

MÔNICA GRAZIELI CORRÊA

## **Engenharia tecidual e regeneração periodontal**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção de título de Especialista em Periodontia.

Orientador: Prof. Enilson Antônio Sallum

Piracicaba

2006

MÔNICA GRAZIELI CORRÊA

## **Engenharia tecidual e regeneração periodontal**

Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para obtenção de título de Especialista em Periodontia.

Orientador: Prof. Enilson Antônio Sallum

377

**UNICAMP / FOP  
BIBLIOTECA**

Piracicaba

2006

Unidade FOP/UNICAMP
N. Chamada <u>C817e</u>
Vol. .... Ex. ....
Tombo BC/ .....

Unidade - FOP/UNICAMP  
TCE/UNICAMP

Ed. ....

Vol. .... Ex. ....

Tombo 4698

C  D

Proc. 16P-134/2010

Preço R\$ 11,00

Data 13/04/2010

Registro 767513

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
 Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

C817e	<p>Corrêa, Mônica Grazieli.          Engenharia tecidual e regeneração periodontal. / Mônica Grazieli Corrêa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.          45f.</p> <p align="center"><b>Orientador: Enilson Antônio Sallum.</b>          Monografia (Especialização) -- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Células -- Tronco. 2. Periodontia. I. Sallum, Enilson Antônio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p align="right">(mg/fop)</p>
-------	--

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela força que Ele sempre me dá em todos os momentos que preciso.

À minha família, pelo carinho e estímulo constantes.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, pela atenção oferecida e pela orientação deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum, Francisco Humberto Nociti Jr e Márcio Casati, pelos ensinamentos proporcionados.

Aos colegas periodontistas Edwil, Jorge e Vinícius, pela orientação clínica que tanto enriqueceu o meu aprendizado.

À secretária da Disciplina de Periodontia, Eliete A. Ferreira Lima, pela prontidão em ajudar sempre que preciso.

Ao meu noivo, Fábio, que tem estado ao meu lado me apoiando e estimulando. Descobri que, muito além da busca pelo conhecimento, a razão da minha vinda para Piracicaba foi encontrar esse grande amor. Obrigada pela sua paciência e sua compreensão.

À amiga Mirella, pelo companheirismo em todas as horas e por me acolher em sua casa.

Olho sempre para cima,  
A fim de ver a luz,  
E não a minha sombra.

Richard Bach

## SUMÁRIO

Resumo.....	06
Abstract.....	07
Introdução.....	08
Desenvolvimento.....	10
• Regeneração periodontal.....	10
➤ Capacidade regenerativa dos tecidos periodontais.....	11
➤ Procedimentos regenerativos.....	12
➤ Processo regenerativo.....	16
• Engenharia tecidual – O novo paradigma da regeneração periodontal.....	19
➤ Pré-requisitos para o sucesso da engenharia tecidual.....	20
➤ Células tronco e regeneração periodontal.....	23
Conclusões.....	31
Referências.....	33

## RESUMO

A Odontologia vem sofrendo grandes evoluções desde o final do século XX. Essas mudanças são notadas principalmente na periodontia. A compreensão dos processos biológicos e patológicos, o estabelecimento de conceitos e o desenvolvimento de modalidades terapêuticas promoveram avanços significativos na busca pela reabilitação oral. Em periodontia, esse processo foi marcado pela busca da reconstrução anatômica e funcional do periodonto (Sallum et al., 2005). A regeneração periodontal é um processo intensamente estudado. No entanto, nenhuma das técnicas propostas trouxe a regeneração periodontal esperada. Recentemente, o estudo da engenharia tecidual tem sugerido a possibilidade de uso da terapia celular como alternativa para as técnicas até então utilizadas (Akizuki et al, 2005; Vacanti et al, 1991; Cooper et al, 1991; Atala et al, 1992). Recentes avanços em relação aos fatores de crescimento e polímeros biodegradáveis têm dado condições para o sucesso da engenharia tecidual para cartilagem, osso e outros tecidos, e o periodonto pode ser considerado um ótimo candidato para tais procedimentos (Bartold et al.,2000). Uma estratégia de engenharia tecidual para regeneração periodontal que explora a capacidade regenerativa das células tronco do periodonto é uma idéia atrativa. O conhecimento dos conceitos básicos de regeneração periodontal e dos princípios necessários para o sucesso da engenharia tecidual como terapia para a regeneração periodontal, bem como a compreensão do seu princípio biológico tornam-se necessários para o entendimento deste novo paradigma da terapia periodontal regenerativa.

## ABSTRACT

Since the twentieth century, many modifications have been seen in the odontology. These changes are noticed specially in periodontics. The comprehension of biologic and pathologic principles, the concept establishment and the development of therapeutic modalities promoted significant advances in the search for the oral rehabilitation. In periodontics, this process was marked for the attempt of the anatomic and functional reconstruction of the periodontium (Sallum et al., 2005). The periodontal regeneration is an intensive studied process. However, any of these techniques brought the expected periodontal regeneration. Recently, the tissue engineering science has suggested a new possibility of cell therapy as an alternative for the used techniques (Akizuki et al, 2005; Vacanti et al, 1991; Cooper et al, 1991; Atala et al, 1992). Recent advances in growth factor biology and biodegradable polymers have set the stage for successful tissue engineering of cartilage, bone and other tissues, and the periodontium could be considered a prime candidate for such procedures (Bartold et al.,2000). A tissue engineering strategy for periodontal regeneration that explores the regenerative capacity of stem cells residing in the periodontium is an attractive idea. The knowledge of the basic concepts of periodontium regeneration and the requirements for successful tissue engineering as a regenerative technique, as well as the comprehension of its biological principle are necessary for the comprehension of the new paradigm for periodontal regeneration.



## 1. INTRODUÇÃO

A Odontologia vem sofrendo grandes evoluções desde o final do século XX. Essas mudanças são notadas principalmente na periodontia. A compreensão dos processos biológicos e patológicos, o estabelecimento de conceitos e o desenvolvimento de modalidades terapêuticas promoveram avanços significativos na busca pela reabilitação oral. Em periodontia, esse processo foi marcado pela busca da reconstrução anatômica e funcional do periodonto (Sallum et al., 2005).

A regeneração periodontal é um processo intensamente estudado. A busca pela regeneração periodontal tem sido marcada pelo uso de diversas técnicas: a regeneração tecidual guiada (RTG) (Melcher, 1976; Gottlow et al., 1984; Nyman et al., 1987), o uso de substitutos ósseos (Schallhorn, 1972; Schallhorn & Hiatt, 1972; Sanders et al., 1983; Kenney et al., 1988), o condicionamento da superfície radicular e o uso dos fatores de crescimento celular (Sallum et al., 2003). No entanto, nenhuma das técnicas citadas trouxe a regeneração periodontal esperada. No uso de substitutos ósseos foram observadas anquilose, reabsorção e formação de epitélio juncional longo. A eficácia dos fatores de crescimento tem sido mostrada em estudos *in vitro* e *in vivo*, mas a eficácia clínica no tratamento de defeitos periodontais e o risco de transmissão de DNA ou proteínas estranhos precisam ser determinados. A RTG mostrou ótimos resultados em estudos animais, mas clinicamente esses resultados variam muito, dependendo do tipo de defeito ou da quantidade residual de ligamento periodontal (Lang et al., 1998; Hasegawa et al., 2005).

