarin e a análise quantitativa demonstraram que BM-MSCs e ADSCs formaram os nódulos mais mineralizados seguidos por PDLSCs e DFSCs. 	Os MSC podem ser obtidos com sucesso a partir de vários tipos de tecidos, incluindo de origem dentária, somática e perinatal com uma abordagem semelhante. Todos têm capacidade de autorrenovação e diferenciação multidirecional sob a mesma condição cultural. Numa consideração abrangente da acessibilidade à fonte, proliferação, anti-apoptose e capacidade de diferenciação osteogénica, os PDLSC são considerados como uma boa alternativa potencial para os Bm-MSC na engenharia de tecidos ósseos.

		(UCMSCs). A morfologia, imunofenótipo, proliferação, anti-apoptose e capacidades de diferenciação osteogénica das diferentes células foram comparadas em condições idênticas.					
Qiu J et al (2020)	Ratos	Comparação do efeito das hGMSC na regeneração periodontal e o mecanismo subjacente com o efeito das hPDLSC.	Osso alveolar, cemento e ligamento periodontal.	O osso vestibular, horizontalmente da raiz mesial do primeiro molar mandibular até à raiz mesial do segundo molar mandibular e verticalmente do aspeto mais coronal da crista alveolar até à raiz apical, foi removido por turbomáquinas para expor as superfícies das raízes mesiais, médias e distais do primeiro molar mandibular. O defeito tinha aproximadamente 3 mm de largura, 2 mm de altura, e 1	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana de colágeno reabsorvível (Bio-Gide) 	<ul style="list-style-type: none"> • A análise imunohistoquímica revela que a partir de 2 semanas pós intervenção, observamos osso recém formado nos grupos que receberam hGMSC e hPDLSC. • A observação de cortes colorados em alta ampliação indica que a 4 semanas pós intervenção, o novo osso alveolar está mais denso, aparição de novo cemento-like tecido e fibras periodontais que se inserem no novo cemento e de maneira oblíqua ao novo osso. • A expressão de proteínas anti-inflamatórias foi comprovada por qRT-PCR pelos grupos que receberam transplante com hGMSC e hPDLSC, e o transplante de hGMSC mostra uma expressão mais alta entre todos os grupos. 	Os resultados mostraram que o transplante com hGMSC promoveu significativamente a regeneração periodontal de defeitos em ratos e alcançou um efeito similar aos hPDLSC.

				mm de profundidade.			
Albuquerque-Souza E et al (2020)	-	Colocamos a hipótese de duas moléculas diferentes e bem caracterizadas: RvE1 (Resolvin E1) e MaR1 (Maresin-1) com funções pró regenerativas previamente reportadas, restauraram a pluripotência, migração, viabilidade e diferenciação do hPDLSC suprimido pela inflamação.	Osso alveolar e cimento.	-	<ul style="list-style-type: none"> • Resolvin E1 • Maresin-1 	<ul style="list-style-type: none"> • Quando as hPDLSC estão submetidas a um ambiente inflamatório, perdem a pluripotência, mas ao adicionar RvE1 e MaR1, as células recomeçam a exprimir fatores característicos da pluripotência, comprovado por qRT-PCR. • As hPDLSC sob a ação de MaR1 e RvE1 conseguem recuperar as propriedades de viabilidade e migração e também aceleram a velocidade de cicatrização, comprovado por absorbância. • O acrescento de MaR1 e RvE1 no meio inflamatório também aumenta a expressão de genes relacionados com a osteogênese e cementogênese, comprovado por qRT-PCR. 	A principal descoberta deste estudo foi o forte impacto de Resolvin E1 e Maresin-1 no restabelecimento da função regenerativa das células estaminais que foram afetadas por um desequilíbrio pró-inflamatório.
Sano K et al (2020)	Ratos	Foi investigado as características dos esferóides co-cultivados contendo hPDLMSCs e HUVECs, e avaliamos a regeneração do tecido periodontal através do transplante de esferóides co-cultivados em defeitos do tecido periodontal.	Osso alveolar, cimento e ligamento periodontal	Os defeitos de furcação (profundidade vestibular, 1,3 mm; profundidade horizontal, 1,0 mm) foram criados na furcação mesial, removendo o osso alveolar, o ligamento periodontal e o cimento radicular	<ul style="list-style-type: none"> • HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) • Esferóides : platinum e PDMS (polydimethylsiloxane) 	<ul style="list-style-type: none"> • As células presentes nos esferóides apresentam as características de estaminalidade ; comprovado por qRT-PCR. • A co-cultura de esferóides reforçou o potencial osteogênico através do aumento da regulação dos genes relacionados com a osteogênese, comprovado por qRT-PCR. • A análise com Micro CT mostra preenchimento ósseo dos defeitos que recebem esferóides 	Os esferóides conseguiram obter uma regeneração do complexo periodontal, além disso, os esferóides co-cultivados melhoraram significativamente a formação de cimento nos defeitos do tecido periodontal do rato, em comparação com hPDLMSC cultivadas com esferóides.

