

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A CONTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO LIGAMENTO PERIODONTAL NUMA ÓPTICA DE REGENERAÇÃO DOS TECIDOS, UMA REVISÃO INTEGRATIVA DOS ESTUDOS IN VIVO

Trabalho submetido por
Romain Pierre Podembski
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

julho de 2024

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

A CONTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS ESTAMINAIS DO LIGAMENTO PERIODONTAL NUMA ÓPTICA DE REGENERAÇÃO DOS TECIDOS, UMA REVISÃO INTEGRATIVA DOS ESTUDOS IN VIVO

Trabalho submetido por
Romain Pierre Podembski
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por e coorientado por
Prof. Doutor Isabel Barahona
Mestre Catarina Izidoro

julho de 2024

"Na dúvida, faça o bem"

AGRADECIMENTOS

Je voudrais dans un premier temps remercier la Professeure Barahona, qui a depuis le début cru en ce projet. D'une phrase échangée dans un laboratoire de bicellulaire à un projet complet, je vous dis un grand merci. Merci pour l'attention, la confiance et votre investissement total tout au long de ce projet.

Je remercie également ma co-orientatrice la Professeur Izidoro pour tout son investissement concernant ce projet, ainsi que pour les nombreuses corrections et relectures.

Je souhaite également remercier dans un derniers temps le Professeur Mascarenhas, pour nos nombreuses réunions non-prévues, et pour le temps dédié à m'expliquer avec pédagogie les principes fondamentaux d'une révision intégrative.

Je remercie également l'institut Universitário Egas Moniz, qui nous permet d'apprendre à devenir de bon dentistes, avec de bonnes valeurs.

Je remercie mon père, ma mère et mon frère, sans qui, toute cette histoire n'aurait pas été possible, merci d'avoir cru en moi surtout après 2 années compliquées. Merci d'avoir tout donné pour m'offrir des études incroyables et surtout une belle vie plus tard, jamais je n'oublierai cela. Je souhaite remercier ma famille, sans qui cette aventure lisboète n'aurait pas été possible, un grand merci à ma grand-mère, mon grand-père ainsi que ma tata et sa famille pour le soutien continu.

Je remercie mon ami Alexis, sans quoi ce projet aurait été impossible à réaliser, merci de la motivation que nous nous sommes insufflés tous les jours depuis janvier afin de terminer ce projet dans les meilleurs délais, et merci de ta capacité d'écoute dans les moments de doute rédactionnel.

Dans un dernier temps, je souhaite remercier mes amis proches, Rodrigo, Acal, L-A, Audrey, Rania, Zoé, Gaspard, Marie, Pierre et Axel pour toute la force que vous m'avez donné afin de concrétiser cette aventure Lisboète. Sans vous et sans votre soutien rien de tout cela n'aurait été possible.

RESUMO

Introdução: O início da engenharia de tecidos a partir dos anos 2000 abriu novas possibilidades no tratamento de várias doenças. Infelizmente, estas tecnologias ainda têm limitações, mas a identificação de células estaminais do ligamento periodontal, nos vários estudos desenvolvidos em engenharia tecidual mostram que é possível regenerar tecidos danificados pela periodontite. Nos últimos anos, muitos tratamentos têm sido desenvolvidos em engenharia de tecidos com o objetivo de regenerar danos teciduais causados pela periodontite.

Objetivos: O objetivo final desta revisão integrativa (RI) é avaliar o potencial terapêutico e clínico das células estaminais do ligamento periodontal para tratamentos futuros da periodontite.

Materiais e Métodos: Nesta revisão narrativa foram utilizadas 3 bases de dados digitais *PubMed*, *Web of Science*, *Cochrane* para selecionar os estudos em que foram transplantadas células estaminais do ligamento periodontal para áreas com defeitos tecidulares causados por periodontite. Utilizando a metodologia PICO sintetizaram-se os resultados de 12 artigos, 11 tratam da transplantação em animais e um da transplantação em seres humanos.

Resultados: A análise de 12 estudos mostra após o transplante, uma melhoria significativa na perda de inserção, e graças à análise histológica e tomográfica uma regeneração dos três principais tecidos do periodonto, ou seja, osso, ligamento periodontal e cemento contribuindo para a restauração da inserção periodontal, sem quaisquer efeitos adversos.

Conclusões: Esta revisão integrativa destaca o potencial significativo das células estaminais do ligamento periodontal para a regeneração periodontal. Os resultados atuais ainda exigem uma investigação mais aprofundada. Estudos clínicos maiores e de longo prazo são necessários para avaliar melhor a eficácia e a segurança desta abordagem regenerativa.

Palavras-chave: Ligamento Periodontal, Transplante de Células, Células Estaminais, Periodontite.

ABSTRACT

Introduction: The beginning of tissue engineering in the 2000s opened up new possibilities in the treatment of various diseases. Unfortunately, these technologies still have limitations, but the identification of periodontal ligament stem cells in the various studies developed in tissue engineering show that it is possible to regenerate tissues damaged by periodontitis. In recent years, many treatments have been developed in tissue engineering with the aim of regenerating tissue damage caused by periodontitis.

Objectives: The ultimate goal of this integrative review (IR) is to evaluate the therapeutic and clinical potential of periodontal ligament stem cells for future treatments of periodontitis.

Materials and Methods: In this narrative revision, 3 digital databases *PubMed*, *Web of Science*, *Cochrane* were used to select studies in which periodontal ligament stem cells were transplanted into areas with tissue deficiencies caused by periodontitis. In this integrative review, the results of 12 articles are synthesized, 11 dealing with transplantation in animals and one with transplantation in humans.

Results: The analysis of 12 studies shows after transplantation, a significant gain in the attachment loss, and thanks to the histological and tomographic analysis a regeneration of the three main tissues of the periodontium, bone, periodontal ligament and cementum contributing to the restoration of periodontal attachment, without any adverse effects.

Conclusions: This integrative review highlights the significant potential of periodontal ligament stem cells for periodontal regeneration. The current results still require further investigation. Larger, long-term clinical studies are needed to better evaluate the efficacy and safety of this regenerative approach.

Keywords : Periodontal ligament, Cell transplantation, Staminal cells, Periodontitis.

ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO: DA PERIODONTOLOGIA A ENGENHARIA TECIDUAL.....	15
1.1.	Generalidades em periodontologia	15
1.1.1.	Anatomia do periodonto.....	15
1.1.2.	Gengivite	18
1.1.3.	Periodontite.....	19
1.1.4.	Análise da representação gráfica de cortes teciduais	19
1.2.	Reabsorção tecidual e óssea	20
1.2.1.	Mecanismo	20
1.2.2.	Morfologia dos defeitos ósseos	23
1.2.3.	Princípios de cicatrização de Tecidos	26
1.3.	Engenharia de Tecidos	29
1.3.1.	Conceito de Engenharia de Tecidos.....	29
1.3.2.	Scaffolds	30
1.3.3.	Fatores de Crescimento	31
1.3.4.	Células estaminais	32
II.	MATERIAS E METODOS	37
2.1.	Formulação da problemática de investigação	37
2.1.1.	População.....	37
2.1.2.	Intervenção	37
2.1.3.	Comparação	37
2.1.4.	Resultado.....	37
2.2.	Estratégia de pesquisa	37
2.3.	Critérios de elegibilidade	38
2.3.1.	Critérios de inclusão	38
2.3.2.	Critérios de exclusão.....	39
2.4.	Seleção dos estudos.....	39
2.4.1.	Escolha dos estudos	39
2.4.2.	Recolha de dados.....	39
2.4.3.	Avaliação da qualidade	39
III.	RESULTADOS	41
3.1.	Resultados da estratégia de investigação	41
3.2.	Descrição geral das características dos estudos	43

3.3.	Síntese dos estudos	45
3.4.	Resultados da avaliação do Risco de enviesamento	51
IV.	<i>DISCUSSÃO</i>.....	53
4.1.	Caracterização das PDLSC.....	53
4.2.	Métodos de extração e cultura.....	55
4.3.	Scaffolds.....	56
4.4.	Análise corte histológico	57
4.5.	Análise dos resultados	59
V.	<i>CONCLUSÃO</i>	63
VI.	<i>PERSPETIVAS FUTURAS</i>	65
VII.	<i>Bibliografia</i>.....	67
VIII.	<i>ANEXOS</i>.....	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Os componentes do periodonto subdivididos em tecidos moles e duros (Modificado de Bouchard, 2015). BM: bordo marginal; CID: Contato interdental; GA: gengiva inserida; GM: gengiva marginal ou livre; LC: lâmina cribiforme; LMG: linha mucogengival; OC: osso cortical; OS: osso esponjoso; SM: ranhura marginal.....	15
Figura 2 : Vista frontal do sistema de inserção gengival (Modificado de Bouchard, 2015). BM: borda marginal; CID: Contato interdental; GA: gengiva inserida; LMG: linha mucogengival; SM: ranhura marginal; MA: mucosa alveolar.....	16
Figura 3: Secção transversal do sistema de inserção gengival (Modificado de Bouchard, 2015). JAC: junção amelocementária.	16
Figura 4 : Detalhes do ligamento periodontal (Modificado de H. F. Wolf, 2005). 13: fibras colagénias; D: dentina; C: cimento; CB: cementoblastos; FIB: fibroblastos; OB: osteoblastos; A: osso alveolar.	17
Figura 5 : Fotografia vestibular intraoral do 5 sextante, saudável (esquerda) e inflamado (direita) (Adaptado de H. F. Wolf, 2005).	18
Figura 6 : Representações gráficas de seções longitudinais da gengiva (da esquerda para a direita): saudável (A), inflamada com gengivite (B) e periodontite (C). Rosa: bactérias; Azul: PMNs; Verde: osso (Modificado de H. F. Wolf, 2005).....	19
Figura 7 : Representação dos diferentes grupos de bactérias na microbiota oral de acordo com a sua patogenicidade (Modificado de Socransky S, 1998).	21
Figura 8 : Diagrama correlacionando PAMPs e seus efeitos destrutivos (Modificado de Hans, 2011). ...	22
Figura 9 : Crista óssea saudável (A), lesão horizontal (B) e lesão óssea vertical (C) (Modificado de H. F. Wolf, 2005).	24
Figura 10 : Representação das diferentes morfologias dos defeitos intraósseos (Modificado de H. F. Wolf, 2005).....	25
Figura 11 : Classificação Horizontal de Defeitos Inter-Radiculares (Modificado de H. F. Wolf, 2005)...	25
Figura 12 : Ordem cronológica da colonização tecidual de uma superfície radicular (Modificado de Bouchard, 2015).	26
Figura 13 : Fases de cicatrização do tecido conjuntivo (Modificado de Bouchard, 2015).....	28
Figura 14 : Tríade de Engenharia de Tecidos (Modificado de Lanza et al., 2011).....	29
Figura 15 : Diagrama da divisão celular assimétrica (esquerda) e simétrica (direita) (Modificado de PLA, 2021).....	32
Figura 16 : 3 camadas embrionárias, a ectoderme, a endoderme e a mesoderme (Modificado de Bouillon, 2008).	33
Figura 17 : Fluxograma de acordo com as guidelines PRISMA.	42
Figura 18 : Ano de publicação dos estudos.	43
Figura 19 : Distribuição dos artigos por país.	43
Figura 20 : Distribuição dos diferentes modelos de hospedeiros.....	44

Figura 21 : Distribuição dos diferentes modelos de hospedeiros.....	44
Figura 22 : Gráfico Traffic light plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento com estudos animais.....	51
Figura 23 : Gráfico summary plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento dos estudos com animais.....	51
Figura 24 : Gráfico Traffic light plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento dos estudos humanos.	52
Figura 26 : PDLSC com microscópio eletrônico de varrimento (1200x) (H) e transmissão (5200x) (I, J) (Adaptado do Yi Liu, 2008).	54
Figura 25 : PDLSC com microscópio ótico (100x) (Adaptado do Jiling Qiu 2020).....	54
Figura 27 : Corte histológico analisando os resultados do transplante de PDLSC. A: Grupo padrão; B: Grupo Gelfoam; C: Grupo Gelfoam + PDLSC.	57
Figura 28 : Corte histológico analisando a regeneração do cimento. A: Grupo padrão; B: Grupo Gelfoam; C: Grupo Gelfoam + PDLSC. Cem: Cimento (Adaptado do Krzysztof Marek Mrozik, 2013).....	58
Figura 29 : Corte histológico analisando o ligamento periodontal. A, D: Grupo padrão; B, E: Grupo Gelfoam; C, F: Grupo Gelfoam + PDLSC. CT : tecido de conexão (Adaptado do Krzysztof Marek Mrozik, 2013).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Diferentes grupos de células estaminais adultas.	34
Tabela 2 : Referências e motivo de exclusão de itens potencialmente elegíveis.	41
Tabela 3 : Síntese dos estudos.	45
Tabela 4 : Listagem dos scaffolds utilizados em cada estudo.	56

LISTA DE SIGLAS

PDLSC: células estaminais do ligamento periodontal
BM: bordo marginal
CID: contato interdentário
GA: gengiva inserida
GM: gengiva marginal ou livre
LC: lâmina cribriforme
LMG: linha mucogengival
OC: osso cortical
OS: osso esponjoso
SM: ranhura marginal
JAC: junção amelocementária
D: dentina
C: cimento
CB: cementoblastos
FIB: fibroblastos
MA: mucosa alveolar
OB: osteoblastos
PMNs: células polimorfonucleares
CSV: compostos sulfurosos voláteis
PRRs: recetores de reconhecimento de padrões
PAMPs: padrões moleculares associados a patogénicos
LPS: lipopolissacarídeos bacterianos
DNA: ácido desoxirribonucleico
RNA: ácido ribonucleico
TLRs : recetores do tipo toll
MMPs : metaloproteinases
PGE2 : prostaglandine E2
IL-1/IL-8 : interleucina 1/2
TNF α : fator de necrose tumoral alpha
RANK: recetor do ativador nuclear kB
RANK-L: ligante do recetor do ativador nuclear kB

OPG: oesteoprotegirina
PLGA: ácido poliácido-co-glicólico
PEG: polietilenoglicol
PCL: policaprolactona
FGF: fator de crescimento fibroblástico
BMP: proteína morfogénica óssea
EGF: fator de crescimento epidérmico
TGF: fator de crescimento transformador
PDGF: fator de crescimento plaquetário
ESC: células estaminais embrionárias
iPSC: células estaminais pluripotentes induzidas em laboratório
MSC: células estaminais mesenquimais
HSC: células estaminais hematopoiéticas
DSC: células estaminais dentárias
SHED: células estaminais de dentes decíduos esfoliados
DFSC: células estaminais do folículo dentário
SCAP: células estaminais da papila dentária apical
DPSC: células estaminais da polpa dentária
HA: hidroxiapatita
TCP: fosfato tricálcico
PRF: fibrina rica em plaquetas

INTRODUÇÃO

"A periodontite é a segunda doença crónica mais comum nos Estados Unidos"

Centers for Disease Control and Prevention

A saúde da cavidade oral é um indicador do nosso estado geral de saúde e pode fornecer-nos informações valiosas sobre nossa condição física como um todo. A especialidade dentária conhecida como periodontologia clínica dedica-se ao estudo e ao cuidado das estruturas de suporte dos dentes, essenciais para a funcionalidade e aparência dos dentes, mas também muito importantes como indicadoras, permitindo a prevenção de distúrbios mais graves que podem afetar o organismo humano (Petersen, 2003).

As doenças periodontais, nomeadamente a periodontite, afecta já 1 087,37 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma prevalência global de 50% (Cui, 2023). Estas doenças podem levar a problemas que vão desde a inflamação das gengivas até a perda de dentes (Pihlstrom, 2005).

Este estudo visa explorar os desafios mais urgentes e fascinantes da periodontologia clínica utilizando os avanços da engenharia dos tecidos, em particular o potencial do transplante de células estaminais da cavidade oral para reparar os danos nos tecidos causados pela periodontite. Através da análise de vários estudos clínicos, este trabalho pretende encontrar respostas a perguntas atuais e, assinalar novos desafios que poderão estimular estudos futuros.

Ao prosseguir este trabalho científico, o objetivo final continua a ser a melhoria da saúde e da qualidade de vida dos pacientes. É com esse objetivo em mente que esta tese visa enriquecer compreensão da periodontologia clínica, um campo amplo e em constante desenvolvimento.

I. INTRODUÇÃO: DA PERIODONTOLOGIA A ENGENHARIA TECIDUAL

1.1. Generalidades em periodontologia

1.1.1. Anatomia do periodonto

O periodonto é o agrupamento de tecidos que suportam e sustentam o dente na cavidade oral. Podemos dividir o periodonto em um compartimento superior composto principalmente pela gengiva e um compartimento inferior formado pelo ligamento periodontal, cemento radicular e o osso alveolar (**Figura 1**) (Bouchard et al, 2015). O periodonto também se pode dividir em tecidos moles (gengiva e ligamento periodontal) e em tecidos duros (cemento, osso alveolar) (**Figura 1**).

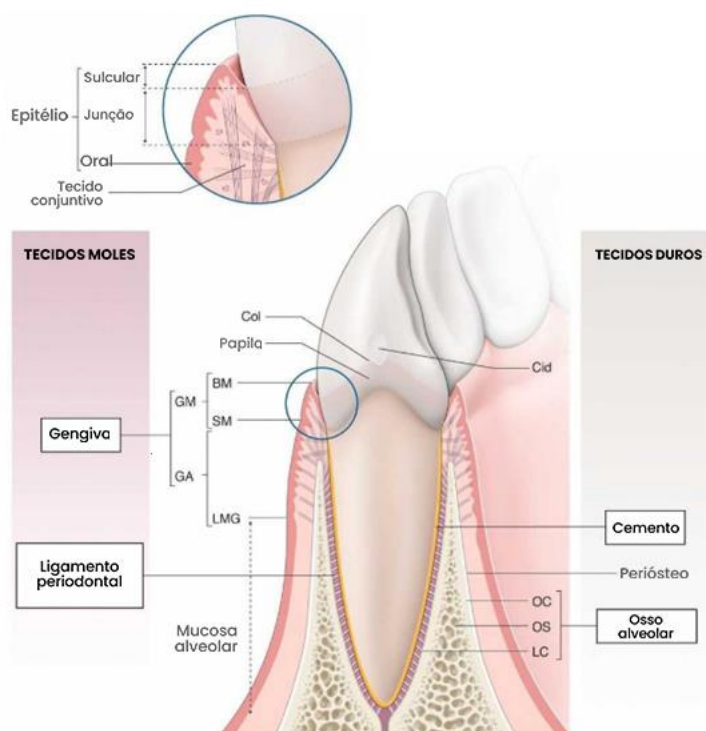


Figura 1: Os componentes do periodonto subdivididos em tecidos moles e duros (Modificado de Bouchard et al, 2015). BM: bordo marginal; CID: Contato interdentário; GA: gengiva inserida; GM: gengiva marginal ou livre; LC: lâmina cribriforme; LMG: linha mucogengival; OC: osso cortical; OS: osso esponjoso; SM: ranhura marginal.