Recentemente, o estudo da engenharia tecidual tem sugerido a possibilidade de uso da terapia celular como alternativa para as técnicas até então utilizadas (Akizuki et al, 2005; Vacanti et al, 1991; Cooper et al, 1991; Atala et al, 1992). A engenharia tecidual é um campo emergente da ciência, cujo objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a fabricação de novos tecidos para reposição de tecidos danificados ou

perdidos por doenças. É baseada nos princípios da biologia celular, do desenvolvimento biológico e dos biomateriais (Narem et al., 1995; Reddi, 1998; Vacanti et al., 1991). Recentes avanços em relação aos fatores de crescimento e polímeros biodegradáveis têm dado condições para o sucesso da engenharia tecidual para cartilagem, osso e outros tecidos, e o periodonto pode ser considerado um ótimo candidato para tais procedimentos (Bartold et al., 2000). Alguns estudos têm mostrado que células do ligamento periodontal podem ser transplantadas para defeitos periodontais sem efeitos adversos imunológicos ou inflamatórios (Van Dijk et al., 1991; Lang et al., 1998; Malekzeh et al., 1998). Cementoblastos, assim como várias células periodontais transferidas como vetores para expressão de variados fatores de crescimento, têm sido investigados nos modelos de engenharia tecidual periodontal (Jin et al., 2003; Jin et al., 2004; Zhao et al., 2004-9). Uma estratégia de engenharia tecidual para regeneração periodontal que explora a capacidade regenerativa das células tronco do periodonto é uma idéia atrativa. Pelo uso desta abordagem, a necessidade de recrutamento de células é eliminada e a previsibilidade do sucesso pode ser aumentada.

Desta forma, o conhecimento dos conceitos básicos de regeneração periodontal e dos princípios necessários para o sucesso da engenharia tecidual como terapia para a regeneração periodontal, bem como a compreensão do seu princípio biológico tornam-se necessários para o entendimento deste novo paradigma da terapia periodontal regenerativa.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1. Regeneração periodontal

A reposição dos tecidos periodontais perdidos é um grande desafio para a periodontia. Após o surgimento da terapia ressectiva nos anos 50, surgiu a terapia regenerativa, que apresenta duas alternativas: o preenchimento dos defeitos com o intuito de obter regeneração; e como alternativas, técnicas têm sido desenvolvidas para guiar os componentes celulares do periodonto a agir diretamente no processo regenerativo tendo como base o desenvolvimento natural dos tecidos periodontais.

De acordo com o Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontia (2005), regeneração periodontal consiste na formação de novo cemento sobre uma superfície radicular contaminada, associada a um novo ligamento periodontal e osso neoformado. Para tanto, são necessários pelo menos quatro critérios para se considerar que a regeneração tenha ocorrido (Bartold et al, 2000):

1. selamento epitelial funcional restabelecido na porção mais coronária dos tecidos de mais de 2 mm de comprimento;
2. novas fibras de Sharpey inseridas na raiz previamente exposta à doença reproduzindo o ligamento periodontal e as fibras dentogengivais;
3. novo cemento acelular de fibras extrínsecas sobre a superfície radicular exposta;
4. altura de novo osso alveolar há 2 mm da junção amelocementária.

Para que ocorra a regeneração periodontal, alguns eventos precisam ser regulados a nível molecular e celular (Pitaru et al., 1994; Narayanan & Bartold, 1995; Bartold et al., 2000):

- disponibilidade de células e citocinas apropriadas;
- exclusão de células indesejadas;
- adequação do meio local (matriz cementária e junção amelocementária);
- presença de substâncias no meio local que afetam migração, adesão, proliferação e diferenciação celular;
- efeito específico sobre as células.

O processo de cura de tecidos danificados requer a participação de moléculas inflamatórias e de células, envolvendo vários estágios: inflamação, formação de tecido de granulação remodelação tecidual (Carranza et al., 2004). O tipo de reparo depende da disponibilidade de células apropriadas, mediadores solúveis e produção de matriz extracelular (Mckay, 1997).

Com o entendimento dos processos biológicos e moleculares do desenvolvimento periodontal, a terapia regenerativa baseada no preenchimento de defeitos parece um tanto arcaica e ineficaz. Por isso, devem ser canalizados esforços no desenvolvimento de terapias que têm como base o desenvolvimento natural do periodonto e os princípios biológicos.

### **2.1.1. Capacidade regenerativa dos tecidos periodontais**

Diante da destruição tecidual causada pela periodontite, a regeneração destes tecidos geralmente não ocorre com base na terapia clínica, como é o caso da gengivite. O grande desafio enfrentado pelos periodontistas consiste em recriar estes tecidos perdidos e, principalmente, em promover a nova inserção de fibras do tecido conjuntivo na superfície previamente exposta à doença (Garrett, 1996; Minabe, 1991; Schroeder, 1992; Wikesjo et al., 1992).

## **2.1.2. Procedimentos regenerativos**

### **a. Abordagens cirúrgicas regenerativas**

Ao longo do tempo, uma grande variedade de técnicas cirúrgicas tem sido descrita para a regeneração periodontal (Laurell et al., 1998). No entanto, independente da técnica, o tecido epitelial sempre prolifera mais rapidamente que os tecidos mesenquimais, levando à formação de epitélio juncional longo (Listgarten & Rosemberg, 1979; Nyman et al., 1980; Karring et al., 1980; Nyman et al., 1985). De acordo com Bartold (2000), este epitélio parece não promover formação de cemento e de ligamento periodontal, como ocorre na presença do epitélio odontogênico. Embora a formação de epitélio juncional longo proporcione sucesso clínico e saúde periodontal, este tipo de resposta consiste em uma forma de reparo e não regeneração propriamente dita, uma vez que a arquitetura original do periodonto não é restabelecida. Desta forma, são necessários outros procedimentos, como o uso de materiais de preenchimento para reaver esta anatomia.

### **b. Condicionamento da raiz**

Ao longo do tempo, variadas substâncias foram usadas com o objetivo de criar um ambiente favorável para a regeneração periodontal. Acreditava-se que a superfície radicular precisava ser limpa de forma a permitir reinserção celular e produção de matriz extracelular. Para tanto, usou-se para condicionamento da superfície radicular, desde condicionamento ácido até agentes biológicos como a fibronectina. O objetivo destes procedimentos seria expor as fibras de colágeno para que as novas fibras se interdigitassem a elas e ainda, afastar a colonização de

células epiteliais indesejadas. Entretanto, os resultados obtidos foram diferentes dos esperados. Observou-se anquilose e absorção em vez da tão esperada regeneração periodontal (Crigger et al., 1978; Marks & Mehta, 1986). O uso de agentes biológicos, como a fibronectina, soa como algo lógico, já que estaria seguindo os princípios biológicos. No entanto, o soro contém altos níveis de fibronectina e os benefícios para facilitar a reinserção celular são incertos (Pearson et al., 1988).

### c. Materiais de enxerto e preenchimento

A necessidade de eliminar os defeitos ósseos periodontais fez surgir um grande número de materiais de enxerto. Dentre eles, os materiais autógenos, alógenos e aloplásticos (Lindhe et al., 2005; Carranza et al., 2004).

Materiais de enxerto			
	Autógenos	Alógenos	Aloplásticos
Tipos	Osso cortical Ossos esponjoso Crista do íliaco Calota craniana	DFDBA FDDBA	Cerâmicas Hidroxiapatita Polímeros Biovidro
Propriedades	Osteogênico	Osteocondutor/osteoadutor	Osteocondutor

O uso destes materiais de enxerto traz algum ganho de inserção e a evidência radiográfica de preenchimento do defeito. Porém, estudos histológicos mostram que estes materiais têm pouca atividade osteogênica, que, normalmente, o material fica encapsulado em densas fibras de tecido conjuntivo e que o epitélio juncional parece se formar entre o enxerto e a superfície dentária (Dragoo & Sullivan, 1973; Moskow,

1979). Sendo assim, estes materiais também não promovem regeneração periodontal propriamente dita.

#### **d. Regeneração tecidual guiada – RTG**

O princípio da regeneração tecidual guiada é isolar o epitélio gengival, evitando a migração apical do epitélio juncional e a migração de células do tecido conjuntivo gengival para a superfície radicular, facilitando a reinserção de células do ligamento periodontal e do osso (Nyman et al., 1982; Gottlow et al., 1986; Karring et al., 1993). O princípio biológico da RTG presume que o ligamento periodontal contenha todas as células necessárias para a regeneração periodontal. Desta forma, a RTG traria grande sucesso clínico. No entanto, estudos longitudinais revelam que os resultados clínicos obtidos variam muito e não são tão bons como esperados (Pontoriero & Lindhe, 1995; Wallace et al., 1994; Bratthall, 1998). Além disso, a exposição e contaminação da membrana são complicações muito freqüentes (Tempo & Nalbandian, 1993; Demolon & Person, 1994; MacDonald et al., 1998). O princípio da RTG é muito válido, pois foi o início de investigações fundadas no desenvolvimento natural do periodonto, mas os resultados obtidos são insatisfatórios.