				utilizando uma broca dentária.		<p>(hPDLMSC e HUVEC ou so hPDLMSC).</p> <ul style="list-style-type: none"> • A análise histológica com alta ampliação mostra que houve formação de fibras de Sharpey e novo cimento (mais formação de novo cimento no grupo de esferóides co-cultivados, comprovado por análise quantitativa). 	
--	--	--	--	--------------------------------	--	---	--

Tabela 1. Tabela de resultados

V. Discussão

A. Células estaminais do ligamento periodontal

1. Isolamento e condições de pré cultura

As células do ligamento periodontal humano são obtidas a partir de exodontias, os terceiros molares são os dentes de primeira escolha, uma vez que são frequentemente extraídos por razões ortodônticas, mas teoricamente qualquer dente pode ser utilizado (21). Este método de obtenção de células é ideal, uma vez que as células transplantadas são autólogas, evitando assim uma possível resposta imunitária do hospedeiro (22).

Com o objetivo de recolher as células, a primeira etapa é de raspar o ligamento da superfície das raízes, segue-se da corte dos tecidos em pequenos fragmentos e depois incubação a 37° durante 30 minutos até 1 hora numa solução de digestão enzimática (27), sendo a solução mais frequentemente usada na seleção de artigos, a mistura de *colagenase* / e *dispase* (9,13,15–18,20,23,24,26,27). Obteremos assim uma suspensão de células, que sementeamos em poços num meio de cultura standard para formar CFU, que são agregados de mais de 50 células. Em seguida faz-se uma expansão das CFU, que pode ser feita em meios de indução especializados, como os meios de diferenciação osteogénica, adipogénica e condrogénica (15,27). Por fim, graças a ferramentas de análise como a citometria de fluxo e a imunofluorescência, verificar-se-á se as células satisfazem os critérios das viabilidade para se poderem iniciar manipulações terapêuticas ou experimentais.

2. Propriedades

As células estaminais do ligamento periodontal são MSC, de facto têm capacidade de diferenciação osteogénica, adipogénica (15), condrogénica (13,23) e fibroblástica in vitro (15). Além disso, foi comprovado que a transplantação de PDLSC nos modelos animais permite regeneração do osso alveolar, de cemento e de fibras de ligamento periodontal orientadas (17).

Foi descoberto que as células estaminais do ligamento periodontal podem influenciar o quadro inflamatório do ambiente em que se encontram, foi verificado nos sujeitos animais que receberam transplante de hPDLSC, houve expressão de proteínas anti inflamatórias (25). Este facto é corroborado por outro estudo que mostrou que apos a transplantação de PDLSC, ocorreu uma mediação das vias inflamatórias nomeadamente na diminuição de TNF α (molécula que desencadeia a resposta inflamatória) e o aumento de IL 10 (proteína anti inflamatória), sugerindo assim um efeito anti inflamatório e parácrino destas células no ambiente de transplantação (17).

Por outro lado, entre os vários tipos de células estaminais dentárias, as do ligamento periodontal são as que têm a taxa de apoptose mais baixa, efetivamente foi demonstrado que têm o nível de expressão de proteínas pró apoptóticas o mais baixo (24).