A gengiva, também conhecida como tecido gengival, é uma mucosa mastigatória oral que protege as raízes dos dentes e o osso alveolar. A gengiva está separada da mucosa oral, vermelha, vascularizada pela linha mucogengival (LMG) (**figura 2**).

A gengiva divide-se em 3 partes. A gengiva inserida (GA), mede em média de 4-6 mm tem cor rosa, está firmemente ligada ao osso alveolar, cemento e periosteio e é fortemente queratinizada. A gengiva inserida está separada da gengiva livre ou marginal (GM) pelo sulco gengival marginal (SM) que é uma estrutura discreta, por vezes invisível,

localizada na junção amelocementária (JAC). A gengiva livre está em contacto direto com as superfícies dentárias, tem uma cor rosa-pálida e está parcialmente queratinizada, o que lhe confere uma estrutura mais macia e menos resistente do que a gengiva inserida. Mede cerca de 1,5 mm e corresponde às alturas do sulco (0,5 mm) e da inserção epitelial (1 mm) (**figura 3**). Finalmente, a gengiva interdentária corresponde à extensão da gengiva livre entre os dentes que tem as mesmas características que a gengiva inserida, mas o colo varia em 2-6 mm e não é queratinizada (Bouchard et al, 2006).

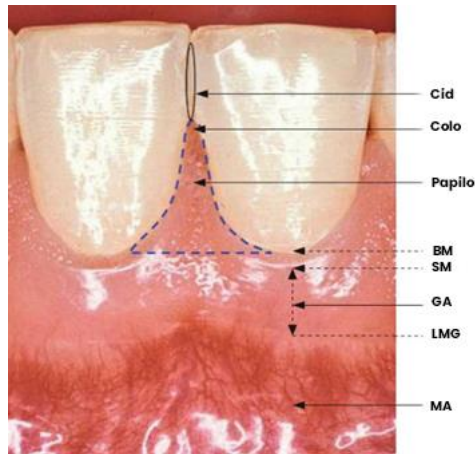


Figura 2 : Vista frontal do sistema de inserção gengival (Modificado de Bouchard et al, 2015). BM: borda marginal; Cid: Contato interdental; GA: gengiva inserida; LMG: linha mucogengival; SM: ranhura marginal; MA: mucosa alveolar.

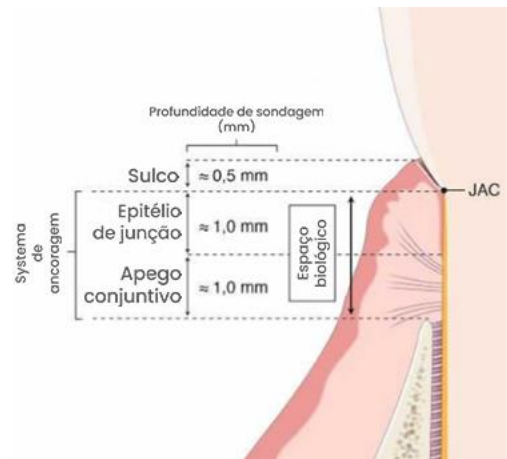


Figura 3: Secção transversal do sistema de inserção gengival (Modificado de Bouchard et al , 2015). JAC: junção amelocementária.

Histologicamente, a gengiva é constituída por tecido epitelial e tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo é constituído por uma matriz extracelular, que inclui fibras de colagénio (representando 60% do volume tecidular), e de elastina, fibroblastos, células imunitárias, ainda vasos sanguíneos e nervos. O epitélio gengival de células escamosas, não é vascularizado nem inervado (Hubert E. Schroeder, 1997). Pode-se dividir em epitélio oral, que reveste a cavidade oral, é queratinizado e termina ao nível do bordo marginal, em epitélio sulcular, que se encontra à frente do dente sem a ele aderir, e não é queratinizado e finalmente, em epitélio juncional que garante a união entre a gengiva e o dente através dos hemidesmosomas ligados às fibras de queratina das células epiteliais. O epitélio juncional associado ao tecido conjuntivo compõe o sistema de ancoragem, também conhecido como espaço biológico (**Figura 3**) (H. F. Wolf et al, 2005).

O ligamento periodontal mede em média 0,3 mm é um tecido conjuntivo denso que envolve a raiz dos dentes e liga ao osso alveolar. A sua principal função é garantir a estabilidade dentária permitindo simultaneamente alguma mobilidade, necessária para o movimento da mastigação. Este ligamento permite responder às forças ortodônticas, às sensações, à propriocepção, e tem um papel no suporte imunológico (Bouchard et al, 2015). O ligamento periodontal é formado por fibroblastos e uma matriz extracelular contendo principalmente fibras de colagénio (80% do tipo I e 15% do tipo III), água, proteoglicanos e glicosaminoglicanos. No ligamento periodontal ainda se encontram várias outras células como osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos, restos do epitélio de Malassez, macrófagos, e ainda células mesenquimais indiferenciadas e células de defesa (monócitos, macrófagos) (**Figura 4**) (Ho et al, 2010).

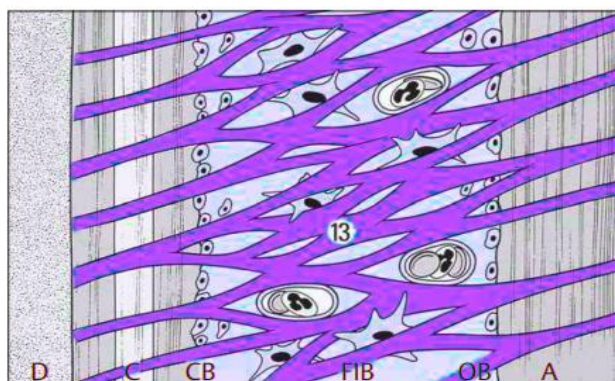


Figura 4 : Detalhes do ligamento periodontal (Modificado de H. F. Wolf et al, 2005). 13: fibras colagénias; D: dentina; C: cemento; CB: cementoblastos; FIB: fibroblastos; OB: osteoblastos; A: osso alveolar.

O cemento radicular é um tecido mineralizado, avascular, não innervado que cobre a raiz do dente. Desempenha uma função crucial na ancoragem do dente ao osso alveolar através das fibras de Sharpey. É composto por uma camada acelular que se liga a uma camada celular onde se encontram os cementoblastos que estão ativos ao longo da vida (Michael G. Newman H. H., 2006).

O osso alveolar onde se inserem os dentes possui uma cortical interna (composta por tecido conjuntivo, osteoblastos e osteoclastos) e uma cortical externa (densa, rica em vasos sanguíneos e nervos), além de uma área esponjosa no centro. O osso alveolar é composto por uma fase mineral de hidroxiapatite de cálcio e uma fase orgânica formada principalmente por colagénio tipo I, mas também por albumina, HS-glicoproteína α ,

proteoglicanos, glicoproteínas e lípidos. Este osso é perfurado por múltiplos pequenos orifícios (ductos de Volkmann) permitindo a passagem de vasos sanguíneos e fibras nervosas (H. F. Wolf et al, 2005).

1.1.2. Gengivite

A gengivite é uma inflamação causada por bactérias inespecíficas na gengiva marginal (Könönen et al, 2019). É responsável por mais de metade de todas as doenças periodontais, com uma prevalência superior a 90% tanto em países industrializados como não industrializados (J.P. Pihlström, 2012). A inflamação ocorre nas áreas papilares e na gengiva marginal, que ficam avermelhadas e nalguns casos edemaciadas e com sangramento à sondagem (**Figura 5**). As estruturas subjacentes, nomeadamente o osso que envolve as raízes dos dentes e o ligamento que os suporta, permanecem intactas (al, 2006).

A gengivite está associada a um nível elevado de placa bacteriana, com maior prevalência em doentes com mau controlo de placa. Uma remoção eficiente da placa, incluindo a raspagem, facilita o controlo da gengivite, bem como a aplicação de medidas de higiene ao longo do tempo (Fabiana Ozaki, 2006). A epidemiologia natural da periodontite indica inflamação das gengivas, de modo que frequentemente a gengivite precede a periodontite.



Figura 5 : Fotografia vestibular intraoral do 5 sextante, saudável (esquerda) e inflamado (direita) (Adaptado de H. F. Wolf et al, 2005).

1.1.3. Periodontite

A periodontite é uma condição inflamatória crônica que afeta as estruturas de suporte dos dentes, incluindo o periodonto. Este último abrange o ligamento periodontal, o cemento que reveste a raiz do dente e o osso alveolar que circunda e suporta os dentes. (Caton, 2018)

A principal causa da periodontite deve-se a presença de certos microrganismos nocivos que estão na placa dentária, responsáveis pela criação de bolsas periodontais. O seu impacto imediato é a deterioração das estruturas de suporte dentário, incluindo o ligamento periodontal, osso alveolar e cemento. A perda dos tecidos de suporte caracteriza-se por uma perda de adesão, o que pode levar à perda de dentes (Michael G. Newman H. H., 2013).

1.1.4. Análise da representação gráfica de cortes teciduais

Após a descrição dos sinais clínicos e etiológicos da gengivite e periodontite, e a fim de permitir uma melhor compreensão destas doenças, apresentamos 3 representações gráficas de cortes teciduais de uma gengiva saudável (A), uma gengiva inflamada com gengivite (B) e, uma gengiva com periodontite (C) (**Figura 6**) (H. F. Wolf et al, 2005).

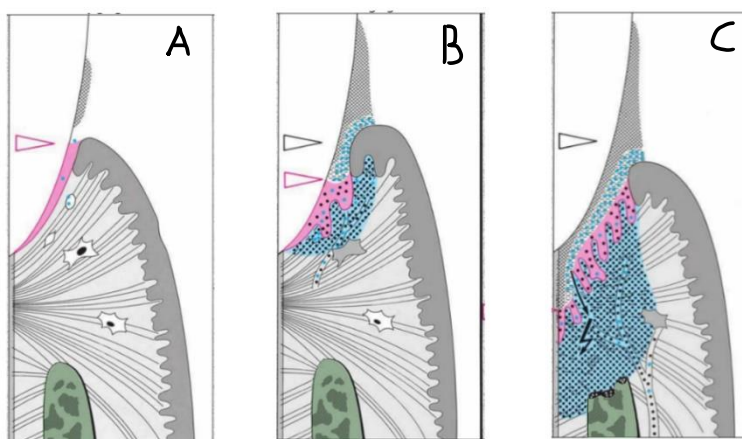


Figura 6 : Representações gráficas de seções longitudinais da gengiva (da esquerda para a direita): saudável (A), inflamada com gengivite (B) e periodontite (C). Rosa: bactérias; Azul: PMNs; Verde: osso (Modificado de H. F. Wolf et al, 2005).

Na imagem 6 A, podemos ver a presença de uma pequena quantidade de placa bacteriana (cor rosa). O epitélio sulcular, bem como o epitélio juncional, não apresentam

qualquer alteração. Mantém-se a presença de fibroblastos e de fibras colágenas. O osso alveolar permanece intacto.

Na imagem 6 B, que representa a gengivite, há uma maior presença de placa bacteriana (cor rosa). Observa-se uma acumulação de neutrófilos (PMNs) (cor azul), bem como uma maior vascularização. Células linfóides, imunoglobulinas, plasmócitos e leucócitos infiltram-se na área subepitelial. O epitélio sulcular é deslocado apicalmente com a formação de uma pseudo-bolsa. As fibras de colágeno, bem como fibroblastos começam a estar danificados.

Na imagem 6 C, que representa a periodontite, observa-se um aumento do processo inflamatório com um aumento de células linfóides e plasmáticas. A pseudo-bolsa torna-se uma verdadeira bolsa periodontal e fica ulcerada. A imagem revela uma perda de inserção no epitélio juncional, bem como a destruição de tecidos, em particular do osso alveolar.

1.2. Reabsorção tecidual e óssea

1.2.1. Mecanismo

A reabsorção tecidual e óssea é um mecanismo complexo que ocorre durante a periodontite. É causada por inflamação crónica dos tecidos que rodeiam o dente, com a presença de osteoclastos que destroem o osso e destruição dos tecidos moles por vários agentes. Num contexto saudável, uma inflamação do periodonto é controlada graças aos mecanismos de defesa. Na periodontite, o equilíbrio entre as células e as bactérias ao redor do dente e as células do sistema imunitário é interrompido. Isso ocorre porque o sistema imunológico não consegue regular a quantidade de bactérias patogénicas, levando a um aumento da inflamação. (Löe al., 1986).

As bactérias presentes no biofilme subgengival foram classificadas de acordo com a sua patogenicidade (**Figura 7**). O biofilme subgengival durante a periodontite é composto principalmente por bactérias Gram-negativas anaeróbias, incluindo *Porfiromonas gingivalis* (do complexo vermelho) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (do complexo verde) que se multiplicam muito tornando a placa mais madura (Socransky S S, 1998). As bactérias do complexo amarelo e verde estão presentes na fase inicial da doença, enquanto as bactérias do complexo vermelho e laranja correspondem a estados ativos e mais avançados da doença periodontal. No entanto,

existem muitas interações entre bactérias que potenciam os seus efeitos, dificultando a classificação das bactérias como patogénicas. Atualmente, pensa-se que estas bactérias patogénicas são a causa dos danos diretos e indiretos no periodonto (Krzyściak, 2013).

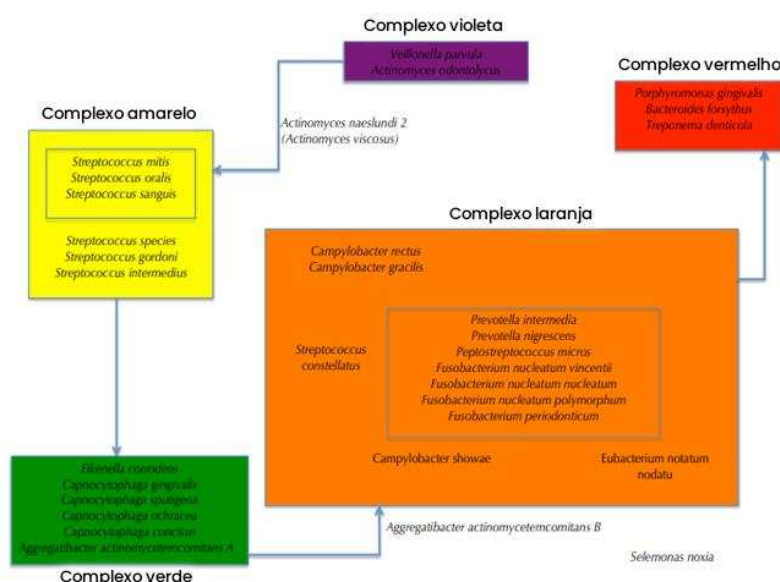


Figura 7 : Representação dos diferentes grupos de bactérias na microbiota oral de acordo com a sua patogenicidade (Modificado de Socransky S, 1998).

Os danos diretos resultam da secreção de fatores de virulência das bactérias cujos produtos químicos são corrosivos, tais como: lipopolissacarídeos, ácido lipoteíquo, vesículas extracelulares, enzimas como hialuronidase, proteinases e collagenases, toxinas como leucotoxinas e metabolitos como compostos sulfurosos voláteis (CSVs), incluindo sulfeto de hidrogénio, dimetilsulfeto e metilmercaptano (Kachlany, 2010).

Os danos indiretos são causados pela resposta imune do hospedeiro que atua contra os microrganismos patogénicos e suas secreções. Quando um agente infeccioso invade o organismo humano, é identificado pelo sistema imunitário através de recetores reconhecedores de padrões os PRRs (Pattern Recognition Receptors), estes são receptores específicos de Padrões Moleculares Associados a Patogénicos (PAMPs). Os PAMPs incluem vários tipos de moléculas, como lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), peptidoglicanos, DNA e RNA bacterianos ou lipoproteínas. A identificação de um PAMP por receptores específicos inicia a ativação das células do sistema imunitário (**Figura 8**) (Hughes, 2008).

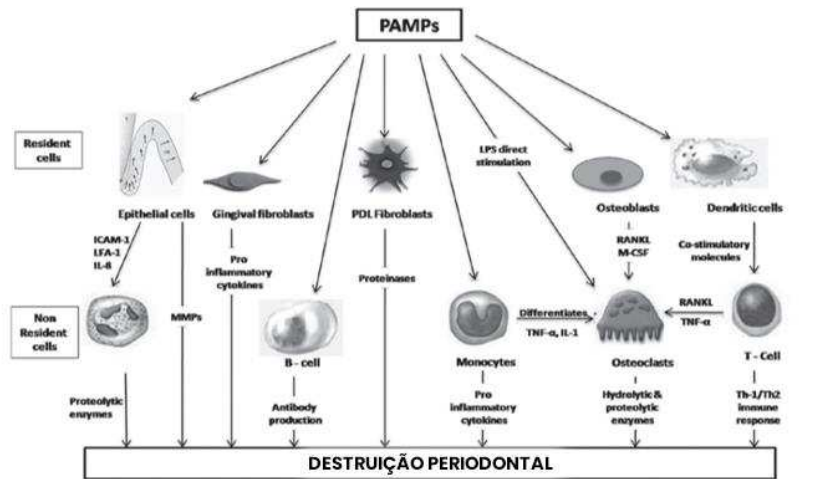


Figura 8 : Diagrama correlacionando PAMPs e seus efeitos destrutivos (Modificado de Hans, 2011).