#### **e. Fatores de crescimento**

Os fatores de crescimento são polipeptídios que podem agir local ou sistemicamente na proliferação e função celular por meio da regulação, proliferação, migração e diferenciação das células do organismo. Os fatores de crescimento são agentes de grande interesse para a regeneração periodontal em função de suas ações regulatórias sobre as funções imunes e sobre a proliferação e diferenciação de epitélio, osso e tecido conjuntivo (Bartold et al., 2000).

O princípio biológico dos fatores de crescimento baseia-se no fato de que o efeito dos mediadores endógenos pode ser ampliado pela ação de fatores de crescimento exógenos (Graves & Cochran, 1994 – sobrepe). Vários fatores de crescimento têm sido estudados: (Paiva & Almeida, 2005)

- Fator básico de crescimento derivado de fibroblastos;
- Proteínas morfogenéticas ósseas – BMP;
- Fator de crescimento epidérmico;
- Matriz derivada do esmalte – Emdogain;
- Fator de crescimento de fibroblastos – FGF;
- Fator de crescimento semelhante à insulina – IGF;
- Fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF;
- Fator de crescimento transformador – TGF.

O fator de crescimento derivado de plaqueta e o fator de crescimento semelhante à insulina têm demonstrado aumento da regeneração em cães e macacos submetidos a periodontite experimental (Lynch et al., 1991; Rutherford et al., 1993). As proteínas ósseas morfogenéticas oferecem potencial para estimulação de regeneração óssea e de cimento (Ripamonti & Reddi, 1994; Kuboki et al., 1998).

Embora pareça interessante o uso de fatores de crescimento, ainda não existem estudos clínicos longitudinais que comprovem sua eficácia. O conhecimento em relação à diferenciação das células periodontais é restrito, o que dificulta a utilização desses fatores.



### **2.1.3. Processo regenerativo**

#### **a. Seleção, diferenciação e maturação celular**

Os tecidos periodontais possuem variados tipos de células com diferentes funções e de diferentes origens (fibroblastos; osteoblastos, cementoblastos e células endoteliais) (McCulloch & Bordin, 1991; Fries et al., 1994; Lekic et al., 1997). Além dessas células, existem também as células inflamatórias presentes no início do processo de reparo, já que elas secretam moléculas necessárias para a produção de células do tecido conjuntivo que participam dos processos regenerativo e de reparo. Os fibroblastos originam-se das células progenitoras localizadas nos tecidos conjuntivos da gengiva e do ligamento periodontal. Os cementoblastos parecem se originar de células do ligamento periodontal e do osso (McCulloch & Melcher, 1983; McCulloch, 1985). Para que a regeneração ocorra é preciso que as células estejam em quantidade suficiente, no local certo e que sejam produzidas na seqüência temporal correta. Pelo que tudo indica, este processo seletivo é ditado pela interação de sinalizadores, moléculas solúveis, matriz protéica e receptores celulares que iniciam respostas na expressão gênica através de vias intracelulares de sinalização (Bartold et al., 2000).

#### **b. Mediadores solúveis e reguladores da função celular**

O mecanismo de ação dos mediadores solúveis é via receptores de superfície, que leva a um efeito na expressão gênica através da regulação de fatores de indução de transcrição (Maniatis et al., 1987; Vellanoweth et al., 1994). A interação de mediadores solúveis e receptores celulares desencadeia processos de sinalização intracelular que derivam em respostas celulares, como migração,

mudança na arquitetura celular e síntese de matriz extracelular. Esta interação, por sua vez afeta as interações entre célula e matriz e entre células.

As moléculas necessárias para regeneração periodontal podem ser agrupadas em três categorias: fatores de crescimento polipeptídios, proteínas de adesão e componentes estruturais. Muitas dessas moléculas têm sido identificadas na matriz cementária e óssea: proteína de adesão osteopontina, sialoproteína óssea, fibronectina e fatores de crescimento (Nakae et al., 1991; MacNeil & Somerman, 1993; Narayana & Bartold., 1996). Segundo Bartold et al (2000), apesar de o papel dessas substâncias na ativação celular estar sendo estudado, pouco pode se considerar em relação à regeneração periodontal, já que o mesmo fator de crescimento pode estar relacionado a diferentes funções dependendo do estágio do processo, do tipo de célula alvo e da disponibilidade de matriz extracelular.

### **c. Matriz extracelular**

A matriz extracelular executa um importante papel na regeneração periodontal, regulando os eventos necessários para a mesma. A síntese e deposição de mediadores solúveis acontece coordenadamente à síntese e deposição de macromoléculas da matriz extracelular. A matriz extracelular regula a expressão gênica, mas os mecanismos deste processo ainda não são claros (Adams & Watt, 1993; Ruoslahti & Reed, 1994; Gumbiner, 1996; Assoian & Zhu, 1997; Danen et al., 1998).

A matriz celular é composta de colágeno, fibronectina, lamilina e outras proteínas não colagênicas e proteoglicanos, e regula diversas atividades celulares (Sastry & Horwitz, 1996; Xiao et al., 1998; Zheng et al., 1999). Ela afeta a migração, divisão e diferenciação celular, funciona como substrato para adesão celular e promove difusão celular e organização do citoesqueleto (Assoian & Zhu, 1997;

Assoian, 1997). A matriz extracelular ainda protege as células contra apoptose através de mecanismos envolvendo integrinas e eventos relacionados a sinais de insulina (Frisch & Ruoslahti, 1997; Lebrun et al., 1998; Buckely et al., 1999; Farrelly et al., 1999). Para alcançar a regeneração periodontal, será necessário determinar quais os componentes da matriz extracelular regulam a expressão gênica de fatores de crescimento e seus receptores, a resposta celular a agonistas e a regulação gênica do movimento, proliferação e diferenciação celulares (Adams & Watt, 1993; Lynch et al., 1995; Gumbiner, 1996; Sastry & Horwitz, 1996; Assoian, 1997).

A matriz extracelular juntamente com qualquer fator de crescimento disponível pode determinar quais células serão recrutadas e quando uma lesão sofrerá reparo ou regeneração (Cantley et al., 1991; Adams & Watt, 1993; Assoian, 1997). Esta informação gera a hipótese de que a ausência de matriz extracelular apropriada é uma razão pela qual o cemento não se forma em superfícies radiculares que foram instrumentadas (Bartold et al., 2000).

#### **d. Neoformação de cemento**

O cemento executa um importante papel na regeneração periodontal (Bosshardt & Schroeder, 1992; Schroeder, 1992; Schroeder, 1993; Yamamoto et al., 1996). No entanto, não se sabe como a formação de cemento é regulada no homem adulto (Karring et al., 1980; Boyko et al., 1981; Nyman et al., 1982; Melcher et al., 1986 - 5). A matriz extracelular do cemento seqüestra fatores de crescimento e outros polipeptídios como osteopontina e sialoproteína óssea (Somerman et al., 1989; MacAllister et al., 1990; Olson et al., 1991; MacNeil & Somerman, 1993; Narayanan et al., 1995; Pitaru et al., 1995). Essas moléculas afetam a migração, adesão e proliferação de células periodontais e a síntese de matriz dessas células e ainda manifestam especificidade celular e tecidual entre o mesmo tipo celular (Olson et al., 1991; Somerman, 1993; Narayanan et al., 1995; Pitaru et al., 1995). A matriz

extracelular do cimento tem o potencial de regular a diferenciação de células precursoras nos cementoblastos (Tatakis, 1993). Desta forma, os componentes do cimento são capazes de emitir sinais para recrutamento, proliferação e diferenciação de células periodontais e regulam a regeneração do cimento, assim como a regeneração de outros componentes periodontais (Bartold et al., 2000).