B. Células estaminais do ligamento periodontal na regeneração do periodonto

1. Material de transplante

As membranas são ferramentas fundamentais na terapia com células estaminais, efetivamente devem ser um suporte fiável, ter boa retenção celular e ser compatíveis com o crescimento, proliferação e diferenciação celular (9,10). Existem membranas que são elaboradas de acordo com uma arquitetura biomimética do periodonto, nomeadamente separando um compartimento de tipo fibroso que corresponde ao PDL e cemento e outra parte concêntrica cujo objetivo é promover a formação de novo osso alveolar. Esta membrana bifásica demonstrou uma excelente adaptação, uma vez que após 10 semanas pós-transplante, o defeito ósseo criado cirurgicamente foi completamente substituído por novo osso alveolar, novas fibras de ligamento periodontal inseridas obliquamente no novo cemento e a criação de uma rede de vascularização dentro do periodonto recém-formado (11). O hidrogel termosensitivo também pode ser uma boa alternativa, em primeiro lugar porque oferece um ambiente ótimo para o desenvolvimento celular estimulando proliferação e diferenciação, mas também devido à sua consistência, porque pode ser injetado líquido preenchendo totalmente o defeito e com o aumento da temperatura vai solidificar e assim facilitar o crescimento celular (10).

2. Enxertos de células

Um vantagem da disponibilidade das MSCs é o facto de não existirem efeitos adversos imunológicos ou inflamatórios, uma vez que são as células do hospedeiro que serão recrutadas (28). Existe também materiais autólogos que permitem suportar células e as transplantar. O PRF é um gel 3D obtido pela centrifugação direita do sangue periférico, sem efeito tóxicos e imunológicos encontrados até hoje, barato, sem problemas éticos pela sua obtenção, fácil de manipulação para preencher o defeito e libera fatores de crescimento já presentes no sangue o que favorece o crescimento celular. Observámos, 24 dias após o transplante, a formação de novo osso alveolar preenchendo quase 100% do defeito criado cirurgicamente, bem como a formação de novo cimento e ligamento periodontal, no entanto, a orientação das fibras deste último é desorganizada, não permitindo uma regeneração periodontal ótima, uma vez que é necessário obter uma ancoragem sólida entre o cimento e o ligamento (12). O ligamento periodontal descelularizado pode também ser considerado como scaffold, uma vez que foi demonstrado que é possível conseguir a recelularização com hPDLSC. As vantagens destas membranas são que as secções dentárias mantiveram a sua estrutura, o colagénio permanece na matriz extracelular, bem como uma indução da expressão de genes envolvidos na regeneração do ligamento e do osso alveolar (22).

Os enxertos xenogénicos também são possíveis, com membrana âmnio semeadas com hPDLSC, nota-se uma formação significativa de novo osso no defeito comparada ao grupo controlo (só a membrana), formação de tecido fino tipo cimento e foram visíveis fibras perpendicularmente orientadas na superfície da raiz. No entanto, a análise de imunofluorescência revelou que o número de células incorporadas no defeito diminui com o tempo, indicando que os novos tecidos foram formados indiretamente pelas células, sugerindo um efeito parácrino destas últimas (9). Esta ideia é corroborada pelo facto de que, mesmo sem a adição de células, podem ser obtidas alterações a favor da regeneração periodontal. De facto, foi verificado que as células submetidas à força mecânica favorecem um aumento da diferenciação osteoclástica, o que permite uma modulação da homeostasia do capital ósseo (16).

3. Co-transplantações

As células podem ser co-transplantadas para aumentar o seu potencial regenerativo, efetivamente quando co-transplantadas com HUVEC, há uma indução de calcificação precoce, bem como uma promoção do potencial osteogénico e cementogénico através da up-regulação de genes e uma melhoria da renovação das células disponíveis (26). Por outro lado, constatou-se que a sobre expressão de PDGF-BB (citocina presente no soro que medeia o crescimento de vários tipos de células, bem como a resposta anti-inflamatória nos tecidos moles) nas hPDLSC aumenta significativamente a proliferação e diferenciação osteoclástica, mas também as hPDLSC que exprimem PDGF BB no hidrogel são as que mais preencherem o defeito ósseo, atingindo uma regeneração de 70% as 8 semanas pós intervenção (10).