O processo inflamatório da periodontite é iniciado pela ativação de uma subcategoria dos PRRs, os TLRs (Toll like receptors), que são proteínas transmembranares presentes nas células imunes inatas (como neutrófilos e macrófagos), nas células do sistema imunitário adaptativo (células B e células T), bem como nalgumas células periodontais (fibroblastos gengivais e desmododontais, células epiteliais) e noutros tipos celulares, incluindo osteoblastos que reconhecem as secreções de agentes patogénicos (Zhang Y, 2015). Os seres humanos têm 10 tipos de TLRs, no entanto, nas células periodontais há principalmente os TLR 2 e TLR4, enquanto os osteoblastos expressam TLR 4 e os osteoclastos TLR 2 e 4. Os TLR-2 reconhecem essencialmente peptidoglicanos e lipoproteínas, enquanto os TLR-4 reconhecem sobretudo lipopolissacarídeos (Ford P J, 2010).

As células epiteliais em resposta à ligação de um LPS (PAMP) produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-8 e TNF, bem como PGE2 e metaloproteinases (MMPs) Como consequência direta a forma-se um gradiente quimiotático que recruta PMNs circulantes nos capilares, e também a degradação dos tecidos periodontais devido à secreção de MMPs que são endopeptidases capazes de digerir a matriz extracelular (AlQallaf, 2018).

Quando a carga bacteriana aumenta, a resposta inata é estabelecida, as células do periodonto, bem como os neutrófilos presentes aumentam sua produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α). Muitos PMNs chegam ao local e formam uma barreira à volta do patogénico. PMNs secretam vesículas cheias de vários agentes, como certas MMPs e enzimas proteolíticas, capazes de destruir patogénicos, bem como tecidos

periodontais saudáveis. Estas células também consomem uma grande quantidade de oxigénio e libertam iões superóxido e peróxido de hidrogénio que danificam o tecido periodontal (Hajishengallis, 2016).

Muitos monócitos migram para o local, transformam-se em macrófagos e são ativados por LPS. Estas células fazem fagocitose e produzem uma grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α IL-1) e MMPs que causam danos teciduais ao periodonto. Em terceiro lugar, os macrófagos desempenham um papel importante na apresentação de antígenos aos linfócitos T através dos seus recetores MHC. Uma alta produção de IL-1 e TNF ativa fibroblastos, enquanto a secreção de TNF, IL-1 e PGE2 promove proliferação de osteoblastos (Babu, 2015).

Os fibroblastos, que são diretamente ativados pelos macrófagos, libertam enzimas proteolíticas, como as MMP, mas também mediadores da inflamação, como a IL 8-6 e a PGE2, que danificam o periodonto e promovem a diferenciação osteoclástica.

Numa segunda etapa, a resposta do adaptador é configurada, as células que apresentam os antígenos (como células dendríticas e macrófagos) ativam os linfócitos B, linfócitos T CD4, linfócitos T CD8, o que aumenta os níveis de mediadores pró-inflamatórios. Foi demonstrado que linfócitos T e linfócitos B são as principais fontes de RANK-L em pacientes com doença periodontal (Kawai, 2006). A combinação de RANK-L, PGE2 e IL1 leva a uma ativação dos osteoclastos, resultando uma alteração irreversível dos tecidos ósseos que compõem o periodonto.

1.2.2. Morfologia dos defeitos ósseos

A bolsa periodontal resultante da doença periodontal é uma alteração estrutural nos tecidos que envolvem o dente. Existem várias formas de lesão óssea periodontal, incluindo lesões supra-ósseas, infra-ósseas e inter-radiculares (Henry M. Goldman, October 1958).

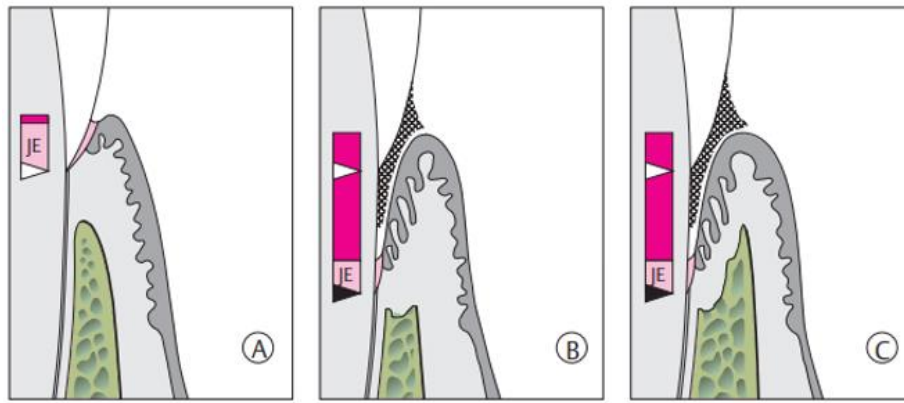


Figura 9 : Crista óssea saudável (A), lesão horizontal (B) e lesão óssea vertical (C) (Modificado de H. F. Wolf et al, 2005).

Inicialmente, aparecem as lesões supra-ósseas que correspondem a situações em que o fundo da bolsa periodontal está acima da crista alveolar. A morfologia da crista, visível em radiografias, termina horizontalmente dando origem às lesões em "varanda". Na maioria das vezes correspondem a periodontite de progressão lenta (**Figura 9 B**) (Bouchard et al, 2015).

Numa segunda fase, as lesões infra- ou intraósseas correspondem a alveólises verticais. De fato, a anomalia óssea está numa posição abaixo da crista óssea. Nestas situações, a bolsa também está localizada abaixo do nível da crista alveolar. Na maioria das vezes, correspondem a periodontite de progressão rápida em que as lesões intraósseas caracterizam-se pelo número residual de paredes ósseas, pela sua largura e profundidade e pelo ângulo estabelecido entre a raiz e a lesão (**Figura 9 C**).

O número de paredes ósseas residuais é um elemento essencial para a escolha da melhor abordagem terapêutica. Podem-se distinguir defeitos intraósseos com 3 paredes (consistindo numa parede óssea e 3 paredes dentárias (**Figura 10 A**)), com 2 paredes (consistindo numa parede óssea e 2 paredes dentárias (**Figura 10 B**)), com 1 parede (consistindo numa parede óssea e 1 parede dentária (**Figura 10 C**)) e, finalmente, crateras ósseas correspondentes a defeitos ósseos em forma de um arco circular (**Figura 10 D**). Quando os defeitos ósseos têm 3 paredes, o prognóstico para a regeneração é melhor porque as paredes vão dar estabilidade ao coágulo sanguíneo (Polimeni G, 2006).

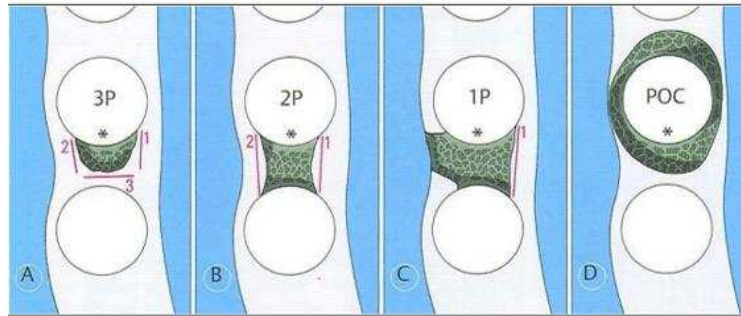


Figura 10 : Representação das diferentes morfologias dos defeitos intraósseos (Modificado de H. F. Wolf et al, 2005).

A profundidade e a largura intraósseas também são características morfológicas fundamentais. Defeitos estreitos e profundos são melhores candidatos para terapias regenerativas. Verifica-se que, à mesma profundidade, os defeitos mais estreitos têm maior probabilidade de regeneração. Com a mesma largura, os defeitos horizontais têm um prognóstico mais favorável para a regeneração (Sanz M, 2013).

O ângulo estabelecido entre a raiz e a lesão é decisivo para a regeneração, de acordo com alguns estudos que mostram que um ângulo inferior a 25° tem um melhor poder de inserção do que um ângulo superior a 37° (Tsitoura E, 2006).

Finalmente, observam-se lesões inter-radiculares em que a perda óssea ocorre no espaço entre as raízes de um dente. Estas lesões são causadas na maioria dos casos por periodontite, mas também podem ter origem endodôntica. A classificação das lesões é importante para determinar o tratamento adequado. Existem diferentes classificações das lesões, uma que depende da componente horizontal graus 1 < 3 mm (**Figura 11 B**), graus 2 > 3 mm (**Figura 11 C**), grau 3 (**Figura 11 D**) com passagem da sonda para o outro lado) (Sven-Erik Hamp, 1975) e outra classificação que depende da componente vertical (subclasse A < 3 mm, subclasse B 3-7 mm, subclasse C > 7 mm) (Tarnow D, 1984).

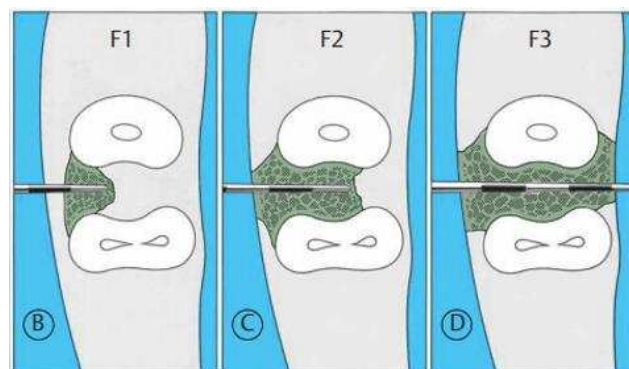


Figura 11 : Classificação Horizontal de Defeitos Inter-Radiculares (Modificado de H. F. Wolf et al, 2005).

1.2.3. Princípios de cicatrização de Tecidos

O primeiro objetivo do tratamento periodontal é restaurar a saúde periodontal através da eliminação da placa bacteriana, o segundo consiste na reconstrução das estruturas danificadas, também conhecida como "regeneração". A regeneração tecidual corresponde a uma reconstrução "ad integrum" do complexo dentário. Fisiologicamente, corresponde à formação de novas estruturas histológicas composta por um ligamento periodontal ancorado a um cemento também recém-formado, graças à criação da fibra de Sharpey. Há também a formação de novo epitélio e osso alveolar (Catros S. G., 2010).

Segundo Melcher, a regeneração deve ser distinta da reparação, que consiste em uma longa inserção epitelial, sem cementogénese e com anquilose. Este autor também observou que a natureza da adesão é determinada pelo tipo de célula que primeiro atingem o local da cicatrização (**Figura 12**) (Melcher, 1976). De facto, durante a cicatrização, várias células podem invadir a zona lesionada, incluindo queratinócitos do epitélio, fibroblastos gengivais do tecido conjuntivo, fibroblastos do ligamento periodontal e osteoblastos do osso. Cada tipo de célula tem uma cinética de proliferação e migração próprias, o que vai influenciar a cicatrização.

Verificou-se que as células epiteliais atingem primeiro o local de cicatrização devido à sua maior velocidade de migração, e iniciam a formação de um epitélio de junção, o que impede proliferação de outros tipos celulares, nomeadamente dos fibroblastos do ligamento periodontal. Esta rivalidade levou ao desenvolvimento de protocolos de regeneração tecidual, para impedir a ou retardar a progressão apical das células epiteliais (Karring T, 1980).

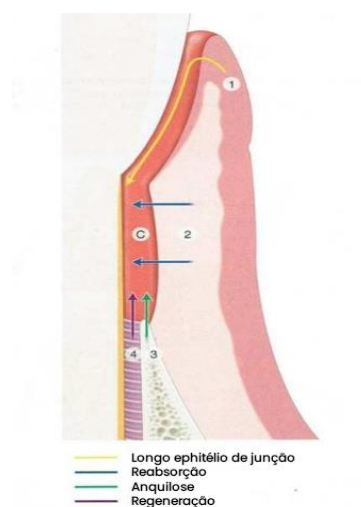


Figura 12 : Ordem cronológica da colonização tecidual de uma superfície radicular (Modificado de Bouchard, 2015).

O primeiro passo no processo de cicatrização é a formação de um longo epitélio a cobrir a superfície da raiz. Os queratinócitos, famosos pela sua elevada capacidade de proliferação e migração (que varia entre 0,5 e 1 mm por dia), estão associados a este processo. Após cerca de duas semanas, estabelece-se um epitélio mais profundo. Esta camada epitelial espessa oferece poucas oportunidades para que outros tipos de células com outras funções ocupem a lesão (Polimeni G, 2006).

Ao mesmo tempo, ocorre a cicatrização do tecido conjuntivo (corion gengival e ligamento periodontal). A cicatrização consiste em 3 fases sobrepostas (**figura 13**) (H. F. Wolf, 2005) :

- A primeira fase do processo de cicatrização começa com uma reação inflamatória inespecífica. Esta fase é caracterizada pelo recrutamento de células imunitárias, incluindo neutrófilos e macrófagos, presentes no coágulo sanguíneo recém-formado. A principal função destas células durante esta fase é limpar e remover da superfície da raiz todas as substâncias indesejadas.
- A fase de formação do tecido de granulação começa por volta do terceiro dia, ativada pela presença de fatores de crescimento produzidos pelos macrófagos. Esta etapa envolve a ativação de fibroblastos, miofibroblastos e células endoteliais. Estas células migram então através da lesão periodontal utilizando mecanismos de modulação enzimática e quimiotaxia. A produção de colagénio, que começa no sexto dia, contribui para o desenvolvimento de um tecido de granulação rico em vasos sanguíneos, embora ainda seja imaturo.
- A fase de remodelação e construção da matriz extracelular inicia-se a partir da segunda semana. A matriz torna-se mais densa e o colagénio adquire ligações cruzadas. As fibras de ancoragem de colagénio são posicionadas paralelamente à superfície do dente na parte superior da lesão, voltadas para o epitélio juncional já formado. No entanto, na parte inferior da lesão, estas fibras têm uma orientação perpendicular.

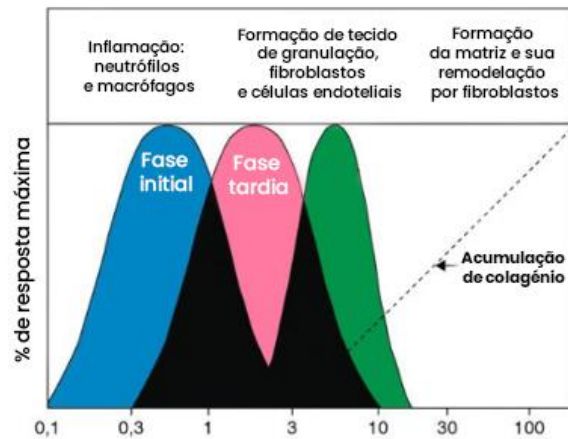


Figura 13 : Fases de cicatrização do tecido conjuntivo (Modificado de Bouchard, 2015).

Finalmente, ocorre a remodelação óssea dos processos alveolares e a formação de cemento. Sob o efeito do trio RANK/RANK-L/OPG, o processo de remodelação óssea ocorre em várias etapas: ativação, reabsorção, reversão, formação. O desenvolvimento ósseo leva tempo, abrangendo um período total de seis meses, embora comece na terceira semana. O cemento neossintetizado forma-se a partir do tecido de granulação do ligamento alveolar (Xu, 2008).

O modelo de cicatrização periodontal baseou-se nos 6 princípios fundamentais de regeneração tecidual, considerados como as bases biológicas: (al, 2006)

- Histocompatibilidade da superfície: é essencial que a superfície da raiz e a superfície interna do retalho sejam histocompatíveis. Para isso, é essencial uma limpeza e descontaminação da superfície radicular para remover tártaro.
- Exclusão tecidual: de acordo com o princípio da competição celular, cada tecido periodontal tem o seu próprio tempo de cicatrização. Portanto, é necessário excluir o tecido epitelial e o tecido conjuntivo da área de cicatrização, a fim de permitir que o tecido ósseo e as fibras do ligamento tenham tempo de regenerar.
- Manutenção do espaço cicatricial: este princípio enfatiza a importância do coágulo sanguíneo no local lesionado, porque ajuda a manter um espaço essencial para a regeneração tecidual.
- Estabilidade precoce do coágulo: durante os primeiros estágios de cicatrização, o coágulo sanguíneo deve ser imobilizado.

- Adesão do coágulo: para promover a rápida inserção das fibras conjuntivas à superfície da raiz, é importante manter um contato íntimo entre a superfície da raiz e a superfície interna do retalho.
- Indução celular: é importante assegurar a proliferação e diferenciação de células com potencial de regeneração, ou seja, células estaminais.

1.3. Engenharia de Tecidos

1.3.1. Conceito de Engenharia de Tecidos

A engenharia de tecidos é uma disciplina que envolve campos que combinam a física, biologia celular, ciência dos materiais e medicina dentária. Esta disciplina visa potenciar a regeneração dos tecidos cardíacos, vasculares e periodontais através do desenvolvimento de técnicas avançadas e inovadoras. O principal objetivo é criar um substituto tecidual artificial e biologicamente viável para substituir o da estrutura danificada e, assim, restabelecer as funções iniciais (Groll, 2016).

Para tal, a engenharia de tecidos correlaciona 3 fatores considerados como uma tríade fundamental: células estaminais, sinais bioquímicos e biomoleculares e, finalmente, suportes matriciais (scaffolds). Estes elementos trabalham em sinergia para ajudar a criar, reparar e regenerar tecidos danificados (**Figura 14**) (Myon, 2011).

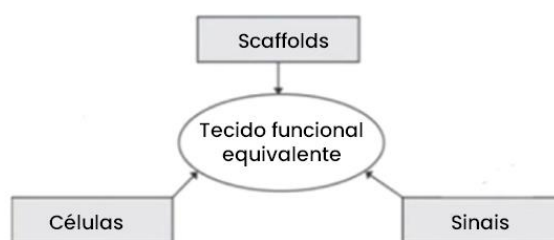


Figura 14 : Tríade de Engenharia de Tecidos (Modificado de Lanza et al., 2011).