## **2.2. Engenharia tecidual – O novo paradigma da regeneração periodontal**

A engenharia tecidual é um campo emergente da ciência, cujo objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a fabricação de novos tecidos para reposição de tecidos danificados ou perdidos por doenças. É baseada nos princípios da biologia celular, do desenvolvimento biológico e dos biomateriais (Narem et al., 1995; Reddi, 1998; Vacanti et al., 1991).

Para produzir um tecido através da engenharia tecidual, são necessários alguns fatores: apropriado nível e seqüência de sinais reguladores, presença de células progenitoras viáveis e apropriada matriz extracelular ou material carreador (Nakahara et al., 2000; Bartold et al., 2000). Recentes avanços em relação aos fatores de crescimento e polímeros biodegradáveis têm dado condições para o sucesso da engenharia tecidual para cartilagem, osso e outros tecidos, e o periodonto pode ser considerado um ótimo candidato para tais procedimentos (Bartold et al., 2000). Alguns estudos têm mostrado que células do ligamento periodontal podem ser transplantadas para defeitos periodontais sem efeitos adversos imunológicos ou inflamatórios (Lang et al., 1998; Malekzeh et al., 1998; Van Dijk et al., 1991). Cementoblastos, assim como várias células periodontais transferidas como vetores para expressão de variados fatores de crescimento, têm sido investigados nos modelos de engenharia tecidual periodontal (Jin et al., 2004; Jin et al., 2003; Zhao et al., 2004- 9).

Uma estratégia de engenharia tecidual para regeneração periodontal que explora a capacidade regenerativa das células tronco do periodonto é uma idéia atrativa. As células tronco poderiam se desenvolver no interior de um arcabouço tridimensional e posteriormente ser implantadas no interior do defeito. Pelo uso desta abordagem, a necessidade de recrutamento de células é eliminada e a previsibilidade do sucesso pode ser aumentada (Bartold et al., 2000; Bartold et al., 2000). Tendo como base o sucesso desta tática em outros sítios anatômicos, a abordagem da engenharia tecidual revela que um procedimento que leva em conta a seqüência biológica temporal dos estágios funcionais de reconstrução será essencial para a regeneração (Brekke & Toth, 1998; Pomahac et al., 1998; Reddi, 1998; Giannobile, 1999).

### **2.2.1. Pré-requisitos para o sucesso da engenharia tecidual**

Os pré-requisitos para o sucesso da engenharia tecidual são divididos em duas áreas: aspectos biomecânicos (manutenção de espaço, barreiras) e funções biológicas (biocompatibilidade, incorporação celular, incorporação de mensagens instrutivas) (Brekke & Toth, 1998).

#### **a. Manutenção do espaço dentro do defeito**

Sabe-se que para haver neoformação óssea no interior de um defeito, o espaço precisa ser mantido e a invaginação tecidual prevenida (Berg, 1947; Hurley et al., 1959). Este critério deve ser seguido para a engenharia tecidual e colocação de matrizes para regeneração. O material desenhado deve ter a forma e flexibilidade adequada para colocação dentro do defeito e ser resistente à colabação. Portanto, o material deve seguir os princípios da RTG e ter configuração semelhante àqueles

usados para tal fim (Scantlebury, 1993; Brekke & Toth, 1998). A arquitetura interna do arcabouço deve ser ideal para maximizar a colonização celular de forma seletiva e o preenchimento de tecidos compatíveis àqueles a serem regenerados (Whang et al., 1999).

#### **b. Barreiras**

A barreira ideal é aquela que impede a invaginação de tecidos indesejados e proporciona o preenchimento seletivo de tecidos fundamentais à regeneração. Portanto, a engenharia tecidual deve agir como esta barreira ideal, selecionando os tecidos que irão preencher o defeito e proporcionar a regeneração periodontal (Cima et al., 1991; Whang et al., 1999). Para tanto, a arquitetura desta barreira deve ser de forma que a superfície externa aja excluindo os tecidos indesejados e a interna induzindo o crescimento tecidual. É ainda necessário observar que o epitélio desempenha um importante papel no selamento na porção coronária do defeito. Desta forma, o princípio da engenharia tecidual para a regeneração periodontal não pode excluir totalmente o epitélio e sim, deve estimulá-lo a desenvolver, de forma rápida e eficaz, um selamento biológico adequado para proteger os eventos regenerativos (Vanheusden et al., 1999).

#### **c. Biocompatibilidade e configuração**

A configuração ideal do arcabouço deve incluir biocompatibilidade aos tecidos regenerados ou reabsorção gradativa com a regeneração (Toriumi et al., 1991; Gogolewski et al., 1993). Além disso, a regeneração tecidual através do uso de produtos da bioengenharia parece ser dependente da porosidade e do tamanho dos poros da estrutura tri-dimensional de suporte (Boyan et al., 1996; Whang et al.,

1999). Portanto, as configurações dos materiais de suporte devem considerar o tamanho ideal dos poros tanto para a inserção e incorporação celular *in vitro* como para a maturação subsequente de tecido durante a regeneração *in situ* (Bartold et al., 2000).

Dentre os materiais de suporte até então estudados, podemos citar: fosfato de cálcio, hidroxiapatita, componentes da matriz extracelular (colágeno, ácido hialurônico e fibronectina), ácido poliglicólico e outros materiais sintéticos bioreabsorvíveis (Brekke & Toth, 1998).

Obviamente, os materiais de suporte devem ser imunologicamente inertes, não devem induzir uma resposta inflamatória exagerada e não devem transmitir doenças (Omstead et al., 1998).

#### **d. Incorporação de células adequadas para a regeneração periodontal e biodisponibilidade de mensagens instrutivas**

Através do conhecimento das células adequadas para o processo periodontal regenerativo, será possível incorporar estas células a um arcabouço biodegradável para imediata introdução no defeito periodontal. Já existe a possibilidade de alteração genética das células para produção de componentes da matriz extracelular ou de mensagens instrutivas. No entanto, a biossegurança desses procedimentos ainda é questionável (Riew et al., 1998; Breitbart et al., 1999; Eton et al., 1999).

As moléculas sinalizadoras necessárias para crescimento, diferenciação e expressão gênica de uma proteína específica da matriz extracelular poderia ser incorporada às matrizes produzidas pela bioengenharia. No entanto, o controle da liberação desses agentes é algo difícil de ser alcançado (King et al., 1997).

### 2.2.2. Células tronco e regeneração periodontal

Como citado anteriormente, para que ocorra a regeneração periodontal, alguns eventos precisam ser regulados a nível molecular e celular. Esses eventos incluem o recrutamento de células progenitoras que depois se diferenciarão nas células necessárias à regeneração periodontal - células do ligamento, cemento e osso (Pitaru et al., 1994; Narayanan & Bartold, 1995; Bartold et al., 2000).

As terapias regenerativas estudadas e usadas até hoje têm apresentado pouco ou nenhum sucesso em relação aos resultados esperados. Por isso, a abordagem biológica do assunto aponta para novas alternativas de tratamento baseadas no desenvolvimento e regeneração do periodonto, tendo como enfoque a biologia celular e molecular.

O ligamento periodontal é um tecido altamente vascularizado e com grande conteúdo celular. Este tecido tem a maior taxa de *turnover* do organismo (Sodek, 1976). McCulloch e colaboradores (1987), em um estudo *in vivo*, identificaram uma pequena população de células progenitoras no ligamento periodontal. Essas células pareciam estar em maior quantidade em regiões próximas aos vasos sanguíneos e apresentavam características clássicas de células tronco, como tamanho pequeno, resposta a fatores estimuladores e ciclo lento.

De acordo com o Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontia (2005), célula tronco é uma célula pluripotente capaz de originar diferentes tipos celulares. Melcher (1985) foi o primeiro a propor que as células tronco poderiam estar presentes nos tecidos periodontais e que as três populações celulares do periodonto derivariam de uma mesma população de células ancestrais. O questionamento de Melcher em relação às células tronco foi levado adiante, mas pouca evidência foi fornecida para suportar este conceito (Pitaru et al., 1994; Amar, 1996).