Da mesma forma, a utilização da membrana PRF combinada com aspirina aumenta significativamente a proliferação das hPDLSC e formação de novo osso, a 12 semanas pós intervenção, conseguimos obter a melhor regeneração óssea atingindo aproximadamente 15% de regeneração do defeito. Foi também observado fibras de colagénio tipo Sharpey orientadas ancoradas firmemente no cimento neoformado. Essa combinação permite uma implementação das vantagens do PRF com as da aspirina nomeadamente melhor ambiente pela diferenciação, migração celular e proteção com a resposta auto imune do hospedeiro com a entrega diferida de aspirina (20).

A simvastatina, que é um fármaco hipocolesterolemizante demonstrou possuir efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anabolizantes ósseos, foi co-transplantado numa membrana semeada com hPDLSC. Obtivemos uma aumento da diferenciação osteogénica das hPDLSC e maior acumulação de matriz mineralizada in vitro. Promoveu significativamente a formação de "cementum like" tecido e fibras de colagénio bem aderidas ao novo cimento e também criação de novos vasos sanguíneos (19).

4. Modulações das propriedades celulares

As células podem também ser submetidas a um tratamento anterior ao transplante. A utilização de rhmBP2 em pré tratamento de folhas de células para efetuar um enxerto permitiu uma promoção significativa da regeneração do complexo periodontal por meio de uma mineralização mais precoce das folhas (23). Na mesma ideia, MSM que é um grupo sulfato presente em algumas sementes e vegetais conhecido por ter propriedades anti-inflamatórias e de redução da dor periférica, mostrou ter um efeito na diferenciação osteogénica aumentando a proporção de marcadores osteogénicos específicos (13).

Foram desenvolvidas coterapias para reforçar a capacidade das células, de facto, o tratamento com SDF-1/EX-4 (SDF-1 : quimiocina de sinalização que promove a diferenciação e proliferação de células estaminais in vitro e promove a regeneração vascular in vivo e EX-4 : glucagon agonista, que tem um efeito anti-inflamatório e promove a diferenciação e migração das células estaminais) aumentou a proliferação, a migração e a diferenciação osteogénica das hPDLSC in vitro. Após o transplante de células, obtivemos uma promoção da formação de osso alveolar denso similar ao osso original e expressão proteica de marcadores relacionados com a osteogénese nos tecidos regenerados mas também a osteoclastogénese para iniciar turnover das células afim de formar novo osso com o recrutamento de células hospedeiras (14). MaR1 e RvE1 são lipídios especializados na resolução inflamatória (nomeadamente RvE1 que permite a indução da regeneração óssea e cementogénica, e MaR1 conhecido para aumentar a velocidade de cicatrização e evidências na regeneração de outros órgãos) conseguiram recuperar as propriedades de viabilidade e migração das células submetidas a um meio inflamatório, aumentam a expressão de genes relacionados com a osteogénese e cementogénese mas também aceleram o processo de cicatrização (18).

C. Limitações

As células estaminais do ligamento periodontal oferecem-nos um vasto espectro de opções terapêuticas, no entanto vários parâmetros limitam a sua utilização. O primeiro a ser mencionado é a falta de ensaios clínicos em humanos, uma vez que os resultados encorajadores que temos relatado são, na sua maior parte, estudos em animais (9–14,16,17,19,20,23,25,26) e, portanto, pouco representativos dos destinatários finais do desenvolvimento desta terapia.

O ambiente inflamatório deve ser considerado, de facto, se houver necessidade de regeneração periodontal, é muito provável que o paciente sofra de uma infeção oral, mesmo que o MaR1 e o RvE1 (18) nos tenham mostrado um forte potencial anti-inflamatório, seria necessário desenvolver mais medidas para gerir o processo inflamatório, em particular através do desenvolvimento de materiais autólogos (12,20,22), uma vez que os materiais não absorvíveis aumentam o risco de infeção pós-operatória (28).