Atualmente, o processo de engenharia de tecidos segue uma abordagem em várias etapas. Primeiro, as células são retiradas do paciente e depois cultivadas em laboratório. Este processo de cultura laboratorial envolve a multiplicação de células num ambiente controlado, pelo que os nutrientes e a temperatura são otimizados para promover essa proliferação e crescimento. Posteriormente, as células são incorporadas em estruturas

tridimensionais (scaffolds) que servem de suporte para a organização celular durante o crescimento do tecido. Estas estruturas podem conter diferentes fatores de crescimento, nanopartículas ou moléculas bioativas. Após uma fase de maturação ou organização do tecido, as células que continuam a multiplicar-se e a organizar-se em tecido, são transplantadas cirurgicamente para o doente. Em seguida, vem a fase de integração com os tecidos circundantes, que incluem nervos, e rede vascular.

1.3.2. Scaffolds

Os scaffolds são estruturas tridimensionais temporárias concebidas para fornecer suporte físico e biológico ao desenvolvimento dos tecidos (Dissanayaka, 2020). Desempenham um papel vital no fornecimento às células de um ambiente propício ao seu crescimento, organização e maturação (diferenciação), mimetizando a matriz extracelular dos tecidos conjuntivos orais (Chen F. a., 2010).

Existem várias características específicas dos scaffolds que os tornam mais ou menos adequados para a regeneração de tecidos. Em primeiro lugar, a porosidade, que influencia as propriedades mecânicas, de transporte e biológicas. Uma porosidade adequada facilita a troca de nutrientes e metabolitos, a eliminação de resíduos, a infiltração e crescimento celular e a libertação controlada de fatores de crescimento (Xia, 2021). A porosidade é expressa como uma percentagem de vazio. Está provado que a porosidade elevada e os poros dilatados promovem a osteogénese dos implantes (E. Tsuruga, 1997). A determinação da porosidade ideal é essencial para otimizar a regeneração tecidual. A segunda característica é a biocompatibilidade. Isso porque o scaffold não deve ser percebido pelo organismo como um corpo estranho e criar uma reação imunológica inflamatória. Pelo contrário, deve promover a adesão das células e dos fatores de crescimento (Sun, 2021). A terceira característica importante a considerar é a resistência mecânica. De facto, os scaffolds estão sujeitos a diferentes pressões e tensões ambientais, pelo que devem apresentar um suporte físico adequado ao tecido que está a ser regenerado (Salgado, 2004). Finalmente, quando o neo-tecido está formado, o scaffold cumpriu a sua missão de suporte e deve auto-absorver-se sem intervenção cirúrgica (Ruzaidi, 2021).

Os scaffolds utilizados em engenharia de tecidos são produzidos a partir de uma vasta gama de materiais, tanto naturais como sintéticos. Os biomateriais naturais mais

utilizados são o colagénio, o ácido hialurónico, a elastina, a seda e a celulose. Eles conferem ao scaffold biocompatibilidade, biodegradabilidade e permitem a diferenciação celular (X. Liu, 2004).

Os biomateriais sintéticos mais utilizados são os polímeros sintéticos (PLGA, PEG, PCL) que têm baixa toxicidade e biodegradação total (P.X. Ma, 2001), as biocerâmicas (hidroxiapatita, fosfatos de cálcio) que têm alta resistência mecânica, bem como uma capacidade osteoindutiva intrínseca, (H. Seitz, 2005) compósitos (híbridos entre polímero e cerâmica) que oferecem melhor resistência à compressão (M.J. Mondrinos, 2006) e, finalmente, metais (titânio) que são resistentes e pouco corrosivos (E.D. Spörke, 2008).

1.3.3. Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que estimulam o crescimento celular, regulam diferenciação celular, promovendo a produção de proteínas específicas. Na engenharia de tecidos, estes estão frequentemente combinados com os scaffolds para estimular a diferenciação celular das células estaminais (Catros S. G., 2010).

Os fatores de crescimento mais utilizados na engenharia de tecidos são:

- FGF: fator de crescimento fibroblástico, estimula a viabilidade e a especialização dos fibroblastos (Shimoaka, 2002).
- BMP: proteína morfogénica óssea (pertence à superfamília dos fatores de crescimento transformadores TGF) que induz a formação de osso, cartilagem, músculo e tecido conjuntivo (Chen G. D., 2012).
- EGF: fator de crescimento epidérmico: promove a viabilidade e a especialização das células epiteliais (González, 2009).
- TGF: fator de crescimento transformador, desempenha um papel fundamental na viabilidade de tecidos, ossos, cartilagem, músculo e tecido conjuntivo (Martínez, 2009).
- PDGF: fator de crescimento plaquetário, mantém viáveis as células musculares, células nervosas e células endoteliais, que revestem os vasos sanguíneos (Ross, 1990).

1.3.4. Células estaminais

Uma célula estaminal é uma célula indiferenciada que tem uma grande capacidade de autorrenovação durante um longo período de tempo e a capacidade única de se diferenciar numa variedade de diferentes tipos de células especializadas (Biehl, 2009). As células estaminais podem dividir-se assimetricamente, em que uma célula-mãe (proveniente de um reservatório de células estaminais) dá origem a uma célula-filha indiferenciada e uma célula-filha diferenciada. Por outro lado, as células estaminais também se podem dividir simetricamente, ou seja, uma célula estaminal progenitora dará origem a duas células iguais entre si, que podem ser ambas estaminais como célula mãe ou podem ser 2 células diferenciadas.

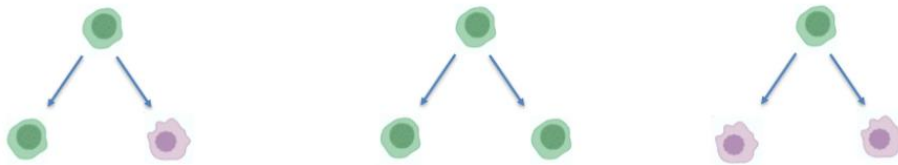


Figura 15 : Diagrama da divisão celular assimétrica (esquerda) e simétrica (direita) (Modificado de PLA, 2021).

Devido ao seu elevado potencial terapêutico, a utilização de células estaminais na engenharia de tecidos é da maior importância. De fato, teoricamente elas poderiam ser usadas num grande número de doenças, a fim de regenerar tecidos que normalmente não se regeneram, como o tecido muscular cardíaco ou nas feridas crónicas (Plaza, 2014), os tecidos craniofaciais, (Li W. H., 2022) e os tecidos neurais da medula espinhal (Cho, 2014).

Existem diferentes tipos de células estaminais, que podemos classificar de acordo com o potencial de diferenciação:

- Totipotentes: a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula, eles podem dar origem a um organismo inteiro, incluindo estruturas extraembrionárias como a placenta. Correspondem ao ovo e às células resultantes das 2 primeiras divisões (Paepe, 2014).
- Pluripotentes: capacidade de se diferenciar em quase todas as células (as células das 3 camadas endoderme, ectoderma e mesoderma), sem poder dar origem a um organismo inteiro porque não tem a capacidade de produzir os apêndices embrionários (placenta). Estas células designadas por células estaminais embrionárias ESC estão presentes apenas no embrião. As células obtidas a partir

de células adultas modificadas designadas por iPSC também são pluripotentes mas são distintas das células estaminais embrionárias (Yamanaka, 2012).

- Multipotentes: capacidade de diferenciação mais limitada, já estão comprometidas num processo de diferenciação tecidual. Existem diferentes famílias de células multipotentes como as células estaminais mesenquimais (MSC) e as células estaminais hematopoiéticas. (HSC). Elas encontram-se em pequenas quantidades em vários tecidos adultos (Maumus, 2018).
- Unipotentes: capacidade de diferenciação muito limitada, só são capazes de dar origem a um único tipo de célula. Elas também se encontram em pequenas quantidades nos tecidos adultos (Flatres, 2019).

As quatro principais famílias de células estaminais utilizadas em terapia são as células pluripotentes ESC e iPSC e células estaminais adultas multipotentes, em particular, as células hematopoiéticas HSC e as células mesenquimais MSC.

As ESC são células estaminais pluripotentes encontradas em embriões. Eles derivam da massa celular interna dos blastocistos, uma estrutura que se estabelece 4-5 dias após a fertilização (Simandi, 2010). A principal capacidade das ESC é diferenciar-se em qualquer tipo de célula do corpo humano, formando 3 camadas embrionárias, a ectoderme, a endoderme e a mesoderme (Pereira, 2019) (**Figura 16**). A utilização de ESC é controversa e há um grande debate na comunidade científica mundial, uma vez que apesar de terem um forte potencial terapêutico (em especial graças à sua pluripotência) são obtidas a partir de laboratórios de fertilidade e envolve a destruição de um embrião que poderia dar origem a um ser humano, além de que têm uma elevada capacidade de dar origem a teratomas (Holm, 2004).

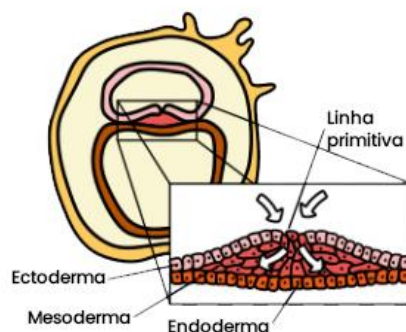


Figura 16 : 3 camadas embrionárias, a ectoderme, a endoderme e a mesoderme (Modificado de Bouillon, 2008).

As iPSC são células estaminais pluripotentes produzidas em laboratório a partir de células estaminais somáticas adultas por manipulação genética (Takahashi, 2006). Esta manipulação genética consiste em expressar fatores de transcrição Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc em células somáticas dando origem à pluripotência (Graveley, 2011). Por último as iPSC são menos dispendiosas do que os ESC e têm a vantagem de não colocarem questões éticas.

As células estaminais adultas (somáticas) são uma classe de células estaminais multipotentes encontradas no corpo adulto. Eles são categorizados de acordo com sua localização e sua capacidade de se diferenciar num determinado tipo de célula. (**Tabela 1**)

Tabela 1 : Diferentes grupos de células estaminais adultas.

Tipo de células estaminais adultas	Origem	Diferenciação
Mesenquimal (MSC)	Medula óssea, tecido adiposo, cavidade oral	Osso, cartilagem, músculo, tecido adiposo
Hematopoiética (HSC)	Medula óssea	Glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, plaquetas
Epitelial (ESC)	Epitélio	Pele, intestino, tecidos epiteliais
Neural (CSN)	Cérebro	Neurónios, astrócitos, oligodendrócitos

Centraremos o nosso estudo nas MSC. De facto, estas células encontram-se na medula óssea, mas também em muitos tecidos extra-orais (**Tabela 1**), incluindo os tecidos da cavidade oral. Pode-se pensar que o ambiente oral é uma boa opção para obtenção de células estaminais, sobretudo porque implica uma recolha pouco invasiva. Foram identificados, 6 tipos de Células Estaminais Dentárias (DSC).

Células estaminais **SHED** (de dentes decíduos esfoliados) podem-se obter a partir da polpa dos dentes de leite esfoliados o que permite um procedimento não invasivo para a recuperação destas células. Estas células têm a capacidade de se diferenciar em osteoblastos e condroblastos, a fim de regenerar o osso e a cartilagem (Miura, 2003).

Células estaminais **DFSC** (do folículo dentário) podem-se obter a partir do folículo dentário, que são estruturas formadas por tecido conjuntivo que envolve o germe

do dente em desenvolvimento. A recolha destas células pode ser feita quando da avulsão de dentes impactados, como no caso dos terceiros molares. Estas células possuem uma elevada capacidade osteogénica e promovem a regeneração do tecido periodontal (Yao, 2013).

Células estaminais **SCAP** (da papila dentária apical) podem ser isolados da papila dentária apical localizada no final das raízes dentárias. Elas têm uma grande capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, além de terem uma elevada capacidade de proliferação (2/3 vezes superior à das células da polpa) (Dimassi, 2020).

Células estaminais **DPSC** (da polpa dentária) podem ser isoladas da polpa dentária que se encontra no interior dos canais radiculares. Elas têm uma elevada capacidade de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos e fibroblastos, permitindo regenerar os tecidos periodontais, e também desempenham um papel na angiogénese. As células estão num estado de "repouso" designado por fase G0 mas, quando ocorre uma agressão como por exemplo a formação de uma cavidade, as células são ativadas e diferenciam-se em "odontoblastos-like" (Li Y. Z., 2016).

Células estaminais **PDLSC** (do ligamento periodontal) são isoladas do ligamento periodontal dos dentes, que é uma estrutura elástica e fibrosa que liga o cimento ao osso alveolar. Existem duas categorias diferentes, a-PDLSC (da superfície da cavidade dentária) e r-PDLSC (da superfície da raiz do dente). As células estaminais a-PDLSC têm maior capacidade de regeneração do que as r-PDLSC (Estrela C, 2011). Sabe-se que a idade do doador influencia a capacidade de regeneração, de facto, os resultados são melhores se o paciente for jovem. Estas células têm capacidade de se diferenciarem em cementoblastos, osteoblastos, adipócitos, condrócitos, o que permite regenerar o cimento a partir do osso alveolar e do ligamento periodontal (Bright, 2014).

II. MATERIAS E METODOS

2.1. Formulação da problemática de investigação

Durante esta investigação tentaremos responder se o transplante de células estaminais do ligamento periodontal (PDLSC) permite ou não a regeneração dos tecidos periodontais. Vamos utilizar a abordagem PICO, que nos permitirá fornecer uma análise precisa e focada.

2.1.1. População

População animal ou humana *in vivo* com defeitos periodontais naturais ou criados artificialmente incluindo perda de osso e tecidos de suporte.

2.1.2. Intervenção

Estratégia de regeneração tecidual utilizando transplante de PDLSC na zona do defeito.

2.1.3. Comparação

Periodonto saudável composto pelos seus 3 tecidos primordiais, o osso alveolar, o ligamento periodontal, o cimento.

2.1.4. Resultado

Regeneração efetiva dos tecidos periodontais, medida por parâmetros clínicos como redução da profundidade de sondagem, diminuição da perda de inserção e ganho ósseo. Aumento, melhoria da organização, e regeneração dos tecidos das secções histológicas observadas ao microscópio.

2.2. Estratégia de pesquisa

Foram utilizadas as 3 bases de dados digitais *PubMed*, *Web of Science*, *Cochrane*. Para isso, foram determinadas as seguintes palavras-chave: «transplantation», «periodontal regeneration», «stem cell therapy», «periodontitis surgery», «periodontitis therapy», «in vivo», «animals», «humain», «mouse», «swine», «beagle», «rat», «rabbit», «pig», «PDLSCs», «periodontal ligament stem cell».

O software 2Dsearch foi utilizado para realizar a equação de busca utilizando nossas palavras-chave previamente definidas. A fórmula final utilizada para pesquisar na base de dados *PubMed* é: ("transplantation" OR "periodontal regeneration" OR "stem cell therapy" OR "Periodontitis surgery" OR "Periodontitis therapy") AND ("mouse" OR

"in vivo " OR swine OR beagle OR rat OR "humain " OR "rabbit" OR "pig") AND ("PDLSCS" OR "periodontal ligament stem cell" OR "periodontal ligament stem cells ").

Na base de dados *Web of Science*, a equação de pesquisa final foi ALL= (("transplantation " OR "periodontal regeneration" OR "stem cell therapy" OR "Periodontitis surgery" OR "Periodontitis therapy") AND (mouse OR "in vivo " OR swine OR beagle OR rat OR "humain " OR rabbit OR pig) AND ("PDLSC" OR "periodontal ligament stem cell" OR "periodontal ligament stem cells ")) com a adição das palavras-chave rápidas PERIODONTAL LIGAMENT STEM CELLS e PERIODONTAL REGENERATION.

Dentro da base de dados Cochrane, a equação de busca final foi ("periodontal ligament stem cell" OR "PDLSC") AND ("transplantation") AND ("periodontal regeneration") AND ("in vivo").

A inteligência artificial também foi usada através do software Connected Papers. De facto, permitiu-nos formar uma árvore visual de artigos semelhantes, com base no DOI de um dos artigos mais repetidos. Uma pesquisa manual também foi realizada para incluir itens que foram potencialmente omitidos de nossa pesquisa algorítmica.

2.3. Critérios de elegibilidade

2.3.1. Critérios de inclusão

Foram definidos os seguintes critérios de inclusão:

- Estudos *in vivo* em animais
- Estudos *in vivo* em seres humanos
- Transplante de PDLSC
- Transplante de outro tipo de células estaminais da cavidade oral em comparação com o transplante de PDLSC
- Estudos para analisar os efeitos do transplante de PDLSC em tecidos periodontais
- Defeitos ósseos e tecidulares semelhantes à periodontite no sítio oral
- Realização de xenotransplantes, enxertos autólogos, enxertos alogénicos
- Análise pós-transplante de um ou mais dos 3 tecidos periodontais (osso, ligamento periodontal, cimento)
- Artigos em Inglês ou Francês

2.3.2. Critérios de exclusão

Definimos os seguintes critérios de exclusão:

- Estudos *in vitro*
- Uso de células estaminais de diferentes fontes em combinação com as PDLSC na mesma cultura
- Uso da terapia genética em combinação com o uso de PDLSC
- Defeitos ósseos e tecidulares não orais, de localização ectópica
- Utilização de exossoma de PDLSC

2.4. Seleção dos estudos

2.4.1. Escolha dos estudos

Um revisor independente (AR) selecionou os artigos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, para garantir uma avaliação objetiva e livre de erros. Esta seleção foi feita após a leitura total dos artigos. As discrepâncias entre os 2 revisores foram resolvidas através de uma discussão que resultou num consenso. Esta abordagem confiável reduz o risco de enviesamento e, portanto, permite-nos trabalhar com um banco de dados confiáveis dos artigos selecionados.

2.4.2. Recolha de dados

Extraímos de cada estudo, a referência do estudo, a proveniência das PDLSC, o hospedeiro, o meio de extração e cultura, o nome do scaffold, o número de células e o tempo de incubação. Também extraímos as informações sobre os diferentes grupos de estudo de cada artigo, a fim de compreender melhor os resultados, que extraímos. Todos esses dados foram registados numa tabela Excel.

2.4.3. Avaliação da qualidade

Para minimizar o risco de enviesamento e para manter a confiabilidade da seleção do estudo, foi utilizado o protocolo SYRCLE (Kousholt, 2022) para estudos em animais e o protocolo Cochrane Rob2 (Khan, 2021) para estudos Humanos. Trata-se de um conjunto de diretrizes dedicadas a fortalecer a evidência científica e reduzir o viés em revisões sistemáticas e meta-análises. Estes protocolos fornecem métodos transparentes, para analisar a pesquisa, os resultados e, finalmente, as conclusões dos estudos. Para responder a cada pergunta temos 3 respostas: SIM (portanto, consideramos um baixo

risco de viés), NÃO (consideramos aqui um alto risco de viés) e NÃO ESTÁ CLARO (consideramos aqui um risco intermediário de viés, é possível que existam riscos de viés). Numa segunda etapa, registámos todos os resultados numa folha de cálculo Excel e utilizámos a ferramenta interativa Robvis para visualizar os resultados da avaliação do risco de enviesamento.

III. RESULTADOS

3.1. Resultados da estratégia de investigação

As diferentes estratégias de pesquisa realizadas como descrito (**Figura 17**) utilizando bases de dados digitais, bem como o software Connected Papers e a pesquisa manual permitiram identificar 358 artigos potencialmente elegíveis. Em seguida, removemos os duplicados e efetuámos uma triagem inicial de acordo com os títulos e resumos, o que resultou na seleção de 27 artigos potencialmente elegíveis. Finalmente, após a leitura dos artigos na íntegra e aplicação dos critérios de elegibilidade e exclusão (**Tabela 2**), foram incluídos 12 artigos nesta revisão integrativa.

Tabela 2 : Referências e motivo de exclusão de itens potencialmente elegíveis.

Referência dos artigos	Motivos de exclusão
Y-T Kim, 2012	Localização ectópica
M Gomez Flores, 2008	Localização ectópica
C P Panduwawala, 2017	Localização ectópica
Zhenhua Yang, 2009	Localização ectópica
Bo-Han Yu, 2014	Localização ectópica
Wei Zheng, 2015	Localização ectópica
Yang Zhao, 2022	Exossoma
Nerea Sánchez, 2020	Falta de Informações
Jie Pan, 2019	Falta de Informações
Fengzhen Lei, 2022	Exossoma
Su-Hwan Kim, 2009	Análise pós-peri-implantite
Peer W Kämmerer, 2017	Análise pós-peri-implantite
Wenhao Wang, 2023	Associação de PDLCS com outras células estaminais.

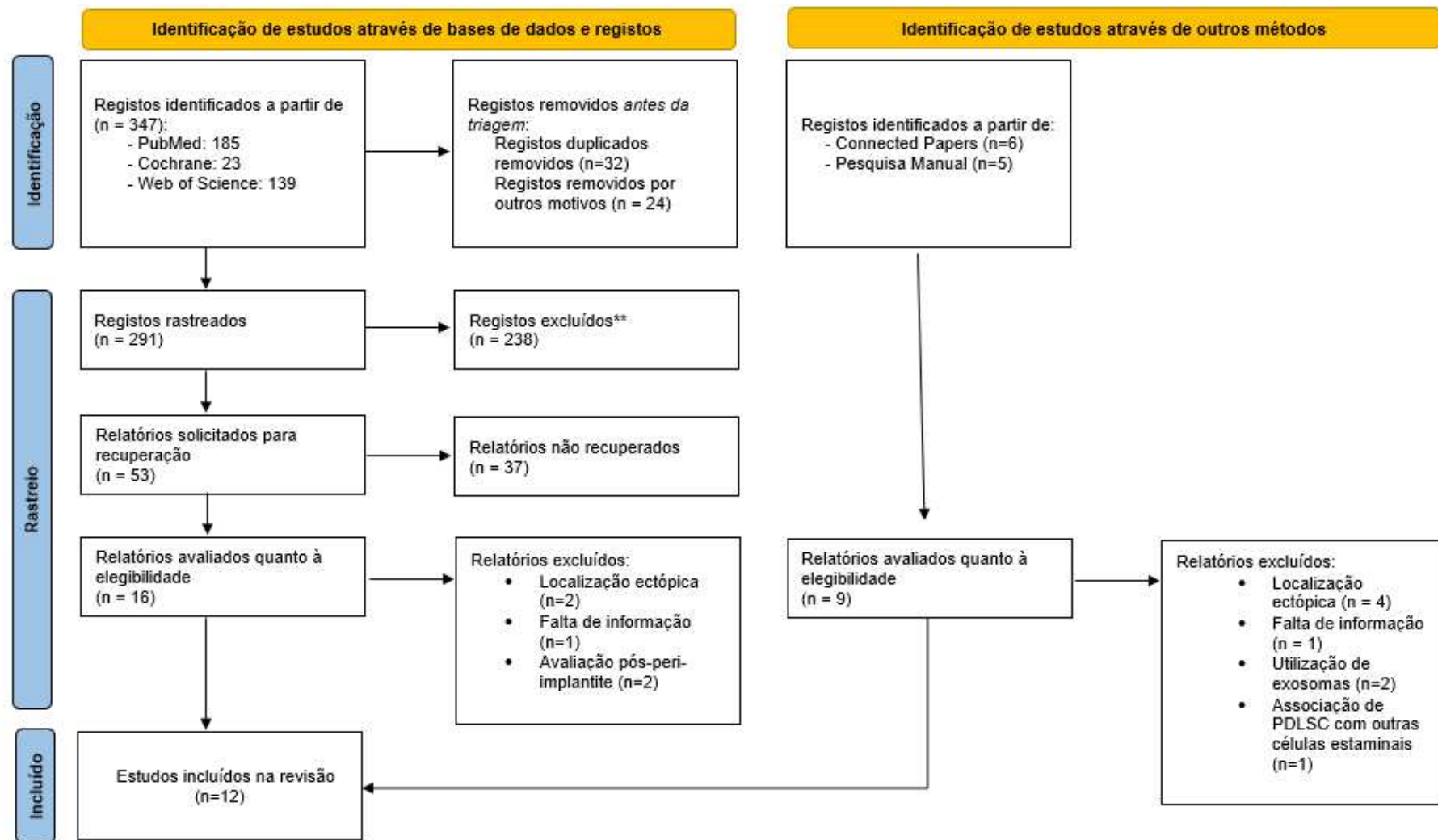


Figura 17 : Fluxograma

3.2. Descrição geral das características dos estudos

Como parte desta revisão integrativa (RI), foram pesquisados ensaios clínicos randomizados e controlados publicados de 2008 a 2020 (**Figura 18**). Estes ensaios provêm de diferentes continentes, principalmente da Ásia, sobretudo da China (**Figura 19**).



Figura 18 : Ano de publicação dos estudos.

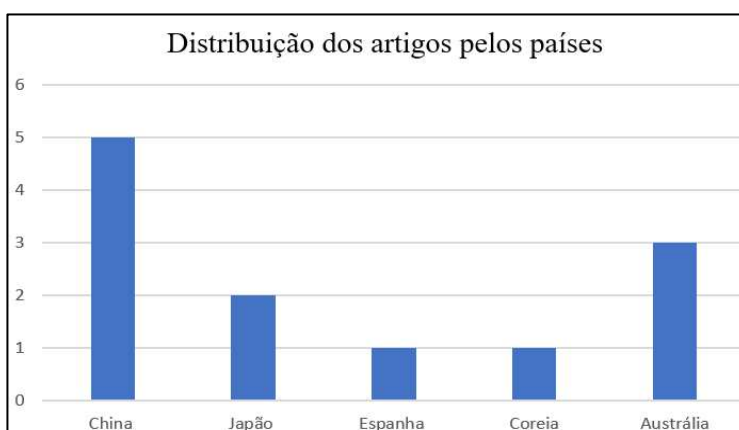


Figura 19 : Distribuição dos artigos por país.

Foi dada uma importância fundamental aos diferentes modelos de hospedeiros in vivo utilizados. No total, podemos contar 1 ensaio de transplante realizado em modelo humano (Fa-Ming Chen, 2016) e 11 realizados em diferentes modelos de hospedeiros animais (**Figura 20**). Estes diferentes modelos animais refletem uma gama diversificada de espécies, incluindo ratos (Kengo Iwasaki K. A., 2019) (J Han, 2014) (Kengo Iwasaki M. K., 2014) (Jiling Qiu, 2020) (Xuejing Duan, 2018); porcos (Yi Liu, 2008) (Gang Ding, 2010); cães Beagle (Joo-Young Park, 2011) (Javier Nuñez, 2017) e ovinos (Krzysztof Marek Mrozik, 2013) (Danijela Menicanin, 2014).

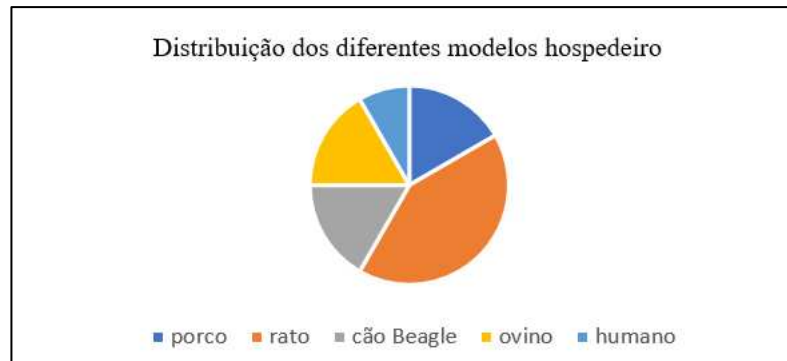


Figura 20 : Distribuição dos diferentes modelos de hospedeiros.

Por outro lado, foi dada especial atenção à origem das células estaminais, uma vez que este elemento-chave determina a natureza do transplante (**Figura 21**). Em primeiro lugar, os transplantes alogénicos, que envolvem a transferência de células de um órgão dador para um órgão recetor da mesma espécie, mas com um genótipo diferente, foram representados em 5 estudos : (Gang Ding, 2010) (J Han, 2014) (Krzysztof Marek Mrozik, 2013) (Xuejing Duan, 2018) (Javier Nuñez, 2017).

Em segundo lugar, os transplantes autólogos, que consistem na remoção de células do órgão do dador e na sua reimplantação, foram representados em 5 estudos (Yi Liu, 2008) (Gang Ding, 2010) (Joo-Young Park, 2011) (Danijela Menicanin, 2014) (Fa-Ming Chen, 2016).

Finalmente, os xenoenxertos, que consistem na transferência de células entre duas espécies diferentes, estiveram presentes em 3 estudos (Kengo Iwasaki K. A., 2019) (Kengo Iwasaki M. K., 2014) (Jiling Qiu, 2020).

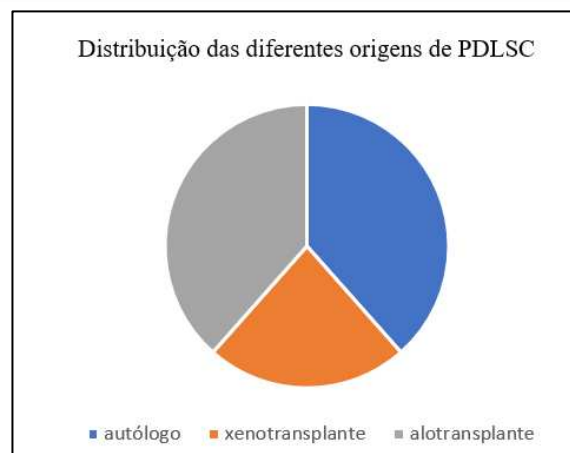


Figura 21 : Distribuição dos diferentes modelos de hospedeiros.

3.3. Síntese dos estudos

Tabela 3 : Síntese dos estudos.

Referência	Fonte PDLSC	Hospedeiro	Meios de Cultura	Scaffold	Numero	Tempo incubação	Grupo de estudo	Resultados
Yi Liu, 2008	Porcos miniatura	Porcos miniatura	-Separação do ligamento periodontal da raiz e digestão com 3 mg/ml de collagenase e 4 mg/ml de dipeptidase durante 1 hora a 37°C. Passagem por um filtro de 70 µm. -Inoculação em meio Eagle modificado α, com soro fetal bovino a 15%, ácido ascórbico 2-fosfato 100 mol/l, glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml. Em seguida, incubação a 37° em 5% de dióxido de carbono durante 14 dias.	HA/TCP	$2,0 \times 10^7$	12 semanas	A: Grupo de controlo apenas com anomalias B: Grupo HA/TCP C: Grupo PDLSC	-Diminuição da perda de inserção, medida inicialmente em mais de 12 mm em cada grupo e após 12 semanas, medida em 3,3 mm para o grupo C, 5,3 mm para o grupo B e 6,3 mm para o grupo A. -A tomografia computadorizada mostra regeneração óssea quase normal no grupo C, mas regeneração óssea muito limitada nos grupos B e A. -A histologia fotomicrográfica mostra uma regeneração do cimento, do ligamento periodontal (fibras de Sharpey) no grupo C em oposição ao grupo B.
Kengo Iwasaki K. A., 2019	Humanos	Ratos	-Remoção de tecido ligamentar e corte por 15 min em 500 µL de uma solução de digestão (α-MEM) com 3 mg/ml de collagenase tipo I e 4 mg/ml de dispase. Em seguida, a suspensão de PDL picada foi incubada a 37° por 60 minutos com 4,5 mL da solução de digestão. Remoção da solução de reação e centrifugação seguida da adição de 10 mL de αMEM contendo 15% de soro fetal bovino. Passagem por um filtro de 70 µm e, em seguida, cultura mudando o meio a cada 3 dias. -Transferência de PDLSCs cultivados para a membrana amniótica fetal humana.	Amnion	5×10^5	4 semanas	Grupo controle de âmnio isolado e grupo PDLSC-âmnio.	-As imagens de micro-TC mostram maior regeneração óssea no grupo PDLSC-âmnio. -A análise histológica indica a presença de uma camada de cimento, bem como fibras colágenas perpendiculares (de Sharpey) à superfície radicular apenas no grupo PDLSC-âmnio.

Gang Ding, 2010	Porcos	Porcos	-Separação do ligamento periodontal da raiz e digestão em 3 mg/ml collagenase e 4 mg/ml dipeptidase durante 1 hora 37°. Passagem por um filtro de 70 µm. -Inoculação em meio αEagle modificado, soro fetal bovino a 15%, ácido ascórbico 2-fosfato 100 mol/l, glutamina 2 mmol/l, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml. Em seguida, incubação a 37° em 5% de dióxido de carbono durante 14 dias.	HA/TCP	2×10^6	12 semanas	A: Grupo de controlo apenas com anomalias B: Grupo HA/TCP C: Grupo HA/TCP + PDLSC autólogo D: Grupo HA/TCP + PDLSC alogénico E: Grupo HA/TCP + PDLSC autólogo	-A perda de inserção é significativamente reduzida nos grupos C (4mm) e D (4mm) em comparação com os grupos A (11mm), B (14mm) e E (7mm) -A tomografia computadorizada mostra uma altura quase normal do osso regenerado para os grupos C e D em comparação com os grupos A, B e E. -A análise histopatológica indica a formação de osso novo, cimento e ligamento periodontal apenas nos grupos C e D.
J Han, 2014	Ratos	Ratos	-Separação do ligamento periodontal e digestão em solução de collagenase tipo I (3 mg/mL) e dispase tipo II (4 mg/mL) durante uma hora a 37°. -As culturas são então colocadas em meio αMEM com 10% de soro fetal bovino, 100 µM L-ascorbato-2-fosfato, 1 mM de solução de piruvato de sódio, 50 µg/ml de estreptomicina, a mesma quantidade de penicilina e, finalmente, 2 mM de L-glutamina. As células foram então cultivadas durante 28 dias na presença de indometacina 60 µM.	Gelfoam	1×10^6	7, 14, 21 e 28 dias	Grupo controlo sem tratamento, grupo Gelfoam isolado e grupo Gelfoam + PDLSC.	-No dia 7, houve o início da formação óssea no grupo controlo e Gelfoam + PDLSC. -No dia 14, há um início de cementogénese e pré-fibras Sharpey apenas no grupo Gelfoam + PDLSC. -Ao dia 21 foi observada uma menor quantidade de osso novo, cimento e tecidos de suporte no grupo de controlo, o grupo Gelfoam sozinho tinha um grande infiltrado inflamatório. No grupo Gelfoam + PDLSC, o osso alveolar mineraliza-se e as fibras de Sharpey organizam-se. -Ao dia 28, o grupo Gelfoam + PDLSC apresentou regeneração óssea quase completa, vascularização, presença de novo cimento e organização das fibras de Sharpey do ligamento periodontal, resultados não observados nos outros grupos.

Joo-Young Park, 2011	Cão Beagle	Cão Beagle	-Dissecção dos tecidos ligamentares seguida de digestão numa solução de 3mg/ml de collagenase tipo I e 4mg/ml de dispase durante 1 hora a 37°C. -Cultura em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino, 100 µmol/L de ácido 2-fosfato ascórbico, 2 µmol/L de glutamina, 100 U/ml de penicilina e, finalmente, 100 µg/µl de estreptomicina. As culturas celulares foram então incubadas em atmosfera húmida contendo 5% de dióxido de carbono a 37°.	-	6×10^6	8 semanas	A: Grupo controle não cirúrgico B: Grupo de defeito periodontal sem transplante de células estaminais C: Grupo PDLSC D: Grupo de células estaminais da polpa E: grupo de células estaminais foliculares periapicais	-Melhoria significativa da profundidade de inserção (inicialmente superior a 6,50 mm em todos os grupos) nos grupos C (4,03 mm) ao contrário dos grupos B (8,30 mm), D (6,15 mm) e E (5 mm). -A TC mostra uma altura mais elevada do osso recém-formado no grupo C, seguido do grupo E e, finalmente, do grupo D. -A análise histopatológica indica a formação de osso novo, cemento e uma organização das fibras de Sharpey no grupo C em contraste com os grupos D e E. O grupo B apresenta um grande infiltrado inflamatório.
Kengo Iwasaki M. K., 2014	Humanos	Ratos	-Remoção de tecido ligamentar e corte por 15 min em 500 µL de uma solução de digestão (α-MEM) com 3 mg/ml de collagenase tipo I e 4 mg/ml de dispase. Em seguida, a suspensão de PDL picada foi incubada a 37° por 60 minutos com 4,5 mL da solução de digestão. Remoção da solução de reação e centrifugação, seguida da adição de 10 mL de meio de crescimento de células estaminais mesenquimais. Passe por um filtro de 70 µm e, em seguida, cultura mudando o meio de cultura a cada 3 dias. -Transferência de PDLSCs cultivados para membrana amniótica fetal humana.	Amnion	-	4 semanas	Grupo controle de âmnio isolado e grupo PDLSC-âmnio.	-A tomografia computadorizada mostra maior enchimento ósseo para o grupo PDLSC-âmnio do que para o grupo âmnio isoladamente. -A análise histopatológica mostra a presença de tecido fibroso, fibras de colagénio e vasos sanguíneos apenas no grupo âmnio. Em contraste, o grupo PDLSC-âmnio tem formação de cemento fino, bem como a presença de fibras de colagénio orientadas (Sharpey), além do osso alveolar recém-formado.