Como o processo de regeneração periodontal mimetiza o processo de desenvolvimento natural, a hipótese de que células tronco estariam presentes nesses tecidos é reforçada. As técnicas de clonagem têm possibilitado o isolamento de diferentes tipos celulares do tecido periodontal e estudos sugerem que algumas das células têm características de células tronco, possibilitando futuras investigações sobre terapias regenerativas baseadas em terapia celular (Ivanovski et al, 2001).

#### **a. Identificação de células tronco periodontais**

As células tronco derivadas do ligamento periodontal foram identificadas por Seo e colaboradores (2004) e assim foram caracterizadas pela sua capacidade de gerar colônias de células de adesão com capacidade clonogênica e de se diferenciar em diferentes linhagens de células do estroma.

#### **b. Potencial de proliferação das células tronco do ligamento periodontal**

As células tronco periodontais apresentaram maior taxa de proliferação que as células tronco medulares (Friedenstein et al., 1976; Seo et al., 2004). No entanto, apesar da alta taxa de proliferação das células tronco periodontais, estas células sofrem senescência e tem limitado ciclo de vida. Este fato diferencia estas células das células embrionárias, que são virtualmente imortais. A imortalidade das células embrionárias se deve ao fato da grande expressão da enzima telomerase, que mantém o comprimento do telômero e a estabilidade cromossômica durante a divisão celular. Já para grande parte das células tronco mesenquimais, a atividade de telomerase é nula. A atividade desta enzima seria importante para adiar o processo de senescência, levando a um aumento da taxa de proliferação e de vida (Shi &

Gronthos, 2003; Gronthos et al., 2003). Estudos recentes demonstraram que se as células tronco medulares são induzidas a expressar atividade de telomerase, seu tempo de vida é aumentado em quase três vezes (Simonsen et al., 2002; Shi & Gronthos, 2003; Gronthos et al., 2003). Devido a esses fatos, pode-se notar que há a possibilidade de controlar geneticamente *ex vivo* o tempo de vida das células periodontais, regulando as suas propriedades proliferativas, tendo como objetivo a aplicação clínica. No entanto, é preciso ter cautela na aplicação de tal abordagem, pois um estudo recente de Rubio e colaboradores (2005), indicou que a expressão aumentada de telomerase pelos clones de células tronco medulares pode levar ao desenvolvimento de tumores.

### **c. Caracterização e origem das células tronco periodontais**

A caracterização e origem das células tronco periodontais ainda é algo a ser alcançado. As células tronco periodontais possuem vários fatores em comum com as células tronco medulares, com as células tronco pulpares e do osso alveolar, como expressão dos mesmos marcadores, localização peri-vascular e expressão de proteínas em comum (McCulloch et al., 1987; Moule et al., 1995; Arceo et al., 1991; D'Errico et al., 1999; Gronthos et al., 1999; Ivanoviski et al., 2001; Shi et al., 2002; Gronthos et al., 2003; Sizo et al., 2003; Seo et al., 2004). Thesleff e colaboradores (1999), propuseram que a expressão de proteínas em comum implica na existência de uma via molecular em comum regulando a formação óssea e cementária.

Ainda não se conseguiu identificar marcadores em comum associados ao ligamento periodontal e ao cimento. Tendo como base os estudos de Arzate e colaboradores (1992; 1996) e Perez e colaboradores (2003), atenta-se para a possibilidade de testar estas células à presença de proteínas associadas ao cimento e ao ligamento periodontal. Devido à semelhança morfológica e funcional entre ligamento e tendão, foi testada a expressão de um fator de transcrição específico ao

tendão (scleraxis), pelas células tronco peridontais. Esses estudos revelaram que as células tronco periodontais expressaram maiores níveis deste fator quando comparadas às células tronco medulares, o que revela que as células tronco periodontais são as únicas células pós-natais que se diferenciam das células tronco medulares mesenquimais (Bartold, 2006).

#### **d. Potencial de diferenciação e de aplicação clínica das células tronco periodontais**

Uma subpopulação de células derivadas de células do ligamento periodontal demonstraram capacidade de formação de depósitos mineralizados *in vitro* (Arceo et al., 1991; Cho et al., 1992). Seo e colaboradores (2004), demonstraram a capacidade das células tronco do ligamento periodontal de formar depósitos mineralizados.

E quanto à capacidade das células tronco periodontais de formar um tecido organizado e funcional *in vivo*?

Os estudos de Krebsbach e colaboradores (1998) e Gronthos e colaboradores (2000), sugerem que as células tronco periodontais precisam de uma arcabouço, como hidroxiapatita ou tricálcio fosfato, para induzir a formação de osso, dentina e cimento *in vivo*.

Dijk e colaboradores (1991) testaram a hipótese de que células do ligamento periodontal implantadas em defeitos ósseos podem criar nova inserção. Células do ligamento periodontal de cães foram colhidas e submetidas à cultura. Defeitos periodontais foram produzidos cirurgicamente nos cães e a cultura de células do ligamento foi implantada nas superfícies radiculares. Os resultados demonstraram que a implantação das células possibilitou a regeneração periodontal dos defeitos e impediu a migração apical do epitélio e reabsorção dentinária.

Lang e colaboradores (1995) testaram a capacidade das células do ligamento periodontal de formar tecidos diferentes *in vitro* e analisaram a tese de que células do osso alveolar poderiam se diferenciar em cementoblastos *in vivo*, quando reimplantadas juntamente com raízes dentárias. As células foram obtidas do osso alveolar e do ligamento periodontal de suínos e foram submetidas à cultura nas raízes homólogas extraídas. Cada animal recebeu 2 raízes cobertas com células do osso alveolar, 2 raízes cobertas com células do ligamento periodontal e 2 raízes controle (sem nada). As raízes controle apresentaram reabsorção e anquiose e as raízes cobertas por células do ligamento periodontal apresentaram formação tecidual *in vivo*. As células do osso alveolar sintetizaram um tecido calcificado, semelhante ao cimento, sugerindo que essas células podem se diferenciar em cementoblastos, quando implantadas com um substrato dental *in vivo*. As células do ligamento periodontal sintetizaram um tecido conjuntivo, com fibras orientadas, semelhantes ao ligamento periodontal. Os resultados indicam que as células submetidas à cultura conservam a capacidade de formar diferentes tecidos periodontais após reimplante, dependendo da origem celular, e que o osso alveolar contém precursores do cimento com potencial de se diferenciar em cementoblastos ativos, na presença de substrato dental.

Lang e colaboradores (1998) investigaram a capacidade de diferentes populações de células periodontais promoverem regeneração periodontal após cultura e reimplante em defeitos periodontais. Culturas de células foram obtidas do osso alveolar e do ligamento periodontal de suínos. Defeitos interdentais e de furca foram induzidos nos animais e foram tratados com terapias diferentes: cirurgia + reimplante de células do osso alveolar (grupo ABC) + membrana de teflon (grupo PLC); cirurgia + reimplante de células do ligamento periodontal (grupo BG); cirurgia + gelatina óssea (carreador) + membrana (grupo BG); cirurgia + membrana (grupo NBG); cirurgia (grupo FS); nenhuma terapia (grupo NT). Os defeitos foram analisados clínica e histologicamente após 10, 30 e 90 dias. O grupo ABC apresentou formação inicial de tecido calcificado no 8º dia e regeneração somente

após 90 dias. Nos grupos BG e NBG, o reparo da lesão variou de acordo com o tipo de membrana utilizada e com a morfologia do defeito. O grupo PLC apresentou resultados semelhantes aos dois grupos anteriores, no entanto, alguns defeitos apresentaram extensa formação de cimento e osso. Os grupos FS e NT sofreram reparo por epitelização. Os resultados demonstram que o reimplante de cultura de células do osso alveolar leva à formação de cimento e osso, que por sua vez conduz a formação de uma nova inserção. Pode-se especular que as células estabilizam a formação tecidual no defeito ou na superfície radicular nos estágios iniciais do processo regenerativo e previne a migração epitelial.

Seo e colaboradores (2004) realizaram um estudo em ratos imunocomprometidos, incorporando subcutaneamente um arcabouço de hidroxiapatita/tricálcio fosfato contendo células tronco periodontais. Estruturas semelhantes ao cimento e ligamento periodontal se formaram e estas estruturas se ligaram ao cimento neoformado de maneira semelhante às fibras de Sharpey.