A disponibilidade e a viabilidade das células levantam questões sobre a fonte das células, uma vez que é bastante "simples" obter as células, principalmente por extração dentária de indivíduos saudáveis e relativamente jovens (9,10,13,15,18–24,26). Contudo, pode acontecer que as condições de saúde do paciente que necessita o enxerto não permitam a extração, pelo que será necessário obter uma grande proliferação a partir de outros dadores, razão pela qual é necessário continuar as investigações sobre a proliferação e diferenciação celular (15,16,18).

Constatámos também que no único estudo humano desta revisão, durante o período pós intervenção, nenhum paciente reportou efeito adverso relevante diferente dos "habituais" após uma cirurgia regenerativa, mas nem houve diferenças significativas no aspeto estético nem na qualidade de vida antes e após a intervenção (21). Coloca-se então a questão do interesse real desta terapêutica.

VI. Conclusão

O objetivo desta revisão é determinar se as células estaminais do ligamento periodontal têm o potencial de se tornarem uma ferramenta clínica importante nas terapias de regeneração periodontal. De facto, mostram um forte potencial regenerativo do periodonto, conseguindo, quando transplantadas com diferentes materiais, regenerar o osso alveolar, o cimento, bem como as fibras do ligamento periodontal ancoradas entre estas duas estruturas.

Entre as propriedades regenerativas, foi constatado que as células têm um efeito parácrino, influenciando as células circundantes tanto na proliferação como na diferenciação. O ambiente em que as células se encontram influencia-as em grande medida, de facto, perdem as suas propriedades de pluripotência quando sujeitas a um ambiente inflamatório, mas ao associar as células com determinadas moléculas é possível inverter a tendência e restaurar as suas propriedades.

Mesmo com resultados satisfatórios, persiste o problema da falta de estudos em sujeitos humanos. De facto, há uma falta de perspetiva sobre os transplantes de células estaminais do ligamento periodontal em pacientes reais. Por isso, ainda não é possível dar uma resposta binária como sim ou não sobre a utilidade clínica das células estaminais do ligamento periodontal, mas pode assegurar-se que os resultados obtidos devem encorajar mais investigações na área.

VII. Referencias bibliográficas

1. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2006 Feb;40(1):11–28.
2. Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Jun 22;3(1):17038.
3. STEFFENS JP, MARCANTONIO RAC. Classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares 2018: guia Prático e Pontos-Chave. *Rev Odontol UNESP*. 2018 Aug;47(4):189–97.
4. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Alhareky M, Gaffar B, Almas K. Global Prevalence of Periodontal Disease and Lack of Its Surveillance. *The Scientific World Journal*. 2020 May 28;2020:1–8.
5. Fischer RG, Lira Junior R, Retamal-Valdes B, Figueiredo LC de, Malheiros Z, Stewart B, et al. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America. Section V: Treatment of periodontitis. *Braz Oral Res*. 2020;34(suppl 1).
6. Ramseier CA, Anerud A, Dulac M, Lulic M, Cullinan MP, Seymour GJ, et al. Natural history of periodontitis: Disease progression and tooth loss over 40 years. *J Clin Periodontol*. 2017 Dec;44(12):1182–91.
7. Sanz M, Herrera D, Kerschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, et al. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. *J Clin Periodontol*. 2020 Jul 27;47(S22):4–60.
8. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources. Vol. 56, *Journal of Prosthodontic Research*. 2012. p. 151–65.
9. Iwasaki K, Akazawa K, Nagata M, Komaki M, Honda I, Morioka C, et al. The fate of transplanted periodontal ligament stem cells in surgically created periodontal defects in rats. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 1;20(1).