Krzysztof Marek Mrozik, 2013	Ovinos	Ovinos	-Separação do ligamento periodontal e digestão em 3 mg/ml de collagenase tipo I e 4 mg/ml dispase tipo II durante 2 horas a 37°. -As culturas são então estabelecidas com meio Eagle modificado α suplementado com 15% de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina, 100 μM L-ascorbato-2-fosfato, 1 mM piruvato de sódio, 50 U/mL de penicilina G e 50 μg/ml de estreptomicina em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°.	Gelfoam	1×10^7	4 semanas	Grupo com defeitos não preenchidos, grupo Gelfoam apenas, grupo Gelfoam + PDLSC.	-A análise histológica mostra maior regeneração óssea no grupo Gelfoam + PDLSC (0,84 mm²) em comparação com os grupos de defeito isolado (0,26 mm²) ou Gelfoam isolado (0,67 mm²). - A análise histológica também mostra maior regeneração de cemento no grupo PDLSC + Gelfoam (22,43%) em comparação com o grupo defeito isolado (4,79%) e Gelfoam isoladamente (16,13%). -Finalmente, a análise histológica permite concluir que as fibras de colagénio (de Sharpey) estão melhor organizadas e mais espessas no grupo Gelfoam + PDLSC (4,9 μm) em comparação com o Gelfoam isolado e defeitos isolados com 4,12 μm e 2,94 μm respectivamente.
Danijela Menicanin, 2014	Ovinos	Ovinos	-Separação dos tecidos do ligamento periodontal adjacentes ao dente e digestão em solução de 3 mg/mL de collagenase tipo I e 4 mg/ml de dispase tipo II por 2 horas a 37°. -Estabelecimento de culturas em meio Eagle α-modificado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM l-glutamina, 100 μM l-ascorbato-2-fosfato, 1 mM piruvato de sódio, 50 U/ml de penicilina G e, finalmente, 50 μg/mL de estreptomicina em atmosfera de 37° com 5% de CO₂.	Gelfoam	2×10^6	6 semanas	Grupo Gelfoam sozinho e Grupo Gelfoam + PDLSC.	-A análise histológica permite observar uma clara formação de cemento, osso e uma organização de fibras de colagénio comparável às fibras de Sharpey no grupo Gelfoam + PDLSC. -Por outro lado, os defeitos tratados apenas com Gelfoam têm menos formação de cemento e osso e menos feixes de fibras de colagénio bem organizados.

Jiling Qiu, 2020	Humanos	Ratos	-Isolamento do tecido ligamentar e digestão com 3 mg/mL de collagenase tipo I e 4 mg/mL dispase tipo II por 50 minutos. Em seguida, cultura das células em meio Eagle modificado por α contendo 20% de soro fetal de bezerro a 37° abaixo de 5% de CO₂. -Início da cultura das diferentes células estaminais num meio completo contendo 10% de soro fetal bovino. Subsequente substituição do meio inicial por um meio α-MEM e cultivo durante 48 horas a 37° abaixo de 5% de CO₂. Recolha dos sobrenadantes e centrifugação durante 5 minutos e passagem por um filtro de 0,22 μm. Em seguida, centrifuga-se o filtrado e concentra-se 100 vezes a 5000 g durante 40 minutos a 4°C.	Bio-Guide	-	1, 2, 4 semanas	Grupo controle, grupo α -MEM, grupo CF-CM, grupo GMSC-CM, grupo PDLSC-CM.	-Após uma semana, há um infiltrado de células inflamatórias, fibras de colagénio e fibroblastos em todos os grupos. Os grupos GMSC e PDLSC já mostram o início da regeneração óssea. -Após 2 semanas, aumento da regeneração óssea especialmente nos 2 grupos anteriormente mencionados e início da cementogénese também nestes 2 grupos apenas. -Após 4 semanas, a regeneração óssea foi consistente nos grupos PDLSC (45%) e GMSC (39%), em comparação com menos de 25% nos outros grupos. O cimento e as fibras periodontais também estiveram presentes em todos os grupos, mas de forma mais organizada nos grupos PDLSC e GMSC.
Xuejing Duan, 2018	Ratos	Ratos	-Não notificado no estudo.	PRF	-	12, 24 dias	Grupo controle, Grupo Colágeno, Grupo Colágeno + PDLSC, Grupo PRF, Grupo PRF + PDLSC.	-A utilização de PRF isoladamente e colagénio só permite a regeneração óssea aos 24 dias de 34% e 23%, respetivamente. Por outro lado, o uso de colágeno + PDLSC ou PRF + PDLSC permite uma regeneração óssea de 39,74% e 62,81%, respetivamente. -O exame histológico também mostrou aumento da formação de cimento e fibras periodontais nos grupos PDLSC.

Javier Nuñez, 2017	Cão Beagle	Cão Beagle	-Isolamento da PDL e digestão em meio com 3 mg/mL de collagenase tipo I e 4 mg/mL dispase a 37° por 40 min. Em seguida, centrifugação por 7 min a 200g e lavar. Passagem por um filtro de 70 µm e, em seguida, cultura em meio α-MEM contendo também 15% de soro fetal, 100 µm de ácido ascórbico 2 fosfato, 2 mm de glutamina, 100 U/MI de penicilina e, finalmente, µm/MI de estreptomicina, tudo a 37° em uma atmosfera contendo 5% de CO ₂ .	Bioss-Collagen	1,4 × 10 ⁶	3 meses	Grupo controle Bioss-Colágeno + tampão fosfato salino. Grupo Bioss-Colagem + PDLSC.	-A análise histológica não revelou diferenças significativas entre os 2 grupos, mas revelou a criação de osso novo. -Observamos também a presença de fibras colagénio organizadas entre o osso alveolar recém-formado e o cimento, que também é recém-formado.
Fa-Ming Chen, 2016	Humanos	Humanos	-Extração do dente e passagem em meio α-MEM contendo 100 unidades/MI de penicilina e 100mg/MI de estreptomicina por 3 min 5 vezes. -Separação posterior do ligamento e digestão numa solução contendo collagenase tipo I a 0,2% durante 15 minutos a 37° e depois passagem por peneira. Em seguida, recolha das células após centrifugação a 1000 r/min durante 8 min. Adição de α-MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e incubação em 5% de CO ₂ a 37°.	Bio-oss	1×10 ⁷	3, 6, 12 meses	Grupo Bio-OSS . Grupo Bio-OSS + PDLSC.	-3 meses após o transplante, houve uma diminuição na perda de apego nos 2 grupos sem diferença significativa entre eles. De fato, no grupo Bio-oss, apenas o CAL aumenta de 5,28 mm para 5,07 mm, e no grupo Bio-oss + PDLSC, essa medida aumenta de 5,15 mm para 4,42 mm. Podemos, portanto, concluir que há regeneração e cicatrização tecidual inespecífica. -Existe também uma redução na profundidade do defeito ósseo após 12 meses através do preenchimento de osso novo. De facto, esta medida diminui de 7,19 mm para 4,80 no grupo Bio-oss isoladamente e de 7,20 mm para 4,49 mm no grupo Bio-oss + PDLSC.

3.4. Resultados da avaliação do Risco de enviesamento

Os artigos que apresentavam experiências em animais foram analisados utilizando as ferramentas SIRCLE e Cochrane Rob2. O risco geral de enviesamento de resultados para cada artigo não aparecerá devido a um grande número de parâmetros UNCLEAR.

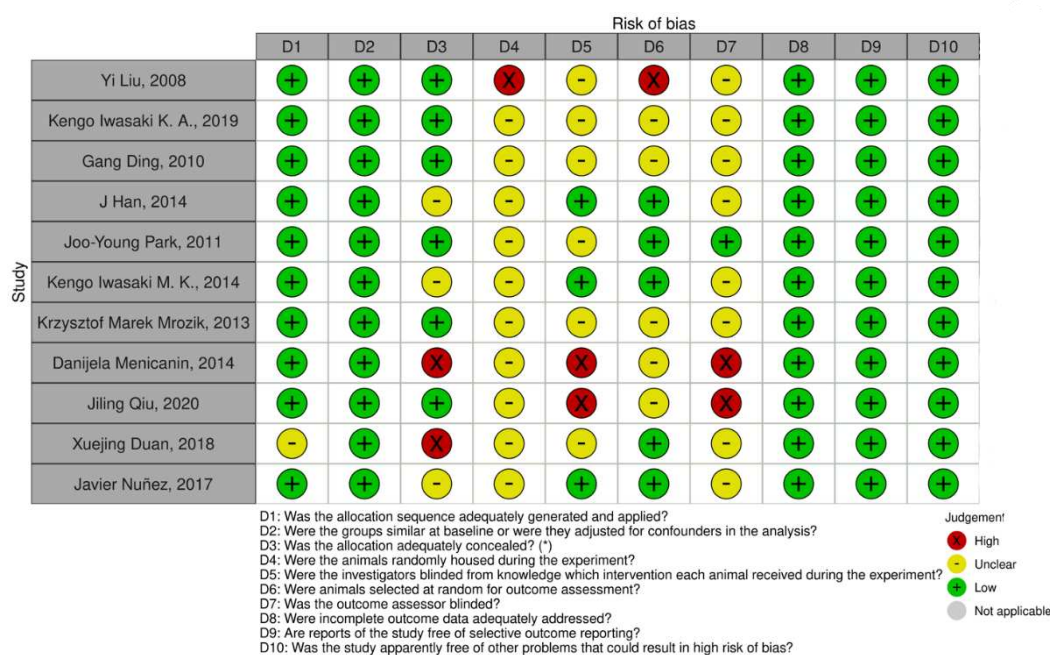


Figura 22 : Gráfico Traffic light plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento com estudos animais.

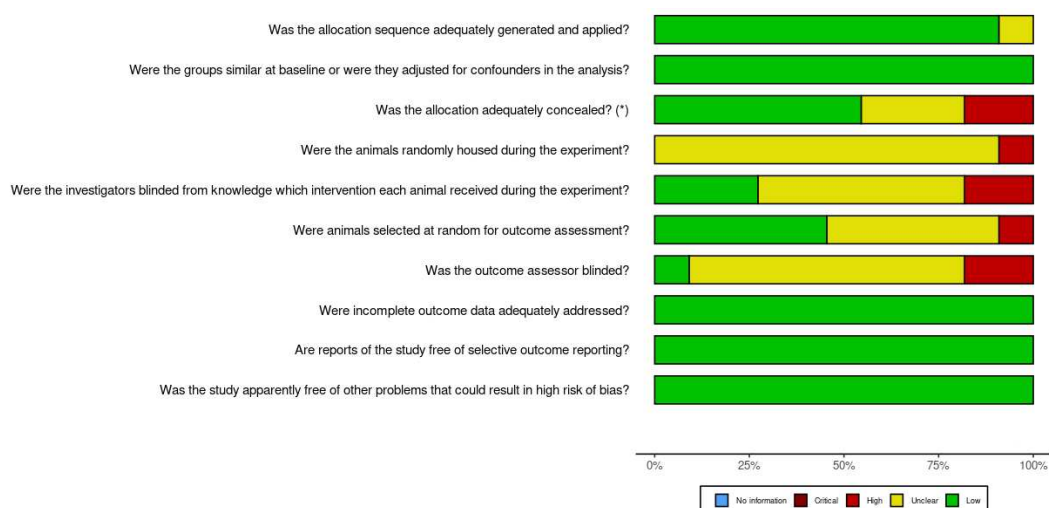


Figura 23 : Gráfico summary plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento dos estudos com animais.

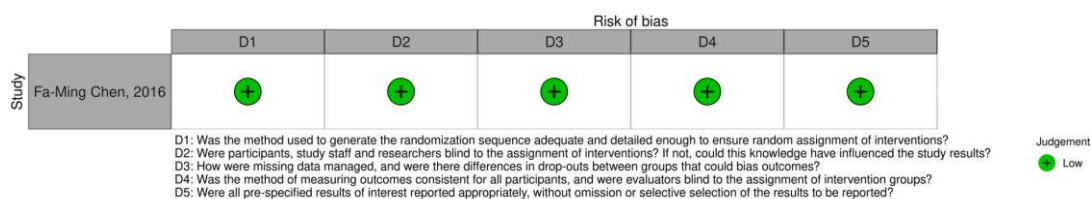


Figura 24 : Gráfico Traffic light plot (RobVis tool) para análise do risco de enviesamento dos estudos humanos.

O objetivo destas duas tabelas não é avaliar o risco global de enviesamento de cada estudo, mas dar uma ideia deste risco com base nas perguntas enunciadas. Inicialmente, há, portanto, uma grande disparidade entre estudos em animais e humanos. Há, de facto, um grande número de parâmetros que permanecem por esclarecer em estudos com animais (**Figura 22**) (**Figura 23**). Há também uma enorme falta de informação, ou informações incompletas sobre a aleatoriedade do alojamento dos animais durante os estudos, e da utilização de investigadores independentes para à alocação de animais, e seleção aleatória de animais dentro dos grupos para avaliar os resultados e, finalmente, sobre avaliação dos resultados por investigadores independentes. Por outro lado, o estudo em seres humanos apresenta um baixo risco de viés em geral, uma vez que conseguimos responder a todas as perguntas sem ter parâmetros pouco claros (**Figura 24**).

IV. DISCUSSÃO

Já há várias metanálises a descreverem a regeneração de osso utilizando diferentes tipos de células estaminais, mas neste trabalho quisemos aprofundar os resultados disponíveis sobre a regeneração do cimento, do osso e do ligamento periodontal. Estes 3 tecidos fazem parte da estrutura de suporte do dente e são por isso uma garantia de durabilidade.

Neste trabalho focamo-nos apenas na utilização das células PDLSC que atualmente são as mais promissoras devido ao seu potencial de diferenciação e facilidade de obtenção, nomeadamente a partir dos dentes do siso que são dispensáveis.

4.1. Caracterização das PDLSC

A caracterização das PDLSC é uma etapa essencial antes do cultivo. De fato, as populações de PDLSC retiradas do ligamento periodontal são do "tipo putativo". De facto, assume-se que estas células partilham as características distintivas das células estaminais mesenquimais. Portanto, o uso de microscopia eletrónica de varrimento ou transmissão, coloração imuno-histoquímica e citometria de fluxo são necessários para confirmar que as células são estaminais e verificar se a cultura está livre de contaminação por outros tipos celulares.

A caracterização morfológica usando os microscópios ótico e eletrónico de varrimento ou transmissão é essencial, dá-nos indicações sobre o estado de diferenciação dos PDLSC e da sua capacidade de formar estruturas semelhantes aos tecidos originais. No estudo de Yi Liu, a microscopia eletrónica de varrimento (**Figura 25 H**) mostra uma célula fusiforme numa matriz extracelular ramificada. Estas células também possuem muitos organitos como mitocôndrias e ainda ribossomas (**Figura 25 I**) e já produzem uma quantidade significativa de colagénio (**Figura 25 J**).



Figura 26 : PDLSC com microscópio ótico (100x) (Adaptado do Jiling Qiu 2020).

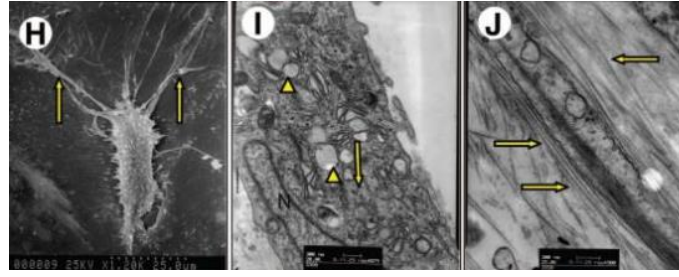


Figura 25 : PDLSC com microscópio eletrônico de varrimento (1200x) (H) e transmissão (5200x) (I, J) (Adaptado do Yi Liu, 2008).

No estudo de Joo-Young Park, Jiling Qiu (**Figura 26**) e Xuejing Duan, as células vistas ao microscópio ótico mostram uma morfologia fibroblástica e fusiforme com prolongamentos.

A coloração imuno-histoquímica é uma técnica laboratorial para localizar proteínas específicas em cortes teciduais. Os estudos descritos nesta revisão, comprovaram que as células coletadas eram estaminais pela presença de marcadores de MSC. Vários marcadores específicos foram utilizados, incluindo STRO-1, NESTIN, ALP, CD29, CD44, CD106, CD166, CD14, CD45, CD146, CD105, CD90, CD31, CD73, CD34. O STRO-1 é um anticorpo que reconhece um epítipo específico na superfície das MSC, pelo que a identificação destas últimas indica um potencial para diferenciação osteoblástica, cementoblástica, condroblástica e fibroblástica. A NESTIN é uma proteína expressa na superfície das MSC, a sua presença indica um estado diferenciado e um elevado potencial de diferenciação. A ALP é uma proteína que indica o potencial de diferenciação osteoblástica das MSC. A família de biomarcadores CD refere-se a uma série de proteínas na superfície da célula que são usadas para identificar e classificar células. Podemos, portanto, diferenciar entre os biomarcadores MSC: CD29, CD44, CD106, CD90, CD73, CD105, CD166 e biomarcadores HSC: CD14, CD45, CD146, CD31, CD34. No estudo de Yi Liu, as células estaminais são positivas para marcadores STRO-1, NESTIN e ALP, e no estudo de Joo-Young Park são positivas para STRO-1. No estudo de Danijela Menicanin, as células estaminais testaram positivo para marcadores CD29, CD44, CD106 e CD166 e negativos para marcadores CD14 e CD45. No estudo de Fa-Ming Chen, as células são positivas para os marcadores MSC STRO-1, CD146, CD105, CD29 e CD90 e negativas para os marcadores hematopoiéticos CD31 e CD45.

A citometria de fluxo permite a análise quantitativa de vários parâmetros celulares, como marcadores específicos. No estudo de Yi Liu, 5,6% das células testaram positivo para STRO-1, 12,5% para Nestin e 15% para ALP. No estudo de Gang Ding, 18,2% das células testaram positivo para STRO-1, 93,3% para CD146 e 82,3% para CD90. No estudo de Han, 50,9% das células testaram positivo para CD29, 94,8% para CD73 e 98,3% para CD90. Em contraste, apenas 0,1% das células testaram positivo para CD14, 0,6% para CD34 e 0,4% para CD45. No estudo de Park, 47,7% das células testaram positivo para STRO-1. No estudo de Kengo Iwasaki M.K., 100% das células foram positivas para CD90, CD44, CD73 e CD105, mas apenas 23,5% e 32,2% das células foram positivas para STRO-1 e CD146, respectivamente, e 0% das células foram positivas para CD31 e CD45.

Todos os estudos utilizam meios semelhantes para caracterizar as células estaminais, mas utilizam biomarcadores diferentes embora todos eles sejam tipicamente associados a MSC. Na análise microscópica, todas as células apresentam morfologia fusiforme semelhante à morfologia de fibroblastos.

4.2. Métodos de extração e cultura

A importância dos meios de cultura e extração não pode ser subestimada, pois desempenha um papel importante no isolamento, diferenciação e proliferação de PDLSC.

Várias enzimas foram usadas para isolar PDLSC de outros componentes do ligamento periodontal. Em primeiro lugar, a utilização de uma enzima que permite a hidrólise das ligações peptídicas do colagénio, a collagenase, e, em segundo lugar, a utilização de uma enzima que dissolve as ligações que unem as células à matriz extracelular: a dispase. Observamos também o uso da dipeptidase, uma enzima que decompõe especificamente os dipeptídeos em aminoácidos separados.

Os meios de cultura podem variar dependendo do estudo, mas têm uma função semelhante, ou seja, fornecer os nutrientes essenciais, fatores de crescimento e condições físico-químicas necessárias para promover a proliferação e diferenciação de PDLSC. Nos artigos selecionados observamos a utilização de meios comuns, como o uso do Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM) ou sua versão modificada (modificada α -MEM). No estudo do Parque Joo-Young, é utilizado o Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) que é um meio mais complexo com uma maior concentração de aminoácidos e vitaminas.

4.3. Scaffolds

A análise dos diferentes materiais de andaimes utilizados revela uma grande diversidade de composição variando vários parâmetros como biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade e, finalmente, resistência mecânica. (**Tabela 4**)

Tabela 4 : Características dos scaffolds utilizados em cada estudo (Robert Lanza, 2020).

Scaffold	Composição	Materiais	Biocompatibilidade	Biodegradabilidade	Porosidade	Resistência mecânica
HA/TCP	Biocerâmica	Hidroxiapatita / Fosfato tricálcico	Alta	Variável	Alta	Alta
Amnion	Tecido Biológico	Membrana amniótica	Alta	Sim	Variável	Fraca
Gelfoam	Polímero Natural	Gelatina	Boa	Sim	Alta	Fraca
Bio-Guide	Membrana Biológica	Colágeno suíno	Alta	Sim	Fraca	Moderada
PRF	Produto sanguíneo	Sanguina plasmática	Alta	Sim	Variável	Moderada
Bioss-collagen	Compósito	Colagénio com hidroxiapatita	Alta	Sim	Alta	Moderada
Bio-Oss	Biocerâmica	Osso bovino desmineralizado	Alta	Não	Alta	Alta

Fatores como a composição do scaffolds, a sua biodegradação, biocompatibilidade, porosidade, resistência mecânica e interação com células estaminais podem influenciar significativamente os resultados clínicos. Os estudos incluídos nesta revisão integrativa apresentaram uma diversidade de scaffolds com resultados variados, aumentando a complexidade desta abordagem terapêutica. Por conseguinte, não é possível comparar a eficácia dos scaffolds entre si. É crucial aprofundar a investigação para avaliar minuciosamente a eficácia e adequação de diferentes scaffolds, por exemplo, fazendo um estudo comparativo utilizando um único método de transplante de PDLSC, mas utilizando vários scaffolds diferentes, a fim de otimizar as estratégias de tratamento e melhorar os resultados a longo prazo dos doentes.

4.4. Análise corte histológico

A análise de uma secção histológica é um passo crucial para permitir a exploração detalhada do resultado do transplante de células estaminais, pelo que iremos analisar as secções histológicas do artigo de Krzysztof Marek Mrozik.

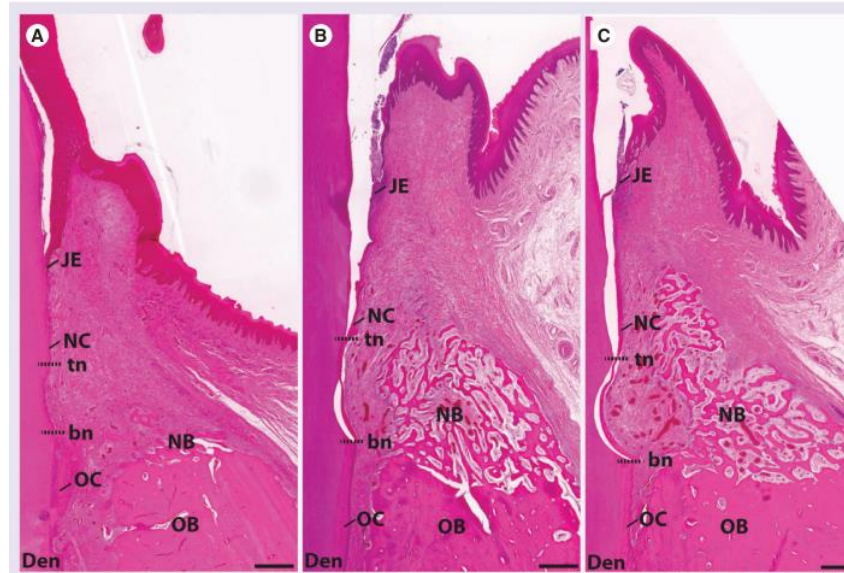


Figura 27 : Corte histológico analisando os resultados do transplante de PDLSC. A: Grupo padrão; B: Grupo Gelfoam; C: Grupo Gelfoam + PDLSC. bn: Base de entalhe de referência; Den: Dentina; G: Gelfoam; JE: Epitélio juncional; NB: Osso novo; NC: Cimento novo; OB: Osso velho; OC: Cimento velho; tn: Topo do entalhe de referência (Adaptado do Krzysztof Marek Mrozik, 2013).

Na Imagem A (**Figura 27**), representando apenas o grupo de defeitos, há um grande epitélio juncional invaginando no sulco. Há também um baixo foco de desenvolvimento de osso novo abaixo do nb de referência e uma pequena quantidade de cimento regenerado. As neofibras da Sharpey estão presentes em pequenas quantidades e têm uma organização não específica.

Na imagem B (**Figura 27**), representando apenas o grupo Gelfoam, há um epitélio juncional que não invagina no sulco, mas a presença de tecido de granulação e numerosas células inflamatórias. Existem múltiplos focos de desenvolvimento ósseo alveolar, acima do osso previamente formado e até a marca Tn. Observa-se também a formação de neocimento (**Figura 28 B**) e neofibras de Sharpey (ambas em menor quantidade em relação ao grupo C) com organização próxima à do ligamento periodontal saudável, ou seja, perpendicular ao neocimento (**Figura 29 B, E**).

Na imagem C (**Figura 27**), representando o grupo Gelfoam + PDLSC, há um epitélio juncional que não invagina no sulco, mas a presença de tecido de granulação e numerosas células inflamatórias. Há também um grande foco de desenvolvimento ósseo alveolar, continuando bem acima do ponto de referência Tn e, portanto, maior do que o grupo B. Observa-se também a formação de neocemento (**Figura 28 C**) e fibras de Sharpey (mais significativamente do que no grupo B) com uma organização ainda mais próxima da do ligamento periodontal saudável, ou seja, perpendicular ao neocemento (**Figura 29 C, F**).

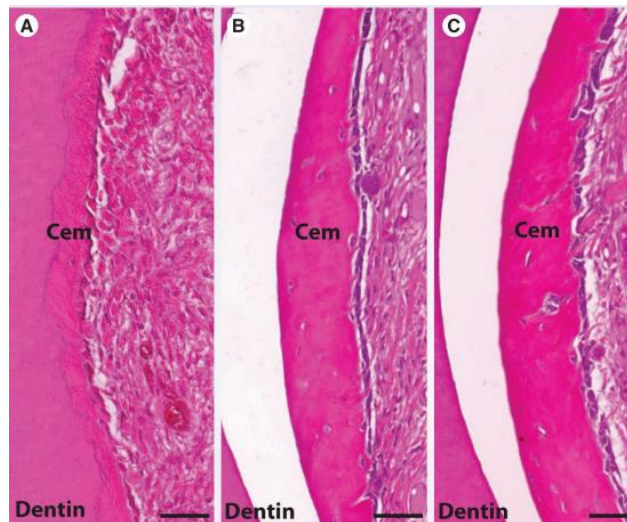


Figura 28 : Corte histológico analisando a regeneração do cimento. A: Grupo padrão; B: Grupo Gelfoam; C: Grupo Gelfoam + PDLSC. Cem: Cimento (Adaptado do Krzysztof Marek Mrozik, 2013).

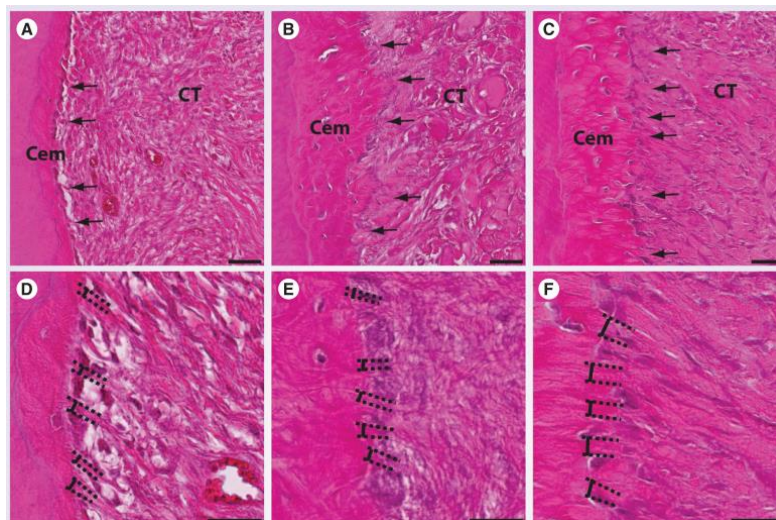


Figura 29 : Corte histológico analisando o ligamento periodontal. A, D: Grupo padrão; B, E: Grupo Gelfoam; C, F: Grupo Gelfoam + PDLSC. CT : tecido de conexão (Adaptado do Krzysztof Marek Mrozik, 2013).

4.5. Análise dos resultados

O principal objetivo dos tratamentos convencionais para a periodontite é reduzir a inflamação através do uso de métodos mecânicos. Numa segunda fase, estes tratamentos visam regenerar o tecido periodontal. No entanto, observamos que esta regeneração continua a ser limitada.

O objetivo primário desta revisão integrativa foi avaliar se as estaminais do ligamento periodontal poderiam promover a regeneração tecidual em estudos pré-clínicos. Uma grande restrição encontrada durante este estudo reside na diversidade significativa das metodologias utilizadas, o que dificulta a comparação direta entre os estudos selecionados.

Devido ao pequeno tamanho da região orofacial em roedores, é objetivamente mais difícil usar roedores como modelo para avaliar a regeneração periodontal do que usar porcos miniatura que são considerados o modelo ideal porque possuem características fisiológicas (imunológicas) comuns aos seres humanos e seu tamanho torna a análise mais simples.

A análise de perda de inserção que foi registada sempre que possível (**Tabela 2**) é considerada a melhor medida para indicar a regeneração periodontal, pois fornece uma avaliação direta do sucesso da regeneração dos tecidos de suporte de um dente, e nalguns casos também se registaram os dados histológicos e das tomografias computadorizadas.

Na abordagem do transplante autólogo, de acordo com o estudo de Yi Liu, observa-se pela primeira vez que com a adição de PDLSC a um scaffold HA/TCP obtém-se um resultado muito melhor de regeneração óssea, ligamentar e cimentar do que com o uso de HA/TCP sem células. Observa-se também que o crescimento epitelial foi interrompido pela formação de uma nova inserção de tecido conjuntivo, de modo que se pode concluir que a adição de PDLSC pode impedir o crescimento apical do epitélio. Numa segunda fase, o estudo de Joo-Young Park compara a utilização de várias fontes autólogas de células estaminais orais sem a utilização de scaffolds. Verifica-se que há uma melhor formação de cimento, osso e ligamento periodontal no grupo que usa PDLSC. Há também uma diminuição na produção de tecido de granulação neste grupo, provavelmente causada pela capacidade das PDLSC induzirem uma diminuição na produção de mediadores inflamatórios. Este aspeto requer uma exploração mais aprofundada. Em terceiro lugar, o estudo de Danijela Menicanin prova mais uma vez que

a regeneração tecidual é mais satisfatória usando PDLSC autólogos combinados com Gelfoam do que usando apenas Gelfoam. Em quarto lugar, o estudo humano de Fa-Ming Chen mostra que não há uma diferença significativa na regeneração óssea entre os grupos Bio-oss e Bio-oss + PDLSC. No entanto, este estudo é importante porque mostra que o transplante de PDLSC cultivados *ex vivo* é seguro para humanos, permitindo uma segunda fase de ensaios clínicos para determinar mais precisamente quais os melhores scaffolds e quais as doses celulares adequadas. Por último, analisámos os resultados do estudo Gang Ding. Este estudo é muito interessante porque compara, entre outras coisas, o uso de PDLSC alogénicas e autólogas nos mesmos defeitos teciduais. Observa-se que estes dois grupos obtêm resultados semelhantes quanto à regeneração histológica dos 3 principais tecidos (osso, cimento e ligamento periodontal). Coletivamente todos estes resultados indicam a existência de uma alternativa viável à regeneração tecidual convencional usando PDLSC autólogas, no entanto, as PDLSC autólogas são limitadas em pacientes com periodontite devido à presença de inflamação generalizada crónica do tecido.

Na abordagem do transplante alogénico, observamos mais uma vez pelo estudo de Gang Ding, que a transferência de células alogénicas é tão viável como a autóloga, mas acima de tudo que este modelo animal experimental (porco) não apresenta qualquer rejeição imunológica. No entanto é realmente difícil compreender o mecanismo de imunomodulação das PDLSC, uma vez que um grande número de fatores solúveis como TGFb1, HGF, PGE2 ou indoleamina 2,3-dioxigenato podem desempenhar um papel importante, bem como o contato direto entre PDLSC e linfócitos T, mas esses mecanismos ainda precisam ser esclarecidos. Em segundo lugar, os estudos de J Han e Krzysztof Marek Mrozik mostram que a regeneração nos grupos Gelfoam + PDLSC é mais rápida do que nos grupos Gelfoam isoladamente, o que demonstra a importância da adição de PDLSC. Em terceiro lugar, o estudo de Xuejing Duan utilizando PRF como scaffold comprova que a adição de PDLSC potencia a regeneração óssea cimentar e o crescimento de fibras de colagénio do PDL em comparação com grupos sem PDLSC. De fato, o FRP contém vários fatores de crescimento, tais como PDGF, TGFβ-1, IGF, VEGF e EGF que podem promover a proliferação, crescimento e diferenciação das células estaminais no modelo animal, mas continua a ser necessária mais investigação para estabelecer o efeito das diferentes interações. Finalmente, o estudo de Javier Nuñez apresenta resultados contrastantes, uma regeneração de osso, cimento e PDL está presente, mas não há uma diferença significativa entre os grupos de colágeno Bio-Oss e

o colágeno Bio-Oss + PDLSC. É importante notar que este estudo é baseado em defeitos ósseos de furcação tipo III. Estamos, portanto, diante de defeitos supraósseos que não permitem uma boa estabilização dos materiais regenerativos, o que certamente explica o fato de não haver diferenças significativas entre os dois grupos. É importante continuar estudos para definir as estratégias diferentes potencialmente aplicáveis a defeitos supraósseos ou infraósseos.

Na abordagem do xeno-enxerto, de acordo com os dois estudos de Kengo Iwasaki K. A., podemos ver que a regeneração é mais eficiente usando a combinação PDLSC + amnion do que usando apenas amnion. Além disso, não foram detectados efeitos imunológicos. Finalmente, o estudo de Jiling Qiu mostra-nos que a técnica de transferência funciona tão bem com PDLSC como com outras células estaminais orais, como por exemplo com GMSC-CM.

Esta revisão integrativa de artigos destacou o potencial promissor das células estaminais do ligamento periodontal para a regeneração do tecido periodontal. No entanto, não foi possível determinar, com base na análise dos resultados, o destino das PDLSC transplantadas ou os mecanismos subjacentes à melhoria das estruturas periodontais. É possível que entrem em jogo dois mecanismos. Em primeiro lugar, uma diferenciação direta das PDLSC em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos graças aos diferentes fatores de diferenciação local. Numa segunda etapa, a diferenciação das células PDLSC pode resultar duma estimulação parácrina pelas células hospedeiras na região do transplante. Também é possível que os exossomos libertados pelas células PDLSC possam funcionar como fatores parácrinos na regeneração periodontal. O mecanismo pelo qual os PDLSC induzem a regeneração periodontal quando o seu número diminui não é claro e requer investigação adicional.

V. CONCLUSÃO

Em conclusão, esta revisão integrativa destaca o potencial significativo das células-estaminais do ligamento periodontal para a regeneração periodontal. Os estudos incluídos demonstraram que o transplante dessas células estaminais pode promover a formação de novo cemento, ligamento periodontal e osso alveolar, contribuindo para a regeneração periodontal.

A sua utilização pode representar um grande avanço no tratamento da doença periodontal, oferecendo novas perspectivas terapêuticas para os pacientes. No entanto, é necessária mais investigação para consolidar estes resultados promissores e facilitar a sua tradução para a prática clínica.

VI. PERSPETIVAS FUTURAS

Embora promissores, os resultados atuais ainda exigem uma investigação mais aprofundada. Estudos clínicos maiores e de longo prazo são necessários para avaliar melhor a eficácia e a segurança desta abordagem regenerativa. No entanto, o uso da terapia celular para regenerar o tecido periodontal ainda não é rentável ou competitivo com os canais radiculares ou implantes dentários existentes. Uma vez que a periodontite não é uma doença fatal, o tecido periodontal não tem sido priorizado no campo da investigação médica regenerativa usando células estaminais.

Será igualmente importante explorar as melhores modalidades de administração de células estaminais, os fatores ótimos que promovem a sua diferenciação e integração nos tecidos periodontais e, em última análise, será importante desenvolver métodos e diretivas que permitam que os estudos *in vivos* sigam o mesmo protocolo.

Os resultados desta revisão destacam o valor clínico do uso de células estaminais do ligamento periodontal para o tratamento de defeitos periodontais. Esta abordagem terapêutica pode regenerar os tecidos perdidos de forma mais eficiente do que as técnicas convencionais, oferecendo melhores perspetivas de cicatrização e manutenção a longo prazo da saúde periodontal.

VII. Bibliografia

- AlQallaf, H. H. (2018). Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (tlr)-2 and 4 in chronic periodontitis. *Plos One*, 13, 3-14.
- Babu, S. B. (2015). Diminished expression and function of tlr in lymphatic filariasis: a novel mechanism of immune dysregulation. *The Journal of Immunology*, 175, 1170-1176.
- Biehl, J. a. (2009). Introduction to stem cell therapy. *The Journal of Cardiovascular Nursing*, 24, 98-103.
- Bo-Han Yu, Q. Z.-L. (2014). Periodontal ligament versus bone marrow mesenchymal stem cells in combination with Bio-Oss scaffolds for ectopic and in situ bone formation: A comparative study in the rat. *Jornal Biomater Application*, 29, 243-253.
- Bouchard, P. (2015). *Parodontologie et Dentisterie implantaire Volume 2*. Lavoisier Medecine Sciences.
- Bouchard, P. (2015). *Parodontologie et Dentisterie Implantaire, Volume 1*. Lavoisier Medecine Sciences.
- Bright, R. H. (2014). Periodontal ligament-derived cells for periodontal regeneration in animal models: a systematic review. *Journal of Periodontal Research*, 50, 160-172.
- C P Panduwawala, X. Z. (2017). In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *J Periodontal Research*, 52, 408-418.
- Carranza. (2006). *Clinical Periodontology* (10 ed.). SAUNDERS ELSEVIER.
- Caton, J. G. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89, S1–S8.
- Catros, S. G. (2010). Bone tissue engineering in oral and maxillofacial surgery: clinical applications. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 16, 227-237.
- Catros, S. G. (2010). Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques. *Médecine Buccale Chirurgie Buccale*, 16, 227-237.
- Chen, F. a. (2010). Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Engineering Part B Reviews*, 16, 219-255.
- Chen, G. D. (2012). Tgf- β and bmp signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 272-288.

- Cho, Y. K. (2014). Oral mucosa stem cells alleviates spinal cord injury-induced neurogenic bladder symptoms in rats. *Journal of Biomedical Science*, 21, 2-11.
- Cui, T. L. (2023). Epidemiological and sociodemographic transitions of severe periodontitis incidence, prevalence, and disability-adjusted life years for 21 world regions and globally from 1990 to 2019: An age-period-cohort analysis. *Journal of Periodontology*, 94, 193-203.
- Danijela Menicanin, K. M. (2014). Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. *Stem Cells Development*, 23, 1001-11.
- Dimassi, S. R.-G. (2020). Dental stem cells: myth or hope in neuroregenerative medicine? *Annales De Biologie Clinique*, 78, 593-603.
- Dissanayaka, W. a. (2020). Scaffold-based and scaffold-free strategies in dental pulp regeneration. *Journal of Endodontics*, 46, 81-89.
- E. Tsuruga, H. T. (1997). Pore size of porous hydroxyapatite as a cell substrate controlling BMP-induced osteogenesis. *J Biochem (Tokyo)*, 121, 317-324.
- E.D. Spoerke, N. M. (2008). Titanium with aligned, elongated pores for orthopedic tissue engineering applications. *Journal Biomedical Material Research A*, 84, 402-412.
- Estrela C, A. A. (2011). Mesenchymal Stem Cells in the Dental . *Braz dental Journal*, 22, 91-98 .
- Fabiana Ozaki, C. M. (2006). Efficacy of a herbal toothpaste on patients with established gingivitis: a randomized controlled trial. *Brazilian Oral Research*, 20, 1-6.
- Fa-Ming Chen, L.-N. G.-M.-Y.-J.-Y.-X. (2016). Treatment of periodontal intrabony defects using autologous periodontal ligament stem cells: a randomized clinical trial. *Stem Cell Research Therapy*, 19, 7-33.
- Fengzhen Lei, M. L. (2022). Treatment of inflammatory bone loss in periodontitis by stem cell-derived exosomes. *Acta Biomaterial*, 15, 333-343.
- Flatres, C. L. (2019). Façonner l'intestin à partir des cellules souches pluripotentes humaines. *Médecine/Sciences*, 35, 549-555.
- Ford P J, G. J. (2010). Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 53, 111–123.
- Gang Ding, Y. L. (2010). Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28, 1829-38.
- González, L. D. (2009). Gh modulates hepatic epidermal growth factor signaling in the mouse. *Journal of Endocrinology*, 204, 299-309.
- Graveley, B. (2011). Splicing up pluripotency. *Cell*, 147, 22-24.

- Groll, J. B. (2016). Biofabrication: reappraising the definition of an evolving field. *Biofabrication*, 8, 2-13.
- H. F. Wolf, E. M. (2005). *Color Atlas of Dental Medicine : Periodontology*. Thieme.
- H. Seitz, W. R. (2005). Three-dimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Journal Biomedical Material research part B*, 74, 782-788.
- Hajishengallis, G. M. (2016). Immune and regulatory functions of neutrophils in inflammatory bone loss. *Seminars in Immunology*, 28, 146-158.
- Hans, M. H. (2011). Toll-like receptors and their dual role in periodontitis: a review. *Journal of Oral Science*, 53, 263-271.
- Harald Löe, E. T. (1965). Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*. 1, 1-13.
- Henry M. Goldman, D. W. (October 1958). The Infrabony Pocket : Classification and Treatment . *Journal of Periodontology*, 29, 272-291.
- Holm, S. (2004). Stem cell transplantation and ethics: a european overview. *Stem cell transplantation and ethics: a european overview*, 19, 113-118.
- Hubert E. Schroeder, M. A. (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontology 2000*, 13, 91-120.
- Hughes, A. L. (2008). Functional diversification of the toll-like receptor gene family. *Immunogenetics*, 60, 249-256.
- J Han, D. M. (2014). Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *Journal Periodontal Research*, 49, 333-45.
- J.P. Pihlström, M. A.-P. (2012). Global prevalence of gingivitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 39, 1-9.
- Javier Nuñez, N. S.-M.-S. (2017). Cell therapy with allogenic canine periodontal ligament-derived cells in periodontal regeneration of critical size defects. *Journal of Clinical Periodontol*, 45, 453-461.
- Jie Pan, J. D. (2019). Investigating the repair of alveolar bone defects by gelatin methacrylate hydrogels-encapsulated human periodontal ligament stem cells. *Journal of Material of Science : Materials and Medicine*, 5, 31-3.
- Jiling Qiu, X. W. (2020). 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 Research Therapy*, 3, 11-42 .
- Joo-Young Park, S. H.-H. (2011). Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis. *Efficacy of periodontal stem cell transplantation in the treatment of advanced periodontitis*, 20, 271-85.

- Kachlany. (2010). Aggregatibacter actinomycetemcomitans leucotoxin: from threat to therapy. *J Dent Res*, 89, 561-570.
- Karring T, N. S. (1980). Healing following implantation of periodontitis affected roots. *J Clin Periodontol*, 7, 96–105.
- Kawai, T. M. (2006). B and t lymphocytes are the primary sources of rankl in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *The American Journal of Pathology*, 169, 987-998.
- Kengo Iwasaki, K. A. (2019). The Fate of Transplanted Periodontal Ligament Stem Cells in Surgically Created Periodontal Defects in Rats. *International Journal of Molecular Science*, 7, 192.
- Kengo Iwasaki, M. K. (2014). Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion. *Tissue Engineering Part A*, 20, 693-704.
- Khan, F. S. (2021). Systematic review and meta-analysis of anakinra, sarilumab, siltuximab and tocilizumab for covid-19. *Thorax*, 76, 907-919.
- Kousholt, B. P.-H. (2022). Reporting quality in preclinical animal experimental research in 2009 and 2018: a nationwide systematic investigation. *Plos One*, 17, 2-13.
- Krzyściak, W. J. (2013). The virulence of streptococcus mutans and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Amp*, 33, 499-515.
- Krzysztof Marek Mrozik, N. W. (2013). Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine model. *Regenerative Medecine*, 8, 711-723.
- Li, W. H. (2022). Activation of functional somatic stem cells promotes endogenous tissue regeneration. *Journal of Dental Research*, 101, 802-811.
- Li, Y. Z. (2016). Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem Cell Research & Therapy*, 7, 141.
- Löe al,. (1986). Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate. *J clin periodontol*, 13, 431-440.
- M Gomez Flores, M. H. (2008). Cementum-periodontal ligament complex regeneration using the cell sheet technique. *J Periodontal Research*, 43, 364-71.
- M.J. Mondrinos, R. D. (2006). Porogen-based solid freeform fabrication of polycaprolactone-calcium phosphate scaffolds for tissue engineering. *Biomaterial*, 27, 4399-4408.
- Mariotti, Q. M. (2013). Chronic Periodontitis and Cardiovascular Disease: A Controlled Clinical Trial. *Eur J Inflammation*, 2, 459-467.

- Martínez, G. Z. (2009). Smad3 régule différenciellement l'induction de la différenciation régulatrice et inflammatoire des lymphocytes T. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 35283-35286.
- Maumus, M. P. (2018). Cellules souches mésenchymateuses et médecine régénératrice. *Médecine/Sciences*, 34, 1092-1099.
- Melcher. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*, 47, 256-60.
- Michael G. Newman, H. H. (2006). Composition of human root cementum in relation to position on the root. *Journal of Dental Research*, 85, 873-879.
- Michael G. Newman, H. H. (2013). Periodontal diseases: Aetiology, diagnosis and treatment. *Periodontology 2000*, 62, 1-131.
- Miura, M. G. (2003). Shed: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 5807-5812.
- Moher, D. L. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the prisma statement. *Plos Medicine*, 339, 2535.
- Myon, L. F. (2011). Ingénierie du tissu osseux oro-maxillofacial par combinaison de biomatériaux, cellules souches, thérapie génique. *Revue De Stomatologie Et De Chirurgie Maxillo-Faciale*, 112, 201-211.
- Nerea Sánchez, L. F.-Z.-S.-S.-S. (2020). 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 Clinique Periodontol*, 47, 1391-1402.
- P.X. Ma, J. C. (2001). Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering*, 7, 22-23.
- Paepe, C. K. (2014). Totipotency and lineage segregation in the human embryo. . *Molecular Human Reproduction*, 20, 599-618.
- Peer W Kämmerer, M. S. (2017). Guided Bone Regeneration Using Collagen Scaffolds, Growth Factors, and Periodontal Ligament Stem Cells for Treatment of Peri-Implant Bone Defects In Vivo. *Stem Cells International*, 1-9.
- Pereira, P. a. (2019). A precision rna degradation machinery shapes stem cell development. *The Journal of Cell Biology*, 218, 2437-2438.
- Petersen. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epid*. 1, 3-23.
- Pihlstrom, B. L. (2005). Periodontal diseases. *The Lancet*, 366(9499), 1809-1820.
- PLA, P. (2021). *Les cellules souches*. Retrieved from BIOLOGIE CELLULAIRE ET GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT.1-10.

- Plaza, G. M. (2014). Simple measurement of the apparent viscosity of a cell from only one picture: application to cardiac stem cells. *Physical Review E*, 90, 1-5 .
- Polimeni G, X. A. (2006). Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000*, 41, 30-47.
- PolimeniG, X. (2006). Biology and principe od periodontal wound healing/regeneration . *Periodontology 2000*, 33, 164-171.
- Robert Lanza, R. L. (2020). *Principles of Tissue Engineering*. Academic Press.
- Ross, R. B.-P. (1990). Platelet-derived growth factor and its role in health and disease. . *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, 327, 155-169. .
- Ruzaidi, D. A. (2021). Advocating electrically conductive scaffolds with low immunogenicity for biomedical applications: a review. . *Polymers*, 13(19), 3395.
- Salgado, A. C. (2004). Ingénierie du tissu osseux : état de l'art et tendances futures. *Bioscience macromoléculaire*, 4, 743-765.
- Sanz M, H. D.-E. (2013). Prognostic factors in regenerative periodontal therapy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 40, 483-494.
- Shimoaka, T. O. (2002). Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (fgf)-18 in comparison with fgf-2 and fgf-10. . *Journal of Biological Chemistry*, 277, 7493-7500.
- Simandi, Z. B. (2010). Activation of retinoic acid receptor signaling coordinates lineage commitment of spontaneously differentiating mouse embryonic stem cells in embryoid bodies. . *Febs Letters*, 584, 3123-3130.
- Socransky S S, H. A. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Parodontol*, 25, 134-144.
- Su-Hwan Kim, K.-H. K.-M.-T.-I.-J.-C.-P.-M. (2009). Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontol*, 80, 1815-23.
- Sun, W. G. (2021). Silk fibroin as a functional biomaterial for tissue engineering. . *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 1499. .
- Sunita P. Ho, M. P. (2010). The biomechanical characteristics of the bone-periodontal ligament-cementum complex. *Biomaterial* , 31, 6635-6646.
- Sven-Erik Hamp, S. N. (1975). Traitement parodontal des dents multi-enracinées. *Journal of Clinical Periodontology*, 2, 126-135.
- Takahashi, K. a. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 , 663-676.

- Tarnow D, F. P. (1984). Classification of the vertical component of furcation involvement. *J Periodontol*, 55, 283-4.
- Tsitoura E, T. R. (2006). Baseline radiographic defect angle of the intrabony defect as a prognostic indicator in regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivative. *J Clinic Periodontol*, 8, 643-7.
- Wei Zheng, S. W. (2015). Periodontitis promotes the proliferation and suppresses the differentiation potential of human periodontal ligament stem cells. *International Journal of Molecular Medecine*, 36, 915-22.
- Wenhao Wang, A. W. (2023). Potential of an Aligned Porous Hydrogel Scaffold Combined with Periodontal Ligament Stem Cells or Gingival Mesenchymal Stem Cells to Promote Tissue Regeneration in Rat Periodontal Defects. *ACS Biomater Sci Engineering*, 10, 1961-1975.
- X. Liu, P. M. (2004). Polymer scaffolding for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-486.
- Xia, P. a. (2021). Vascularization in tissue engineering: the architecture cues of pores in scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110, 1206-1214. .
- Xu, S. (2008). Locally applied simvastatin promotes fracture healing in ovariectomized rat: a novel molecular mechanism. *Osteoporosis International*, 19, 1645-1645.
- Xuejing Duan, Z. L. (2018). Study of platelet-rich fibrin combined with rat periodontal ligament stem cells in periodontal tissue regeneration. *Journal of Cellular Molecular Medecine*, 22, 1047-1055.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10, 678-684. .
- Yang Zhao, Y. G. (2022). The Experimental Study of Periodontal Ligament Stem Cells Derived Exosomes with Hydrogel Accelerating Bone Regeneration on Alveolar Bone Defect. *Pharmaceutics*, 14, 2189.
- Yao, S. H. (2013). Expression of bone morphogenetic protein-6 in dental follicle stem cells and its effect on osteogenic differentiation. *Cells Tissues Organs*, 198, 438-447.
- Yi Liu, Y. Z. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine*, 26, 1065-73.
- Y-T Kim, J.-C. P.-H.-S.-I.-S.-S. (2012). The dynamic healing profile of human periodontal ligament stem cells: histological and immunohistochemical analysis using an ectopic transplantation model. *J Periodontal Research*, 47, 514-24.

- Zhang Y, L. X. (2015). Lipopolysaccharide-regulated production of bone sialoprotein and interleukin-8 in human periodontal ligament fibroblasts: the role of toll-like receptors 2 and 4 and the MAPK pathway. *J Periodontal Res*, 50, 141–151.
- Zhenhua Yang, F. J. (2009). Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel three-dimensional pellet cultivation system for human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 15, 571-81.

VIII. ANEXOS

De : Mark Bartold <mark.bartold@adelaide.edu.au>
Envoyé : Wednesday, February 28, 2024 9:38:12 AM
À : Romain PODEMBSKI <romain.news@hotmail.fr>
Objet : Re: Authorization for using histological sections

OK

Sent from my iPhone

On 28 Feb 2024, at 18:43, Romain PODEMBSKI <romain.news@hotmail.fr> wrote:

CAUTION: External email. Only click on links or open attachments from trusted senders.

Hello,

I am a student in dental surgery at Egas Moniz University of Lisbon. as part of my these on "the ability of PDLSC to regenerate periodontal tissue" I would like to analyze and present, with your authorization one of your histological sections of your article « Regeneration of periodontal tissues using allogeneic periodontal ligament stem cells in an ovine mode ».

Thanks in advance
Romain Podembski