Seo e colaboradores (2004) implantaram culturas de células tronco do ligamento periodontais em defeitos criados cirurgicamente em ratos. Os resultados mostraram que as células tronco do ligamento periodontal aderiram tanto à superfície do osso alveolar como à superfície cementária, evidenciando a formação de estruturas semelhantes ao ligamento periodontal.

Um estudo de Nakahara e colaboradores (2004) investigou um método de engenharia tecidual baseado em terapia celular, usando células autólogas derivadas do ligamento periodontal em defeitos ósseos bilaterais criados cirurgicamente. As células foram obtidas de cães e foram adicionadas a um carreador de colágeno imediatamente antes de serem implantadas nos defeitos ósseos. Um lado funcionou como controle e os defeitos ficaram vazios. A regeneração do cimento foi uniforme no lado teste, porém mais lenta quando comparada ao lado controle. Os resultados sugerem que as células do ligamento periodontal implantadas em defeitos ósseos

induzem à regeneração de cemento, indicando o potencial *in situ* da engenharia tecidual usando células autólogas para a regeneração periodontal.

Kawaguchi e colaboradores (2004) verificaram a capacidade regenerativa do autotransplante de células tronco medulares em defeitos ósseos periodontais. As células tronco foram isoladas de cães e submetidas à cultura *in vitro*. As células foram misturadas a uma solução de colágeno tipo I a 2% e transplantadas para os defeitos classe III induzidos. A solução de colágeno foi usada no grupo controle. No grupo teste, os defeitos sofreram regeneração periodontal em maior porcentagem, quando comparados ao grupo controle. Os resultados indicam que o autotransplante de células tronco medulares é uma alternativa para a regeneração periodontal.

Aizuki e colaboradores (2005) desenvolveram um método de aplicação de células do ligamento periodontal como uma camada em defeitos ósseos (deiscência) produzidos cirurgicamente em cães. As células do ligamento periodontal foram extraídas dos cães e a camada de células foi produzida através de cultura celular. As camadas de células do ligamento foram reforçadas adicionando-se as células a um carreador de ácido hialurônico e, posteriormente, estas células foram colocadas nos defeitos ósseos. Como controle, usou-se apenas o carreador de ácido hialurônico no defeito. O número de defeitos regenerados (ligamento, cemento e osso) no grupo teste foi maior que no grupo controle. Os autores afirmam que o enxerto direto de células do ligamento periodontal em defeitos ósseos poderia ser um procedimento eficaz para a regeneração periodontal. Além disso, o carreador usado foi totalmente degradado, sem sinais de inflamação, em 8 semanas após a cirurgia.

Hasegawa e colaboradores (2005) também usaram o método de aplicação de células do ligamento periodontal como camada em defeitos ósseos tipo deiscência produzidos cirurgicamente em ratos. No entanto, os autores usaram células do ligamento periodontal humano para a fabricação das camadas celulares. As células do ligamento periodontal humano foram transplantadas para os defeitos ósseos produzidos nos animais. Os resultados demonstraram tecidos semelhantes ao

ligamento periodontal, incluindo uma camada de tecido, semelhante ao cimento acelular com fibras inseridas, em seu interior. Estes resultados sugerem que essa técnica de aplicação de células do ligamento periodontal como uma camada pode ser útil para a regeneração periodontal.

### 3. Conclusões

Ao longo do estudo, tornou-se claro que alguns eventos precisam ser regulados a nível molecular e celular para que a regeneração periodontal seja alcançada. Desta forma, as terapias até agora estudadas e utilizadas parecem ser incapazes de conduzir a regeneração periodontal de forma previsível, já que as mesmas não atuam a nível celular e molecular. Essas terapias apresentam resultados aquém daqueles esperados devido a alguns fatores (Bartold et al., 2000):

- incapacidade de controlar a formação de epitélio juncional longo;
- incapacidade de isolar o sítio em questão do meio bucal e prevenir contaminação;
- restrição de regeneração aos tecidos ósseos ignorando o cimento e as fibras;
- incapacidade de definir precisamente os fatores de crescimento e diferenciação necessários para a regeneração;
- infecção da membrana ou do material regenerativo no período pós-cirúrgico.

O complexo de tecidos periodontais é único, pois a regeneração dos componentes dos tecidos duros e moles precisa ser coordenada e integrada, já que o novo tecido conjuntivo se insere no cimento e no osso. Por isso, o desenvolvimento desses tecidos começou a ser intensamente estudado com o intuito de desvendar o caminho ideal para a regeneração periodontal. Desta forma, a abordagem biológica do assunto aponta para novas alternativas de tratamento baseadas no desenvolvimento e regeneração do periodonto tendo como enfoque a biologia celular e molecular. No entanto, o entendimento da integração dos componentes necessários para se manter a forma, a integridade e a função dos tecidos ainda não foi alcançado.



A engenharia tecidual seria uma terapia que explora a capacidade regenerativa das células tronco do periodonto, dispensando a necessidade de recrutamento de células e aumentando previsibilidade do sucesso. Os diversos estudos in vivo apresentados no trabalho revelam maior controle do processo regenerativo. Entretanto, ainda é necessária a realização de estudos clínicos longitudinais para que se possa mensurar a aplicabilidade e o sucesso destas novas terapias. Por outro lado, o conhecimento dos processos biológicos e moleculares está em visível crescimento, e a regeneração periodontal parece estar cada vez mais previsível.

#### 4. Referências\*

1. Adams JC, Watt FM. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 1993, 117: 1183-1198.
2. Akizuki T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodont Res* 2005, 40: 245-251.
3. Amar S. Implications of cellular and molecular biology advances in periodontal regeneration. *Anat Rec* 1996, 245:361-373.
4. Arceo N, Saulk JJ, Moehring J, Foster Ra, Somerman MJ. Human periodontal cells initiate mineral like nodules in vitro. *J Periodontol* 1991, 62:499-503.
5. Arzate H, Chimal-Monroy J, Hernandez-LagunasJ, Diaz de Leon L. Human cementum protein extract promotes chondrogenesis and mineralization in mesenchymal cells. *J Periodontol Res* 1996, 31:144-148.
6. Assoian RK, Zhu X. Cell Anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9: 93-98.
7. Assoian RK. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J Cell Biol* 1997, 136: 1-4.
8. Atala A, Vacanti JP, Peter CA, Mandel JP, Retik AB, Freeman MR. Formation of urothelial structures in vivo from dissociated cells attached to biodegradable polymer scaffolds in vitro. *J Urol* 1992, 148:658-662.
9. Bartold MP, McCulloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue Engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000 2000,24; 253-269.
10. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 2006, 40:164-172.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

11. Berg A. Contributuins to the technique of fusion operation on the spine. *Acta Orthop Scand* 1947, 18: 1-30.
12. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: A comparision between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* 1992, 245: 267-292.
13. Boyan BD, Hummer TW, Dean DD, Scwartz Z. The role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterial* 1996, 17: 137-146.
14. Boyco GA, Melcher AH, Brunette DM. Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted in vivo after culture in vitro. *J Periodontol Res* 1981,16:73-88.
15. Bratthall G, Soderholm G, Neiderud AM, Kullendorff B, Edwarsson S, Attstrom R. Guided Tissue regeneration in the treatment of human intrabony defects, clinical, radiographical and microbiological results, a pilot study. *J Clin Periodontol* 1998, 25: 908-914.
16. Breidbart As, Grande AS, Mason JM, Brachia M, James T, Grant RT. Gene-enhanced tissue engineering: application for bone healing using cultured periosteal cells trasnsudate retrovirally with the BMP-7 gene. *Ann Plastic surg* 199, 42:488-495.
17. Brekke JH, Toth JM. Priciples of tissue engineering applied to programmable osteogeneses. *J Biomed Mater Res* 1998, 43:380-398.
18. Bruckley CD, Pilling D, Henriques NV, Parsonage G, Threl-Fall D, Scheel-Toellner D, Simmons DL, Akbar AM, Lord JM, Salmon M. RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. *Nature* 1999, 397:534-539.
19. Cantley LC, Alger KR, Carpenter C, Duckworth B, Graziane A, Kapeller R, Soltoff S. Oncogenes and signal transduction. *Cell* 1991, 64:281-302.
20. Cho MI, Matsud´a N, Lin WI, Moshier A, Ramakrischan PR. In vitro formation of mineralized nodules by periodontal ligaments cells from the rat. *Calcif Tissue Int* 1992, 50:459-467.
21. Cima LG, Vacanti JP, Vacanti C, Ingber B, Moony D, Langer R. Tissue engineering by cell transplantation using degradable polymer substrates. *J Biomech Eng* 1991, 113:143-151.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