10. Pan J, Deng J, Luo Y, Yu L, Zhang W, Han X, et al. Thermosensitive Hydrogel Delivery of Human Periodontal Stem Cells Overexpressing Platelet-Derived Growth Factor-BB Enhances Alveolar Bone Defect Repair. *Stem Cells Dev.* 2019 Dec 15;28(24):1620–31.
11. Vaquette C, Saifzadeh S, Farag A, Hutmacher DW, Ivanovski S. Periodontal Tissue Engineering with a Multiphasic Construct and Cell Sheets. *J Dent Res.* 2019 Jun 1;98(6):673–81.
12. Duan X, Lin Z, Lin X, Wang Z, Wu Y, Ji M, et al. Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Mol Med.* 2018 Feb 1;22(2):1047–55.
13. Ha SH, Choung PH. MSM promotes human periodontal ligament stem cells differentiation to osteoblast and bone regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jul 12;528(1):160–7.
14. Liang Q, Du L, Zhang R, Kang W, Ge S. Stromal cell-derived factor-1/Exendin-4 cotherapy facilitates the proliferation, migration and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells in vitro and promotes periodontal bone regeneration in vivo. *Cell Prolif.* 2021 Mar 1;54(3).
15. Liu J, Zhao Z, Ruan J, Weir MD, Ma T, Ren K, et al. Stem cells in the periodontal ligament differentiated into osteogenic, fibrogenic and cementogenic lineages for the regeneration of the periodontal complex. *J Dent.* 2020 Jan 1;92.
16. Jin SS, He DQ, Wang Y, Zhang T, Yu HJ, Li ZX, et al. Mechanical force modulates periodontal ligament stem cell characteristics during bone remodelling via TRPV4. *Cell Prolif.* 2020 Oct 1;53(10).
17. Liu J, Chen B, Bao J, Zhang Y, Lei L, Yan F. Macrophage polarization in periodontal ligament stem cells enhanced periodontal regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2019 Nov 15;10(1).
18. Albuquerque-Souza E, Schulte F, Chen T, Hardt M, Hasturk H, Van Dyke TE, et al. Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal

- Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol.* 2020 Sep 25;11.
19. Zhao B, Chen J, Zhao L, Deng J, Li Q. A simvastatin-releasing scaffold with periodontal ligament stem cell sheets for periodontal regeneration. *J Appl Biomater Funct Mater.* 2020;18.
 20. Du J, Mei S, Guo L, Su Y, Wang H, Liu Y, et al. Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats. *J Periodontal Res.* 2018 Feb 1;53(1):47–56.
 21. Sánchez N, Fierravanti L, Núñez J, Vignoletti F, González-Zamora M, Santamaría S, et al. Periodontal regeneration using a xenogeneic bone substitute seeded with autologous periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: A 12-month quasi-randomized controlled pilot clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2020 Nov 1;47(11):1391–402.
 22. Son H, Jeon M, Choi HJ, Lee HS, Kim IH, Kang CM, et al. Decellularized human periodontal ligament for periodontium regeneration. *PLoS One.* 2019 Aug 1;14(8).
 23. Park JY, Park CH, Yi T, Kim SN, Iwata T, Yun JH. RhBMP-2 pre-treated human periodontal ligament stem cell sheets regenerate a mineralized layer mimicking dental cementum. *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 1;21(11).
 24. Zhang Y, Xing Y, Jia L, Ji Y, Zhao B, Wen Y, et al. An in Vitro Comparative Study of Multisource Derived Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Stem Cells Dev.* 2018 Dec 1;27(23):1634–45.
 25. Qiu J, Wang X, Zhou H, Zhang C, Wang Y, Huang J, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by conditioned media from gingiva-derived or periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: A comparative study in rats. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Feb 3;11(1).
 26. Sano K, Usui M, Moritani Y, Nakazawa K, Hanatani T, Kondo H, et al. Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular

endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration. *Regen Ther.* 2020 Jun 1;14:59–71.

27. Al-Habib M, Huang GTJ. Dental mesenchymal stem cells: Dental pulp stem cells, periodontal ligament stem cells, apical papilla stem cells, and primary teeth stem cells— isolation, characterization, and expansion for tissue engineering. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2019. p. 59–76.
28. Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, et al. Periodontal bone-ligament-cementum regeneration via scaffolds and stem cells. Vol. 8, *Cells*. MDPI; 2019.