22. Clark RAF. The molecular and cellular biology of wound repair. 2<sup>nd</sup> edn. New York: Plenum Press, 1996.
23. Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Biomaterials* 1991, 12:243-248.
24. Cortelli Jr, Lotufo RFM, Oppermam RV, Sallum AW. (Organizadores). Vários autores. Glossário da Sociedade Brasileira de Periodontia. São Paulo: SOBRAPE 2005, 15: 56p.
25. Crigger M, Bogle G, Nilveús R, Egelber J, Selvig KA. The effect of topical citric and application on the healing of experimental furcation defect in dogs. *J Periodontol Res* 1978, 13: 217-224.
26. D'Errico JA, Ouyang II, Berry JB, Macneil RL, Strayhorn C, Imperiale MJ, Harris NL, Goldberg H, Somerman MJ. Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. *Bone* 1999, 25:39-47.
27. Danen EHJ, Lafrenie RM, Miyamoto S, Yamada K. Integrin signalin: cytoeskeletal complexes, MAP kinases activation and regulation of gene expression. *Cell Adhes Commum* 1998, 6:217-224.
28. Demolon IA, Person GR, Ammons WF, Johnson RH. Effects of antibiotic treatment on clinical conditions with guided tissue regeneration: one year results. *J Periodontol* 1994, 65:713-717.
29. Dragoo MR, Sullivan HC\*. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in human. *J Periodontol* 1973, 44: 599-613.
30. Eton D, Terramani TT, Wang Y, Takahashi AM, Nigro JJ, Tang L, Yu H. Genetic engineering of stem grafts with a highly efficient pseudotyped retroviral vector. *J Vasc Surg* 1999, 29:863-873.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

31. Farrelly N, Lee Y-J, Oliver J, Dive C, Streuli CH. Extracellular matrix regulates apoptosis in mammary epithelium through a control on insulin signaling. *J Cell Biol* 1999, 144:1337-1348.
32. Friedenstein AJ, Ivanov-Smolenski AA, Chajlakjan RK, Gorskaya Uf, Kuralesova AL, Latzinik NW, Geraswimow UW. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. *Exp Hematol* 1978, 6:440-444.
33. Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempwski GD, Silvera MR, Willis RA, Phipps RP. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994, 72: 283-292.
34. Frisch SM, Ruoslahti E. Integrins and anoiks. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9: 701-706.
35. Garret S. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol* 1996, 154: 34-35.
36. Giannobile W. Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factor and gene transfer. Quintessence Publishing, 1999, 231-243.
37. Gogolewski S, Jovanovic M, Perren SM, Dillon LG, Hughes MK. Tissue response and in vivo degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides (PLA), poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-valerate) (PHB/VA). *J Biomed Mater Res* 1993, 27: 1135-1148.
38. Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1984, 11:494-503.
39. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennström J. New attachment formation in human periodontium by guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* 1986, 13: 604-616.
40. Gronthos S, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix and osteocalcin. *J Bone Miner Res* 2003, 18: 716-722.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

41. Gronthos S, Mankani M, Ibrahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Sci USA* 200, 97- 13625-13630.
42. Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Otha S, Ilay SJ, Simmons PJ. Differential cell surface expression of the SIRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 1999, 14: 47-56.
43. Gronthos S, Zannettino Ac, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kaortesidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrows. *J Cell Sci* 2003, 116:1827-1835.
44. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996, 84: 345-357.
45. Hasegawa M, Yamamoto M, Kikuchi A, Okano T, Ishhikawa I. Human Periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Engineering* 2005, 11: 469-478.
46. Hurley LA, Stinchfield FE, Basset AI, Lyon WH. The role of soft tissue in osteogenesis. *J Bone Joint Sur* 1959, 41A: 1243-1254.
47. Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regeneratives phenotype of human periodontal fibroblasts. *J Den Res* 2001, 80: 1665-1671.
48. Jin QM, Anusakathelen O, Webb SA, Printz MA, Giannobile WV. Engineering of tooth-supporting structures by delivery of PDGF gene therapy vectors. *Mol Ther* 2004, 9: 519-526.
49. Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Gianobile WV. Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. *J Biome Mater Res A* 2003. 67: 54-60.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

50. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontol* 2000 1993, 1: 26-35.
51. Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing followuin implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Cin Periodontol* 1980, 7:96-105.
52. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, TAKata T, Kato Y, Kurihara. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004, 75: 1281-1287.
53. King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinat human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Den Res* 1997, 76: 1460-1470.
54. Krebsbach PII, Mankani MII, Saomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Tranplantation* 1998, 66: 1272-1278.
55. Kuboki Y, Sasaki M, Satio A, Takita H, Kato H. Regeneration of periodontal ligament and cementum by BMP-aplied tissue engineerin. *Eur J Oral Sci* 1998, 106: 197-203.
56. Lang H, Schuler N, Arnhold S, Nolden R, Mertens T. Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultures in vitro. *J Den Res* 1995, 74: 1219-1225.
57. Lang II, Chuler N, Nolden R. Attachment formation following replantation of cultu red cells into periodontal defects. *J Dent res* 1998, 77: 393-405.
58. Laurell L, Gottlow J, Zybutz M, Persson R. Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. Aliterature review. *J Periodontol* 1998, 69: 303-313.
59. Lebrun P, Mothe-Satney I, Delahaye L, Van Obberghen E, Baron V. Insulin receptor substrate-1 as a signallin molecule for local adhesion kinase pp125FAK and pp60 src. *J Biol Chem* 1998, 273: 32244-32253.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

60. Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de periodontia clinica e implantologia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
  61. Listgarten MA, Rosenerg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol* 1979, 50: 333.
  62. Lynch MP, Stein GS, Lian JB. The influence of type I collagen on the development and maintenance of osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth adhesion and extracellular matrix mineralization. *Exp Cell Res* 1995, 216: 35-45.
  63. Lynch PC, Pender N, McCulloch CA. Is fibroblast heterogeneity relevant to the health, diseases and treatments of periodontal tissues? *Crit Rev Oral Biol Med* 1997, 8: 253-268.
  64. MacDonald ES, Nowzari H, Contreras A, Flynn J, Morison J, Slots J. Clinical and microbiological evaluation of a bioabsorbable and nonresorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *J Periodontal Res* 1993, 28: 550-559.
  65. MacNeil RL, Sommerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res* 1993, 28: 550-559.
  66. Malekzeh R, Hollinger JO, Buck D, Adams DF, McAllister BS. Isolation of human osteoblast-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. *J Periodontol* 1998, 69: 1256-1262.
  67. Maniatis T, Goodbourn S, Fischer J. Regulation of inducible and tissue specific gene expression. *Science* 1987, 236: 1237-1245.
  68. Marks SC Jr, Meh̄ta NR. Lack of effect of citric acid treatment of root surfaces on the formation of new connective tissue. *J Clin Periodontol* 1986, 13: 109-116.
  69. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontal Res* 1990, 25: 99-105.
-



70. McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B, Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Anat Rec* 1987, 219: 233-242.
71. McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991, 26: 144-154.
72. McCulloch CAG, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. *J Periodontal Res* 1983, 18; 339-352.
73. McKay R. Stem Cells in the central nervous system. *Science* 1997, 276: 266-271.
74. Melcher AH, Cheong T, Cox J, Nemeth E, Shiga A. Synthesis of cementum-like tissue in vitro by cells cultured from bone: a light and electron microscope study. *J Periodont Res* 1986, 21:592-612.
75. Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 1985, 67: 130-131.
76. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol* 1976, 47:256-260.
77. Minabe M. A critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. *J Periodont* 1991, 62: 171-179.
78. Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. *J Periodontol* 1979, 50: 291-300.
79. Moule Aj, Li H, Bartold PM. Donor variability in the proliferation of human dental pulp fibroblasts. *Aus Dent J* 1995, 40: 110-114.
80. Nakae H, Narayanan AS, Raines EW, Page RC. Isolation and characterization of mitogenic factors from cementum. *Biochemistry* 1991, 30: 7047-7052.
81. Nakahara T, Nakamura T, Kobayachi E, Kuremoto K, Matsuno T, Tabata Y, Eto K, Shimizu Y. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Engineering* 2004, 537-544.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

82. Narayanan AS, Bartold PM. Biochemistry of periodontal connective tissues and their regeneration: a current perspective. *Connect Tissue Eng* 1995, 33: 10-21.
83. Narem R, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological structures. *Tissue Eng* 1995, 1: 3-13.
84. Newman MG, Takey HH, Carranza FA. *Periodontia clínica*. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
85. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 1982, 9:257-265.
86. Nyman S, Gottlow J, Lindhe J, Karring T, Wennstrom L. New attachment formation by guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1987, 22:252-254.
87. Nyman S, Houston F, Sarhed G, Lindhe J, Karring T. Healing following reimplantation of teeth subjected to root planning and citric acid treatment. *J Clin Periodontol* 1985, 12: 294.
88. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantin S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol* 1980, 7: 394.
89. Olson S, Arzate H, Narayanan AS, Page RC. Cell attachment activity of cementum proteins and mechanism of endotoxin inhibition. *J Dent Res* 1991, 70: 1272-1277.
90. Omstead DR, Baird LG, Christenson L, Du Moulin G, Tubo R, Maxted DD, Davis J, Gentile FT. Voluntary guidelines for the development of tissue-engineering products. *Tissue Eng* 1998, 4: 239-266.
91. Paiva JS, Almeida RV (Organizadores). Vários autores. *Periodontia: Atualização clínica baseada em evidências científicas*. São Paulo: Artes Médicas, 2005.

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

92. Pearson BS, Klebe RJ, Boyan BD, Moskowicz D. Comments on the clinical application of fibronectin in dentistry. *J Dent Res* 1998, 67: 515-517.
93. Perez MAA, Pitaru S, Fregoso AO, Gasga JR, Arzate H. Anti-cementoblastoma-derived protein antibody partially inhibits mineralization on a cementoblastic cell line. *J Struc Biol* 2003, 143: 1-13.
94. Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healin. *J Periodontal Res* 1994, 29:81-94.
95. Pitaru S, Savion N, Hekmati H, Olson S, Narayanan AS. Molecular and cellular interactions of cementum attachment protein with periodontal cells and cementum matrix components. *J Periodontal Res* 1993, 28: 560-562.
96. Pitaru S. McCulloch CAG, Narayanan AS. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res* 1995, 30: 360-368.
97. Pomahac B, Svensjo T, Yao F, Brown H, Eriksson E. Tissue engineering of skin. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998, 9: 333-344.
98. Pontoriero R, Lindhe J. Guided tissue regeneration in the treatment of degree III furcation defects in maxillary molar. *J Clin Periodontol* 1995, 22: 810-812.
99. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnol* 1998, 16: 247-252.
100. Ripamonti U, Reddi AH. Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. *J Periodontal Res* 1994, 29: 225-235.
101. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernard A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Câncer Res* 2005, 65:3035-3039.
102. Ruoslahti E, Reed JC. Anchorage dependence, integrins and apoptosis. *Cell* 1994, 77: 477-478.
103. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charrette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

- matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodontol* 1993, 20: 537-544.
104. SALLUM et al. Atualização clínica em odontologia: regeneração óssea. Artes médicas: São Paulo, 2005.
105. Satry SK, Horwitz Af. Adhesion-growth factor interaction during differentiation: as integrated biological response. *Dev Biol* 1996, 180: 455-467.
106. Scantlebury TV. 1982-1992: a decade of thecology development for guided tissue regeneration. *J Periodontol* 1993, 64: 1129-1137.
107. Schroeder HE. Biological problems of regenerative cementogenesis: synthess and attachment of collagenows matrices on growin and established root surfaces. *Int Rev Cytol* 1992, 142: 1-58.
108. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004, 364: 149-155.
109. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 2003, 18: 696-704.
110. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SI, Jensen TG, Kassem M. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains tehe osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biothecnol* 2002, 20: 592-596.
111. Sodek J. A new approach to assessing collagen turnover by using a microassay. A highly efficient and rapid turnover of collagen in rat periodontal tissues. *Biochem J* 1976, 160: 243-246.
112. Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer Sy. Periodontal ligament cells and g<sup>†</sup>ingival fibroblasts respond differently to attachment factor in vitro. *J Periodontol* 1989, 30: 73-77.

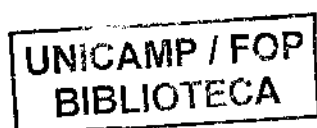
---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

\* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

113. Tatakis DN. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. *J Periodontol* 1993, 64: 416-431.
114. Tempro PJ, Nalbandian J. Colonization of retrieved polytetrafluorethylene membranes: morphological and micro-biological observations. *J Periodontol* 1993, 34: 162-168.
115. Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone* 1999, 25: 123-125.
  
116. Toriumi DM, East CA, Larrabee WF. Osteoinductive biomaterials for medical implantation. *J Long Term Effects Med Implants* 1991, 1: 53-57.
117. Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymer seeded with chondrocytes provides a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88:753-759.
118. Van Dijk LJ, Schakenraad JM, van der Voort HM, Busscher HJ. Cell seeding of periodontal ligament fibroblasts. A pilot study. *J Clin Periodontol* 1991, 18: 196-199.
119. Vanheusden AJ, Goffinet G, Zahedi S, Nusgens B, Lapeire CM, Rompen EH. In vitro stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditionin. *J Periodontol* 1999, 70: 594-603.
120. Vellanoweth RL, Suprakar PC, Roy AK. Biology of disease. Transcription factors in development, growth and aging. *Lab Invest* 1994, 70:784-799.
121. Wallace SC, Gellin RG, Miller MC, Mishkin DJ. Guided tissue regeneration with and without decalcified freeze-dried bone allografts for the regeneration of interproximal intraosseous defects. *J Periodontol* 1994, 65: 244-254.
122. Whang K, Healy KE, Elenz DR, Nam EK, Tsai DC, Thomas CH, Nuber GW, Glorieux FH, Travers R, Sprague SM. Engineering bone regeneration

- with bioresorbable scaffolds with novel microarchitecture. *Tissue Eng* 1999, 5: 35-51.
123. Wikesjo UME, Nilveus RE, Selvig KA. Significance of early wound healing events in periodontal repair: a review. *J Biol Periodontol* 1992, 63: 158-163.
124. Xiao Y, Qian H, Young WG, Bartold PM. Tissue engineering for bone regeneration using differentiated alveolar bone cells in collagen scaffolds. *Tissue Eng* 2003, 9: 1167-1177.
125. Xiao G, Wang D, Benson MD, Karsenty G, Franceschi RT. Role of the  $\alpha 2$ -integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor. *J Biol Chem* 1998, 273: 32988-32994.
126. Yamamoto T, Comon T, Takahashi S, Wakita M. Cellular cementogenesis in rat molars: the role of cementoblasts in the deposition of intrinsic matrix fibers of cementum proper. *Anat Embryol* 1996, 193: 495-500.
127. Zhao M,<sup>\*</sup> Jin Q, Berry JE, Nociti FH Jr, Giannobile WV, Sommerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissues engineering. *J Periodontol* 2004, 75: 154-161.
128. Zheng D-Q, Woodart AS, Fornaro M, Tallini G, Languino LR. Prostatic carcinoma cell migration via  $\alpha \beta$  integrin is modulated by a focal adhesion kinase pathway. *Cancer Res* 1999, 59: 1655-1664.



---

<sup>\*</sup> De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline