

MAYRA LAINO ALBIERO

O efeito do processo inflamatório nas  
propriedades das células mesenquimais  
indiferenciadas de humanos

MONOGRAFIA APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA, DA UNICAMP, COMO  
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE ESPECIALISTA EM PERIODONTIA.

PIRACICABA 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

MAYRA LAINO ALBIERO

O efeito do processo inflamatório nas  
propriedades das células mesenquimais  
indiferenciadas de humanos

Orientador (a): Profa. Dra. Karina Gonzáles Silvério Ruiz

MONOGRAFIA APRESENTADA À  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA, DA UNICAMP, COMO  
REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO  
DE ESPECIALISTA EM PERIODONTIA.

PIRACICABA 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

AL14e Albiero, Mayra Laino, 1988-  
O efeito do processo inflamatório sobre as propriedades biológicas das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos / Mayra Laino Albiero. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Karina Gonzales Silvério Ruiz.  
Trabalho de Conclusão de Curso (especialização) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Inflamação. 2. Periodontite crônica. 3. Células Mesenquimais Estromais. 4. Regeneração. 5. Lipopolissacarídeos. I. Ruiz, Karina Gonzales Silvério. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Especialmente a Deus por guiar os meus passos, me dar forças para suportar os momentos mais difíceis.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, onde pude adquirir, desde a minha graduação, todo o conhecimento que possuo.

À professora Dra. Karina Gonzáles Silvério Ruiz, exemplo de conduta profissional, que me incentivou e confiou em meu trabalho. Obrigado pelos ensinamentos científicos e clínicos que se estendem desde a iniciação científica, o mestrado e agora a especialização.

Aos professores da especialização de periodontia Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati, Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum, Dr. Edwil Cantadori Jr., Dr. Vinicius de Moraes contribuíram para meu aprendizado.

Aos amigos do Curso de Especialização Camila Guignone, Igor Andrade, Carolina Barbosa, Evelyn Sartori, Julia Gimenez, Juliana Miranda, Daniela Bordim, Mayra Mello, Tiago Taiete, Maria Alice Palma e Isabela França com os quais convivi durante esse período. Obrigada por tornarem essa caminhada prazerosa e divertida, desejo muito sucesso a todos.

À minha família e ao meu namorado que me deram todo o apoio nesta dupla jornada entre especialização e mestrado, proporcionando a realização deste curso, me incentivando e me dando forças pra seguir o meu caminho.

Aos pacientes do curso que contribuíram para o meu aprendizado durante este período. Obrigada por serem assíduos e por confiarem em minha capacidade profissional

## **SUMÁRIO**

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| <b>RESUMO</b>             | <b>6</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>           | <b>7</b>  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>      | <b>8</b>  |
| <b>2. DESENVOLVIMENTO</b> | <b>11</b> |
| <b>3. CONCLUSÃO</b>       | <b>28</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>        | <b>29</b> |

## RESUMO

A doença periodontal inflamatória caracteriza-se pela destruição dos tecidos que suportam os dentes, os quais incluem ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar. A forma de terapia mais comumente empregada no tratamento da doença periodontal é a raspagem e alisamento da superfície radicular (terapia mecânica), a qual tem como efeito clínico a diminuição da profundidade de sondagem das bolsas periodontais e a estabilização das medidas do nível clínico de inserção quando combinadas com um bom controle de biofilme. Porém, após este tratamento, ocorre o padrão de cura do tipo reparação (epitélio juncional longo) devido à alta taxa proliferativa do tecido epitelial quando comparado aos tecidos mesenquimais envolvidos (ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar), não ocorrendo a regeneração. Atualmente, sabe-se que o sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação das células indiferenciadas do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos. Sendo a periodontite uma doença inflamatória crônica, tem sido sugerido que as estruturas periodontais remanescentes, teriam a sua habilidade para promover a regeneração tecidual comprometida. A doença periodontal possui caráter multifatorial, porém, seu fator etiológico primário é o biofilme, sendo que a *Porphyromonas gingivalis* tem sido considerada um dos principais patógenos associados ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal inflamatória crônica (periodontite), e atualmente sabe-se que seu lipopolissacarídeo é reconhecido pelas células por receptores *Toll-like*, já identificados em células mesenquimais do ligamento periodontal. Assim, propõe-se que as células mesenquimais indiferenciadas sofreriam alterações em suas propriedades quando expostas a um ambiente rico em toxinas bacterianas, comprometendo a sua capacidade regenerativa.

**Palavras-chave:** células mesenquimais indiferenciadas, ligamento periodontal, regeneração periodontal, Lipopolissacarídeos (LPS), *Toll-like receptors* (TLR), *Porphyromonas gingivalis*

## ABSTRACT

Periodontal disease is characterized by inflammatory destruction of tissues which support the teeth including periodontal ligament, dental cementum and alveolar bone. The most common form of therapy used in the treatment of periodontal disease is the scaling and root planning (mechanical therapy), which decreases clinical probing depth of periodontal pockets and stabilizes the measures of clinical attachment level when combined with good biofilm control. However, after this treatment, the result is periodontal repair (long junctional epithelium) due to the high proliferative rate of epithelial tissue as compared to mesenchymal tissues involved (periodontal ligament, dental cementum and alveolar bone), not occurring regeneration. Currently, it is known that successful periodontal tissue regeneration depends on the migration and proliferation of stem cells from the remaining periodontal ligament, followed by subsequent differentiation into osteoblasts, cementoblasts and fibroblasts. Being periodontitis a chronic inflammatory disease it has been suggested that periodontal remaining structures would have compromised ability to promote tissue regeneration. Periodontal disease is a multifactorial disease, however, its primary etiological factor is biofilm, and *Porphyromonas gingivalis* has been considered one of the major pathogens associated with the development and progression of chronic inflammatory periodontal disease, and currently it is known that its lipopolysaccharides are recognized by the *Toll-like* receptors, which have been identified in mesenchymal stem cells of the periodontal ligament. Therefore, it is proposed that mesenchymal stem cells from periodontal ligament would change their properties when exposed to a rich environment of bacterial toxins, compromising its regenerative capacity.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, periodontal ligament, periodontal regeneration, Lipopolysaccharides (LPS), Toll-like receptors (TLR), *Porphyromonas gingivalis*.

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal inflamatória caracteriza-se pela destruição dos tecidos que suportam os dentes, os quais incluem ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar, e está entre as mais prevalentes doenças infecciosas, constituindo-se na principal causa da perda dental com implicações significativas na saúde pública (Desvarieux *et al.*, 2003; Elter *et al.*, 2003). A raspagem e alisamento da superfície radicular (terapia mecânica) é a forma de terapia mais comumente empregada no tratamento da doença periodontal. O objetivo da terapia mecânica é remover cálculo e depósitos bacterianos sobre a superfície radicular, assim como o cemento dental contaminado pelas bactérias e seus produtos (Aleo *et al.*, 1975; Nishimine & O'Leary, 1979; Bartold *et al.*, 2000). Os efeitos clínicos da terapia mecânica estão, de forma geral, bem documentados e, em combinação com uma boa higiene oral, resultam na diminuição da profundidade de sondagem das bolsas periodontais e na estabilização das medidas do nível clínico de inserção, particularmente em bolsas periodontais profundas (Kaldahl *et al.*, 1993).

Histologicamente, independente do tipo de abordagem utilizada para a descontaminação mecânica da superfície radicular, o tecido epitelial prolifera de forma mais rápida do que os tecidos mesenquimais envolvidos (ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar) o que resulta em um padrão de cura do tipo reparação (epitélio juncional longo), não ocorrendo a regeneração dos tecidos periodontais perdidos em função da doença (Polimeni *et al.*, 2006). Desta forma, o maior desafio da terapia periodontal contemporânea tem sido o restabelecimento do ligamento periodontal, cemento dental e osso alveolar perdidos durante o processo da doença periodontal inflamatória.

Clinicamente, diferentes modalidades terapêuticas têm sido utilizadas visando a regeneração dos tecidos periodontais de suporte perdidos. Entre estas se destacam técnicas de enxertos ósseos de diferentes origens, moléculas bioativas (como fatores de crescimento e proteínas derivadas da matriz do esmalte) e a regeneração tecidual guiada (GTR). Entretanto, os resultados clínicos obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo (formação de ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular) destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987; Jepsen *et al.*, 2002; Trombelli *et al.*, 2002; Villar & Cochran, 2010). Alguns fatores tais como, o padrão de higiene oral, as



características morfológicas dos defeitos periodontais, condições sistêmicas e comportamentais (diabetes e tabagismo) relacionados ao paciente têm sido considerados como fatores que influenciam na cicatrização dos tecidos periodontais (Polimeni *et al.*, 2006).

Atualmente, sabe-se que o sucesso da regeneração dos tecidos periodontais depende da migração e proliferação das células do ligamento periodontal remanescente, acompanhada pela subsequente diferenciação em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, e síntese de componentes das matrizes teciduais. Recentemente, estudos mostraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010) e de decíduos (Silvério *et al.*, 2010) abrigam populações celulares com características de células mesenquimais indiferenciadas (células tronco adultas). Essas células tem sido caracterizadas por meio da expressão de marcadores de superfície específicos para células de origem mesenquimal indiferenciada (CD105, CD166, CD73 e STRO1) (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de expressarem o gene para o Oct-4 (Oct-3, *POU5f1*), um fator de transcrição importante para a manutenção da pluripotencialidade e do estado celular indiferenciado (Kawanabe *et al.*, 2006; Silvério *et al.*, 2010; Kliner & Kikyo, 2010). Em condições apropriadas de cultura, essas células mesenquimais indiferenciadas provenientes do ligamento periodontal têm se mostrado capazes de diferenciarem em um fenótipo osteoblástico/cementoblástico, adipogênico e condrogênico (Seo *et al.*, 2004; Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Silvério *et al.*, 2010), além de apresentarem *in vivo* formação ectópica de uma estrutura tecidual semelhante ao cimento dental e ligamento periodontal (Seo *et al.*, 2004).

Do ponto de vista dos tecidos periodontais remanescentes, tem sido sugerido que as estruturas periodontais remanescentes, expostas ao processo inflamatório crônico, teriam a sua habilidade para promover a regeneração tecidual comprometida (Polimeni *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010). Uma das hipóteses baseia-se no fato das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal sofrerem alterações fenotípicas quando expostas ao ambiente da doença periodontal, principalmente, devido à ação das toxinas bacterianas e das citocinas inflamatórias, comprometendo assim, as suas propriedades biológicas. Embora não existam evidências científicas que sustentem esta hipótese, estudos na área médica mostraram que em modelo animal, na presença de um processo inflamatório crônico

cerebral induzido pela injeção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interferon- $\gamma$ ), as propriedades proliferativa, migratória e a plasticidade das células-tronco da zona subventricular são significativamente comprometidas (Pluchino *et al.*, 2008).

Em relação à doença periodontal, a *Porphyromonas gingivalis* tem sido considerada um dos principais patógenos associados ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal inflamatória crônica (periodontite) (Socransky & Haffajee, 1992). A *Porphyromonas gingivalis* e outras bactérias gram-negativas tal como, a *Escherichia coli* (considerada como não-periodontopatógeno), apresentam em suas paredes celulares um fator de virulência denominado lipopolissacarídeo (LPS) (Holt *et al.*, 1999). Esse LPS quando em contato com células do sistema imunológico do hospedeiro, bem como com fibroblastos gengivais, induzem uma resposta imune-inflamatória, caracterizada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, as quais são mediadas pelos receptores do tipo *Toll-like* (TRL2 e TRL4) (Jones *et al.*, 2010). Até o momento, pouca informação encontra-se disponível sobre o efeito dos LPS bacterianos sobre as células mesenquimais indiferenciadas. Recentemente, Mo e cols. (2008), observaram *in vitro* uma alteração no padrão de diferenciação osteogênica, quando células mesenquimais indiferenciadas isoladas da medula óssea de indivíduos saudáveis foram expostas ao LPS da *Escherichia coli*.

Desta maneira, o maior conhecimento do comportamento dessas células e se estas sofrem alterações em suas propriedades indiferenciadas na presença de toxinas inflamatórias se torna fundamental para uma maior previsibilidade nos procedimentos regenerativos.

## 2. DESENVOLVIMENTO

## 2.1 Células mesenquimais indiferenciadas e seu papel na regeneração periodontal

A regeneração periodontal completa é um processo extremamente complexo, pois necessita de neoformação óssea, do ligamento periodontal e do cemento radicular. Para que esta regeneração seja bem sucedida, é necessária a formação de um selamento epitelial funcional, novas fibras de tecido conjuntivo inseridos na raiz, novo cemento acelular na superfície da raiz, além do restabelecimento da altura do osso alveolar, tornando a regeneração do periodonto uma das situações mais complexas e únicas do corpo humano (Bartold *et al.*, 2000; Polimeni *et al.*, 2006).

De acordo com o estudo de Melcher (1976), o tipo celular que povoa a ferida cirúrgica periodontal durante os estágios iniciais de cicatrização é crítico para determinar se esta cicatrização ocorrerá por reparo ou regeneração. Estudos realizados na década de 80 mostraram que dos quatro tipos teciduais (osso alveolar, tecido conjuntivo gengival, epitélio e ligamento periodontal) que circundam o defeito periodontal, somente as células provenientes do ligamento periodontal remanescente são capazes de promover a formação de uma nova inserção conjuntiva sobre uma superfície radicular desprovida de ligamento periodontal (Karring *et al.* 1980; Nyman *et al.*, 1980; Karring *et al.*, 1985; Buser *et al.*, 1990). Ao mesmo tempo, esses estudos mostraram que histologicamente, o tecido epitelial prolifera a uma taxa mais rápida do que os tecidos mesenquimais subjacentes (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular), promovendo uma cicatrização da ferida periodontal por reparo e não regeneração verdadeira dos tecidos, já que há formação de epitélio juncional longo (Karring *et al.* 1980; Nyman *et al.*, 1980; Bowers *et al.*, 1982; Karring *et al.*, 1985 Egelberg, 1987).

Atualmente, uma ampla variedade de terapias regenerativas têm sido propostas, visando promover a regeneração dos tecidos periodontais de suporte. Entre estas se destacam técnicas de enxertos ou substitutos ósseos, moléculas bioativas (como fatores de crescimento e proteínas derivadas da matriz do esmalte), a regeneração tecidual guiada (GTR) e a associação destas terapias. Entretanto, os resultados clínicos obtidos são pouco previsíveis, e histologicamente, o potencial regenerativo (formação de ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular)

destas técnicas tem se revelado limitado (Egelberg, 1987; Jepsen *et al.*, 2002; Trombelli *et al.*, 2002; Villar & Cochran, 2010).

Essa limitação das técnicas regenerativas em promover a regeneração dos tecidos periodontais em toda a extensão do defeito pode ser uma consequência da pobre capacidade inata dos tecidos periodontais danificados em se regenerar (Trombelli, 2005; Polimeni *et al.*, 2006; Villar & Cochran, 2010; Reynolds *et al.*, 2010). Dentro desse contexto, os estudos atuais vêm sendo direcionados no sentido de tentar compreender os eventos celulares e moleculares envolvidos na formação e regeneração dos tecidos periodontais, e abordagens baseadas na engenharia de tecidos tem surgido como potenciais alternativas aos tratamentos convencionais.

Nesse sentido, vários estudos têm sido conduzidos para melhor compreensão das propriedades do ligamento periodontal. Baseado em suas características, o ligamento periodontal é um tecido conjuntivo que circunda a raiz dental e seu papel primário é a manutenção do dente no alvéolo, proporcionando ancoragem e suporte ao dente em função, dispersando as forças associadas à mastigação, além de reconstruir a estrutura periodontal em resposta à injúria, à periodontite e a movimentos decorrentes do tratamento ortodôntico. A população celular do PDL é heterogênea, consistindo em duas grandes linhagens mesenquimais: a fibroblástica e a de tecidos mineralizantes, divididos nos subgrupos osteoblásticos e cementoblásticos (Gottlow *et al.*, 1984; McCulloch & Bordin, 1991; Pitaru *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997).

Devido à sua taxa metabólica e de *turnover* ser uma das mais altas do organismo, pesquisadores hipotetizaram que uma população celular altamente regenerativa estaria presente no PDL (McCulloch & Bordin 1991, Ramakrishnan *et al.* 1995, Coura *et al.* 2008). Este conceito de que células-tronco poderiam residir nos tecidos periodontais foi primeiramente proposto há mais de vinte anos por Melcher (1985).

Por suas funções, é necessário que o PDL contenha células-tronco pluripotentes como fonte de reconstrução do tecido periodontal. Acredita-se que a regeneração possa ser obtida com sucesso se houver a migração das células-tronco do ligamento periodontal, e que estas células possam se diferenciar em osteoblastos, cementoblastos e fibroblastos, sintetizando matriz extracelular consistente com os tecidos periodontais (Karring *et al.*, 1993; Becker & Becker, 1999; Bartold *et al.*, 2000; Isaka *et al.*, 2001; Bartold & Narayanan, 2006).

A presença de células-tronco nos tecidos periodontais tem sido desde então, repetidamente mencionada na literatura. A evidência mais incontestável de que estas células estão presentes em meio ao tecido periodontal foi apresentada por McCulloch e colaboradores (1987), que identificaram uma pequena população de células progenitoras adjacente aos vasos sanguíneos no interior do ligamento periodontal.

De forma geral, as células-tronco são caracterizadas pela sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicarem-se, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e, mais interessante ainda, sua capacidade de diferenciarem-se em diversos tipos celulares (Lemischka, 2005). Desta forma, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (Blau *et al.*, 2001; Fodor, 2003).

Baseados na sua origem existem dois tipos principais de células-tronco: células-tronco embrionárias (ES) e células-tronco adultas (AS). Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco na vida pós-natal, a medula óssea foi a mais estudada, por muitos anos, como fonte tanto de células-tronco hematopoiéticas (*hematopoietic stem cells – HSC*), quanto de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells – MSC*).

Friedesntein *et al.* (1968, 1987) foram o primeiro grupo a identificar uma população celular semelhante a fibroblastos, que era aderente, clonogênica e com capacidade de auto-renovação na medula óssea, denominadas células-tronco estromais da medula óssea (*bone marrow stromal stem cells – BMSCs*).

Devido a algumas limitações na obtenção das BMMSCs, incluindo a dor, morbidade e baixo número de células após a coleta, fontes alternativas de MSCs têm sido procuradas. MSCs derivadas de tecido adiposo obtidas por lipoaspiração (Zuk *et al.*, 2001, Mizuno *et al.*, 2002) e populações de MSC provenientes de sangue de cordão umbilical (UCB), já foram isoladas e caracterizadas (Mareschi *et al.*, 2001). Sendo assim, as MSCs podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo e fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos.

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, são três os requisitos mínimos para que uma população de células possa ser classificada como MSC. A primeira é que MSCs da medula óssea são isoladas de uma população de células mononucleares que possuem a capacidade de aderência seletiva à superfície do plástico, quando cultivada *ex vivo*. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR (marcadores de células hematopoiéticas) não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em tecidos ósseo, adiposo e cartilagenoso (Horwitz *et al.*, 2005).

Portanto, as MSCs devem ser capazes de formar osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* e *in vivo*. Em adição à identificação das MSCs baseadas em suas características morfológicas ou fenotípicas, a habilidade de células clonais expandidas em formar estes três tipos celulares distintos é o único critério funcional disponível para identificar MSCs genuínas e distingui-las de pré-osteoblastos, pré-adipócitos ou pré-condrócitos, que dão origem a somente um tipo celular (Bydlowski *et al.*, 2009).

Células-tronco mesenquimais, embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de proliferação em cultura, além de não serem imunogênicas, podendo ser, teoricamente, empregadas em transplantes alogênicos (Bobis *et al.*, 2006). Além disso, estudos tem mostrado que as células mesenquimais adultas são capazes de expressar fatores de transcrição tais como, Oct-4, NANOG e SSAE 3/4, que conferem a estas o seu estado de indiferenciação e pluripotencialidade (Schöler *et al.*, 1991; Baksh *et al.*, 2004; Kolf *et al.*, 2007).

A procura por células semelhantes a células mesenquimais indiferenciadas em tecidos específicos levou à descoberta de uma variedade de células-tronco em quase todos os órgãos e tecidos do corpo nas últimas décadas (revisado por Baksh *et al.*, 2004; Porada *et al.*, 2006; Kolf *et al.*, 2007).

Dentre estes, o tecido dental proporcionou uma grande variedade de células mesenquimais indiferenciadas, incluindo células-tronco da polpa dental (DPSCs) (Gronthos *et al.*, 2000), células-tronco de dentes decíduos exfoliados (SHEDs) (Miura *et al.*, 2003), células do ligamento periodontal de dentes permanentes (PDLSCs) (Seo *et al.*, 2004) e decíduos (Silvério *et al.*, 2010), células-

tronco progenitoras do folículo dental (DFPCs) (Morsczeck *et al.*, 2005), e células-tronco da papila apical (SCAPs) (Sonoyama *et al.*, 2006,2008).

Durante a caracterização destas novas populações de células indiferenciadas provenientes de tecidos dentais, alguns aspectos de suas propriedades foram comparados às BMMSCs. Uma dessas propriedades caracteriza-se na capacidade das células provenientes dos tecidos dentais expressarem marcadores de superfície específicos para células indiferenciadas de origem mesenquimal tais como, Stro-1, CD73, CD90, CD105, CD146, além de se apresentarem negativas para CD14 (monócito/macrófago), CD34 (células progenitoras hematopoiéticas/endotélio), CD45 (antígeno leucocitário comum) e HLA-DR (Gronthos *et al.*, 2003; Shi & Gronthos, 2003; Shi *et al.*, 2005; Miura *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Battula *et al.*, 2007; Greco *et al.*, 2007).

Estas populações (DPSC, PDLSC, SHEDs e BMSSSC) quando comparadas após expansão *ex vivo*, demonstraram um padrão de expressão semelhante para uma variedade de antígenos associados ao osso, dentina e cemento (BMPs, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, sialoproteína óssea) e fibroblastos (colágeno tipo III) (Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Gronthos *et al.*, 2002; Batouli *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003; Gronthos *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2003, Seo *et al.*, 2004), mostrando que as células-tronco dentais apresentam potencial de diferenciação múltipla, com capacidade de originar ao menos três linhagens: osteo/odontogênica, adipogênica, e neurogênica.

Ainda comparando as células mesenquimais dentais e as de medula óssea, estudos mostraram que algumas proteínas em comum são expressas, o que pode implicar na existência de vias de sinalização molecular semelhantes, regulando a formação da dentina, do cemento e do osso, por meio da atividade de importantes fatores de transcrição (Runx2, Msx1/2, Dlx1/2, e Pax6/9) e fatores de crescimento (BMP, FGF, TGF, e WNT) (Salazar-Ciudad & Jernval, 2002; Peters & Balling, 1999; Thesleff & Aberg, 1999). Entretanto, algumas diferenças foram notadas entre estas populações de células-tronco. Elas diferem significativamente na sua capacidade proliferativa e no potencial de desenvolvimento *in vitro* e, mais ainda, na sua capacidade de se desenvolver em tecidos distintos representante dos microambientes dos quais foram derivados *in vivo*.

Adicionalmente, o mesênquima dental é chamado ectomesênquima devido à sua precoce interação com a crista neural. Por esta perspectiva, células-

tronco dentais ectomesenquimais podem possuir características diferenciadas, semelhantes às das células da crista neural (revisado por Huang *et al.*, 2009).

Semelhante às outras células tronco dentárias descritas acima, PDLSCs apresentam características osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas sob condições de cultura definidas (Gay *et al.*, 2007; Lindroos *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009). A comprovação de que o ligamento periodontal possuía células progenitoras foi confirmada Seo *et al.* (2004). Neste estudo, os autores demonstraram que o ligamento periodontal de dentes permanentes contém uma peculiar população de células indiferenciadas (PDLSCs) (células-tronco), as quais apresentaram marcação positiva para Stro-1 e CD146, marcadores relacionados à células indiferenciadas, além de apresentarem capacidade de se diferenciar em células com fenótipo de cementoblastos e adipócitos *in vitro*. E que *in vivo* estas células foram capazes de se diferenciar em cementoblastos funcionais e de sintetizar fibras colágenas incorporadas em um tecido ectópico semelhante ao cimento, sugerindo o seu potencial em regenerar cimento e ligamento periodontal.

Mais recentemente, células indiferenciadas também foram isoladas do ligamento periodontal de dentes decíduos e estas demonstraram uma maior taxa proliferativa e maior expressão de genes adipogênicos que as células indiferenciadas do ligamento periodontal de dentes permanentes, sendo que ambas as populações demonstraram capacidade de se diferenciar em linhagens adipogênicas e osteogênicas/cementogênicas. Deste modo, foi mostrado que PDL de dente decíduo possui uma população de células progenitoras multipotentes, que pode ser isolada e expandida *in vitro* (Silvério *et al.*, 2010).

Um grande desafio para a caracterização das PDLSC é a falta de marcadores específicos associados tanto ao ligamento periodontal quanto ao cimento. Devido à ausência de marcadores conhecidos, e como o ligamento periodontal compartilha algumas características morfológicas e funcionais com o tendão, como feixes de colágeno densos e habilidade de absorver forças mecânicas, Seo e colaboradores (2004) examinaram nas PDLSC a expressão de níveis de *SCLERAXIS*, um fator de transcrição específico para tendão. Eles observaram que PDLSCs expressaram níveis mais altos de *SCLERAXIS* quando comparados às BMMSCs.

Todas estas características vêm sendo confirmadas por outros estudos, que comprovaram a presença de células mesenquimais indiferenciadas



heterogêneas no ligamento periodontal isoladas de dentes extraídos e sua expressão de marcadores mesenquimais de superfície, como Stro-1, CD105, CD146, e CD166, além de sua pluripotencialidade (se diferenciar em adipócitos, células semelhantes a osteoblastos e cementoblastos *in vitro*) (Nagamoto *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007).

Pouco se sabe sobre o nicho das BMMSCs. Descobertas de estudos anteriores sugeriram que BMMSCs e MSC derivadas de tecido adiposo residem nas áreas perivasculares (Shi & Gronthos, 2003; Zannettino *et al.*, 2008). Imunohistoquímica para Stro-1/CD146/CD44 do ligamento periodontal de dentes sadios ou com doença periodontal mostrou que as MSC estão localizadas principalmente na região perivascular, com pequenos grupos de células na região extravascular (Chen *et al.*, 2006b), sugerindo que este possa ser o nicho destas células no ligamento periodontal.

Todos estes dados mostram que PDLSC representam uma população de células-tronco adultas única, que diferem das células mesenquimais derivadas da polpa e da medula óssea. Quando os tecidos periodontais são danificados como resultado do processo inflamatório, as células do ligamento periodontal são ativadas por mediadores solúveis (fatores de crescimento, moléculas de adesão e proteínas estruturais) para promover reparo ou regeneração do tecido (Bartold *et al.*, 2000). Enquanto pouca regeneração do periodonto pode ser vista nas fases iniciais da doença periodontal, uma vez que a doença se estabelece a regeneração espontânea não mais ocorre sem alguma forma de intervenção terapêutica (Bartold *et al.*, 2000). O processo da regeneração periodontal envolve o recrutamento de população celulares indiferenciadas locais com a capacidade de se desenvolver tanto em células do ligamento periodontal quanto em cementoblastos, que se combinam para assegurar a ligação entre o cimento e o osso alveolar adjacente (Bartold & Narayanan, 1998).

A grande capacidade de potencial de diferenciação das MSCs, a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células, através de administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas.

Alguns estudos desenvolveram transplante de células do PDL em combinação com carreadores e relataram sucesso na regeneração periodontal em

modelos animais (Nakahara *et al.* 2004, Seo *et al.* 2004, Sonoyama *et al.* 2006, Liu *et al.* 2008, Iwata *et al.* 2009). Dentro desta linha, um estudo avaliou o uso do transplante autógeno de células do ligamento periodontal (PDLs), associado à regeneração tecidual guiada, verificando que a terapia celular favoreceu a regeneração periodontal (formação de novo osso e novo cemento com fibras inseridas) em defeitos de furca grau III em cães (Suaid *et al.*, 2012).

Baseado nos achados obtidos no campo da medicina, vários estudos na odontologia estão sendo delineados para identificar e caracterizar as populações de células-tronco derivadas de tecidos dentais, com o objetivo de promover abordagens regenerativas mais previsíveis para os tecidos perdidos por consequência de doença e/ou trauma (Seo *et al.*, 2004; Bartold *et al.*, 2006; Gronthos *et al.*, 2000; Gronthos *et al.*, 2002; Batouli *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2003; Shi *et al.*, 2005; Shi & Gronthos, 2001).

A terapia regenerativa baseada em células-tronco ganhou atenção desde o isolamento de células mesenquimais indiferenciadas de vários tecidos. Tentativas de regenerar os tecidos periodontais tinham o enfoque quase que exclusivamente na regeneração do osso alveolar perdido, utilizando enxertos autógenos, alógenos e aloplásticos. No entanto, a maioria destes procedimentos tem demonstrado uma grande variabilidade em sua segurança, efetividade e estabilidade ao longo do tempo, e desse modo, sua efetividade na regeneração periodontal questionada (Bartold *et al.*, 2000).

Na tentativa de se obter um procedimento regenerativo efetivo, um relato de caso clínico demonstrou que a combinação de plasma rico em plaquetas (PRP) com BMMSCs autólogas expandidas em cultura propiciou uma melhor cicatrização de defeitos periodontais angulares (Yamada *et al.*, 2006b). No único estudo clínico humano relatado até o momento utilizando células progenitoras do ligamento periodontal, defeitos periodontais infraósseos de três pacientes foram tratados com células progenitoras autólogas associadas ao material de enxerto ósseo, e foram monitorados dos 3 aos 72 meses. Os resultados deste estudo demonstraram que, dois dos três pacientes que se submeteram a avaliação cirúrgica da regeneração dos tecidos exibiram um ganho razoável de tecido saudável. O terceiro paciente avaliado apresentou redução na mobilidade dental, redução na profundidade de sondagem, um aumento na recessão gengival e uma melhora estável no nível clínico de inserção. O estudo concluiu que o uso de células progenitoras autólogas do

ligamento periodontal pode ser eficaz e seguro no tratamento dos defeitos periodontais (Feng *et al.*, 2010).

Devido à heterogeneidade das PDLSCs em sua capacidade de proliferar e diferenciar-se em células que formam o tecido periodontal, são necessários mais estudos para investigar a forma como as células-tronco atuam no processo de regeneração (Silvério *et al.*, 2010).

A promessa da medicina regenerativa e curativa baseada em células-tronco e, particularmente, nas MSCs, depende criticamente da identificação de mecanismos e de moléculas que controlam a diferenciação de uma determinada linhagem celular, e a deposição de componentes da matriz extracelular a fim de se direcionar a formação de tecidos específicos. Adicionalmente, há a necessidade de se compreender as cascatas de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação deste tipo celular (MSCs).

Devido à complexidade de tecidos presentes no periodonto, a utilização de células mesenquimais indiferenciadas para a terapia celular, ou seja, inoculação de células na área a ser regenerada, parece ser uma alternativa muito interessante, uma vez que as mesmas são autorrenováveis, apresentam alta proliferação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Elangovan *et al.*, 2009; Silvério *et al.*, 2010). No entanto, considerando o alto nível de organização do aparato de inserção do ligamento periodontal e a heterogeneidade de suas células, a identificação dos tipos celulares apropriados para a completa regeneração, permanece um dos fatores chave na implementação de abordagens ideais para a regeneração periodontal.

Apesar do enorme número de dados em nível molecular e celular disponíveis, é evidente que questões fundamentais ainda precisam ser mais bem elucidadas antes que células progenitoras mesenquimais possam ser utilizadas para aplicações clínicas seguras e eficazes, tanto no âmbito das terapias celular quanto na genética.

## 2.2 Os componentes do processo inflamatório e seu efeito sobre as células mesenquimais indiferenciadas

### *2.2.1 A doença periodontal e a Porphyromonas gingivalis*

A doença periodontal é uma doença inflamatória, que se caracteriza pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes, incluindo o ligamento, cemento, osso alveolar e gengiva, sendo caracterizada por perda de inserção periodontal. O biofilme dental é um acúmulo de bactérias, nutrientes, células do hospedeiro e produtos metabólicos em um ambiente especializado (Costerton *et al.*, 1994). Este biofilme está envolto por uma matriz extracelular que fornece vantagens seletivas aos microrganismos que incluem uma grande barreira protetora contra antimicrobianos e agentes fagocíticos da resposta imune do hospedeiro, além de favorecer trocas genéticas (Gilbert *et al.*, 1993).

A doença periodontal se desenvolve como um resultado da contínua interação entre as células do hospedeiro e bactérias patogênicas subgengivais, como as gram-negativas anaeróbias (Darveau, 2009). Podemos considerar a etiologia da doença multifatorial, porém, o biofilme microbiano desempenha uma função essencial na etiopatogênese das infecções periodontais, sendo o fator etiológico primário de qualquer tipo de doença periodontal (Lamont & Jenkinson, 1998).

A cavidade oral humana hospeda grande quantidade e variedade de microrganismos, mais de 500 espécies de diferentes microrganismos já foram isoladas e identificadas. Apesar deste grande número de espécies bacterianas identificadas no ambiente do sulco gengival e/ou bolsa periodontal, evidências revelam que o processo de destruição do periodonto envolve o estabelecimento e crescimento de algumas espécies bacterianas específicas. Nesse quadro, aparentemente alguns anaeróbios gram-negativos produtores de pigmento negro possuem um papel importante na etiopatogenia da doença periodontal (Socransky & Haffajee, 1992).

Dentre estas espécies, a bactéria anaeróbica *Porphyromonas gingivalis*, é reconhecidamente um dos patógenos de maior importância no desenvolvimento da doença periodontal (Holt *et al.*, 1999) e tem sido extensivamente estudada nos últimos anos, sendo uma bactéria oral gram-negativa, produtora de pigmentos negros, e comumente encontrada em bolsas periodontais profundas, especialmente em sítios com a doença ativa (van Winkelhoff *et al.*, 1988).

*P. gingivalis* apresenta componentes bioativos, tais como membrana citoplasmática, peptídeoglicanos, as proteínas da membrana externa, o LPS, cápsulas, e fímbrias em sua superfície celular (Offenbacher, 1996). Esta espécie

está altamente associada com a forma crônica da doença periodontal, e pode ser detectada em até 85% dos sítios acometidos pela doença (Yang *et al.*, 2004). É frequentemente encontrada no sulco gengival de pacientes que apresentam condições clínicas saudáveis, porém os níveis de contaminação são bem maiores em sítios com doença periodontal crônica (Socransky & Haffajee, 2005). Van Winkelhoff *et al.* (2002) relataram que *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram significativamente mais prevalentes em pacientes com destruição periodontal, e que a presença *P. gingivalis* é a indicação mais forte para destruição periodontal, pois sua presença em uma bolsa periodontal pode prever progressão da doença (van Winkelhoff *et al.*, 2002), além disso, uma correlação positiva e significativa é encontrada entre os números de *P. gingivalis* e a profundidade da bolsa (Kawada *et al.*, 2004). Após o tratamento periodontal, uma redução do número de *P. gingivalis* está associada com a resolução da doença no local afetado (Haffajee *et al.*, 1997; Fujise *et al.*, 2002). Além disso, a inoculação experimental de *P. gingivalis* em modelos animais induz uma resposta inflamatória e a perda óssea (Evans *et al.*, 1992, Hajishengallis *et al.*, 2011).

O LPS da *P. gingivalis*, um dos componentes de maior virulência da membrana externa destas bactérias gram-negativas, possuem múltiplas ações inflamatórias, determinando efeitos biológicos que resultam na amplificação das reações inflamatórias, e estão envolvidos na destruição dos tecidos periodontais, incluindo osso alveolar, gengiva e ligamento periodontal (Hausmann *et al.*, 1972; Iino & Hopps, 1984; Slots & Genco, 1984; Millar *et al.*, 1986; Mayrand & Holt, 1988; Moore *et al.*, 1991; Socransky & Haffajee, 1992).

O LPS é uma combinação de lipídeo (lipídeo A) e polissacarídeo, sendo um componente exclusivo da membrana externa de bactérias gram-negativas (Morrison & Ryan, 1987; Rietschel *et al.*, 1994). A porção mais conservada da estrutura proteica é o lipídeo A. Esta endotoxina é um antígeno não específico que é pobremente neutralizado por anticorpos, sendo capaz de ativar a cascata do complemento (Schifferle *et al.*, 1993).

As células derivadas do ligamento periodontal não somente funcionam como células suporte dos tecidos periodontais como também produzem vários mediadores inflamatórios que reconhecem os componentes bacterianos como o LPS (Tamura *et al.*, 1992; Yamaji *et al.*, 1995). Sabe-se que estas citocinas desempenham um papel importante na patogênese da periodontite porque causam

inflamação e destruição do tecido periodontal e reabsorção do osso alveolar por variados mecanismos biológicos. No entanto, o mecanismo exato da periodontite ainda permanece obscuro, e pouco se sabe sobre a cascata de sinalização da resposta do hospedeiro. Assim, o LPS da *P. gingivalis*, que é único devido às suas atividades endotóxicas, é um fator-chave no desenvolvimento da periodontite.

### 2.2.2 Os receptores Toll-like (TLRs)

LPS são importantes fatores de virulência dos periodontopatógenos. Sabe-se que eles interagem com os receptores do tipo *Toll-Like* e que estes são expressos por inúmeros tipos celulares, inclusive células do ligamento periodontal (Mahanonda & Pichyangkul, 2007).

Receptores *Toll-like* em mamíferos foram identificados como uma família homóloga dos receptores da espécie *Drosophila* (Kopp & Medzhitov, 1999), e a família dos *Toll-like* está envolvida no reconhecimento dos componentes da parede celular bacteriana (Medzhitov *et al.*, 1997). Mais de dez membros da família TLR já foram identificados em humanos e camundongos. O interesse nestes receptores se intensificou desde a descoberta que estes receptores participam da sinalização intracelular iniciada por bactérias gram-negativas.

TLRs são proteínas transmembrana do tipo I e são compostos por repetições extracelulares ricas em leucinas (LRRs), domínios estes que são responsáveis pelo reconhecimento dos PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), moléculas existentes em bactérias e vírus que estimulam a resposta inflamatória – LPS nas bactérias gram-negativas e flagelina e ácido lipoteicóico nas bactérias gram-positivas – além do domínio intracelular TIR (Toll/IL-1R), que é essencial para a sinalização *downstream*, ativando NF- $\kappa$ B e MAPK, que desencadeiam o processo inflamatório (Akira *et al.*, 2006).

Entre esses receptores, TLR2 e TLR4 funcionam como principais sensores inatos para os componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, e podem ser muito importantes no progresso da periodontite (Mahanonda *et al.*, 2007; Gaddis *et al.*, 2009; Matera *et al.* 2009). Porém, já foi descrito que o reconhecimento da *P. gingivalis* ou seus componentes por células do hospedeiro pode ocorrer via TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, TLR7, TLR9 e CD14 (Hajishengallis *et al.*, 2002a, b, 2006, 2008; Wang & Ohura, 2002; Nonnenmacher *et al.*, 2003;

Darveau *et al.*, 2004; Nociti *et al.*, 2004; Kikkert *et al.*, 2007; Zhou & Amar, 2007; Gaddis *et al.*, 2009; Sahingur *et al.*, 2010).

A expressão de TLR2 e TLR4 foi confirmada em células humanas de PDL (Hatakeyama *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008, 2010), mas não se sabe exatamente como e se a ativação de TLR2 e/ou TLR4 está envolvido na sinalização desencadeada por bactérias periodontais gram-negativas, como *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Tem sido relatado também que o TLR4 é essencial para a resposta ao LPS (Takeuchi *et al.*, 1999). Hatakeyama *et al.* (2003) demonstraram que os fibroblastos humanos gengivais e do ligamento periodontal expressam TLR4, e que quando este receptor foi bloqueado, houve uma significativa redução à resposta de ambas as células ao LPS bacteriano, sugerindo que LPS atua diretamente sobre estas células.

Outros achados sugerem que TLR4 é o receptor dominante para pelo menos alguns tipos de LPS, enquanto que TLR2 não é necessário para o reconhecimento de LPS. Tem-se sugerido que TLR2 medeia os sinais provenientes de outros componentes bacterianos, incluindo o ácido lipoteicóico, peptídeoglicano, e lipoproteínas/lipopeptídeos (Brightbill *et al.*, 1999; Hirschfeld *et al.*, 1999, 2001; Schwandner *et al.*, 1999; Yoshimura *et al.*, 1999). A partir destes resultados, pode-se sugerir que o TLR2 e TLR4 em fibroblastos gengivais reconhecem diferentes componentes da parede celular bacteriana: TLR2 medeia a resposta ao peptídeoglicano e lipoproteínas, enquanto TLR4 medeia a resposta a o LPS e ácido lipoteicóico. Porém, Hirschfeld *et al.* (2001) mostraram que o LPS da *P. gingivalis* não sinaliza por meio do TLR4, e que a sinalização via TLR2 e TLR4 diferiram quantitativamente e qualitativamente em macrófagos de ratos.

Portanto, torna-se importante o entendimento da relação TLR2 e TLR4 nas células periodontais. Mais estudos são necessários para elucidar as diferenças dentre estes receptores.

### 2.2.3 O efeito do LPS sobre diferentes tipos celulares

O LPS de bactérias gram-negativas é indicado como sendo um dos responsáveis pela indução da reabsorção óssea. O LPS induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (*IL-1 $\beta$* , *IL-6* e *IL-8*), o fator de

necrose tumoral ( $TNF-\alpha$ ), fatores ativadores de plaquetas e prostaglandinas por macrófagos e neutrófilos presentes em áreas infectadas por bactérias (Wilson *et al.*, 1996; Lindemann *et al.*, 1988), e em fibroblastos do ligamento periodontal de ratos (Miyachi *et al.*, 2001), além de ativar plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. Estas citocinas são conhecidas como tendo um papel importante na patogênese da doença periodontal, porque causam inflamação e consequente destruição do tecido periodontal e reabsorção óssea, agindo de forma direta e indireta sobre os osteoclastos (Kobayashi *et al.*, 2000). Tem sido relatado que o LPS promove a indução de osteoclastos indiretamente através da ativação de receptores do tipo *Toll-like* 4 (Hou *et al.*, 2000).

Estudo realizado por Wada *et al.* (2004), demonstrou que em fibroblastos de ligamento periodontal, o LPS é capaz de induzir o aumento de RNAm de osteoprotegerina (OPG) e receptor ativador do ligante kappaB fator nuclear (RANKL) devido aos estímulos de  $IL-1\beta$  ou  $TNF-\alpha$ , porém, estas células não são capazes de induzir osteoclastogênese. Resultados similares de aumento de RNAm de OPG e decréscimo de RNAm de RANKL foram observado em células de cementoblastos estimuladas com LPS de *P. gingivalis* (Nociti *et al.*, 2004).

O conceito de que a infecção com bactérias específicas é necessária para iniciar ou agravar a perda óssea associada à doença periodontal foi testada por Loomer e cols (1995) que avaliaram a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos tratando-as com extratos bacterianos de periodontopatógenos ou não, e observou que há uma redução na osteogênese somente das células tratados com periodontopatógenos, e que o LPS nas concentrações de 1ug/ml e 10ug/ml induziu o mesmo efeito que o extrato bacteriano, sendo que não houve efeito detectável na concentração de 0.1mg/ml.

A bactéria viável pode interagir de maneira diferente com as células do ligamento periodontal ou com os fibroblastos gengivais se comparadas ao LPS somente, por isso um estudo de Scheres *et al.* (2011) avaliou a indução de citocinas nestas células na presença da *P. gingivalis* viável de pacientes com e sem doença periodontal. Os resultados mostraram um aumento na expressão de  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $IL-8$  em ambos os grupos na presença de *P. gingivalis*, além de uma maior expressão de *TLR1*, *TLR4*, *TLR7* e *CD14* nas células de pacientes com periodontite, com ou sem desafio microbiano. Outro grupo relatou que fibroblastos gengivais expressam



TLR2 e 4, e que o estímulo com LPS da *P. gingivalis* elevou seus níveis de expressão (Tabeta *et al.*, 2000).

Do mesmo modo, outros estudos mostraram que LPS induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células dos tecidos orais e, além disso, que este LPS também inibe a diferenciação de células-tronco da polpa (Yamaji *et al.*, 1995; Wada *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Nomiyama *et al.*, 2007). Estudos tem mostrado que a exposição das células ao LPS bacteriano não interfere na proliferação e viabilidade das células pré-osteoblásticas (Kadono *et al.*, 1999), células mesenquimais de medula-óssea (Mo *et al.*, 2008), células mesenquimais de tecido adiposo (Hwa *et al.*, 2006) e células do ligamento periodontal (Jönsson *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2006).

Células do ligamento periodontal foram tratadas com LPS de *Escherichia coli* (*E. coli*) com diferentes concentrações em tempos variados e pode-se verificar que mesmo após três semanas de exposição ao LPS bacteriano não houve mudança nas características destas células (Jönsson *et al.*, 2008). Da mesma forma, estas células não apresentaram mudanças morfológicas ou fisiológicas quando foram cocultivadas com *P. gingivalis* (Yamamoto *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que os LPS de endotoxinas bacterianas afetam especificamente a produção de citocinas e quimiocinas, enquanto não possuem qualquer efeito sobre as propriedades fisiológicas normais de células de PDL. Assim, as células PDL parecem preservar as suas propriedades estruturais e fisiológicas, isto é, a síntese do colágeno e proliferação, mesmo quando são expostas às endotoxinas bacterianas como LPS.

A partir destes relatos, é razoável supor que a eficácia das preparações de LPS de *P. gingivalis* na indução de uma resposta biológica depende da natureza das respostas e do tipo celular testados, da cepa de *P. gingivalis* utilizada, e, eventualmente, o método de preparação de LPS (Wang & Ohura, 2002).

#### 2.2.4 O efeito do processo inflamatório nas células mesenquimais indiferenciadas

O crescente interesse na utilização de MSCs como uma fonte de terapia celular direciona os novos estudos a tentar compreender o potencial impacto das toxinas bacterianas sobre o crescimento e diferenciação das MSCs, tornando esta uma preocupação crescente. A exposição a um ambiente enriquecido de

endotoxinas pode afetar muitos aspectos das propriedades de MSCs tais como a auto-renovação, potencial de diferenciação, produção de citocinas e de compostos da matriz extracelular.

Estudo na área médica avaliou qual seria o resultado de episódios recorrentes de inflamação, como pode ser visto na esclerose múltipla reincidente-remittente, em modelo animal, induzido pela injeção de citocinas pró-inflamatórias ( $TNF-\alpha$  e interferon- $\gamma$ ), simulando um processo inflamatório crônico cerebral, e verificou que as propriedades proliferativa, migratória e a plasticidade das células-tronco da zona subventricular são significativamente comprometidas (Pluchino *et al.*, 2008).

Da mesma forma, o dano arterial constante (aterosclerose) provoca a liberação de citocinas, que por sua vez estimulam a liberação das células progenitoras endoteliais para a área de lesão. O reparo do endotélio danificado pelas células progenitoras completa o processo, evitando a invasão de mais células inflamatórias. A exposição continuada às citocinas e o avanço da idade podem esgotar o armazenamento de células progenitoras. Uma doença crônica pode consumir algumas das células de reparo que se originam a partir da medula óssea e que poderiam ser necessárias para prevenir a doença em outros órgãos (Goldschmidt-Clermont & Peterson, 2003).

Sendo a periodontite uma doença inflamatória crônica e a cavidade oral um ambiente microbiano complexo, uma profunda compreensão da diferenciação de MSCs no microambiente periodontal torna-se essencial e o controle da infecção durante a cicatrização, fundamental (Zhao *et al.*, 2008), uma vez que alguns estudos sugerem que as células do ligamento periodontal podem alterar seu fenótipo em resposta à inflamação promovida por lipopolissacarídeos (Somerman *et al.*, 1990; Takashiba *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006).

A presença do LPS bacteriano pode modificar o fenótipo das células do ligamento periodontal por meio da  $IL-1\beta$ , modulando suas características, e tornando-as mais responsivas ao LPS, participando ativamente no processo de doença em detrimento das suas propriedades estruturais normais e funções, como as características de células semelhantes à osteoblastos (Agarwal *et al.*, 1998).

O melhor entendimento da interação entre as células-tronco e o sistema imune é fundamental, pois as respostas imunes devem ser notadas, como mostrado em estudos *in vivo* (Poncelet *et al.*, 2007), para que as MSC possam ser usadas em

diversas aplicações clínicas, incluindo a regeneração periodontal. Mais estudos devem ser realizados para determinar se as PDLSCs alogênicas podem suprimir a rejeição do hospedeiro receptor a curto e longo prazo e para elucidar como estas células mesenquimais indiferenciadas se portam frente ao desafio bacteriano constante, como o de uma doença inflamatória crônica.

Desta forma, a compreensão da interação entre as células progenitoras que residem no ligamento periodontal e as toxinas bacterianas e citocinas inflamatórias torna-se fundamental uma vez que estas células são a principal fonte da regeneração periodontal.

### **3. CONCLUSÃO**

Diante do exposto podemos concluir que a presença do lipopolissacarídeo bacteriano poderia alterar as propriedades biológicas das células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal, como a formação de nódulos minerais, a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica. Estas células são as responsáveis pela completa regeneração do periodonto independentemente da terapia regenerativa utilizada, com biomateriais ou moléculas bioativas. Contudo, mais estudos precisam ser realizados no intuito de verificar se estas alterações nas características das células mesenquimais indiferenciadas comprometeriam o seu fenótipo indiferenciado, resultando em uma pior resposta no processo de regeneração, dificultando resultados satisfatórios e mais previsíveis nas terapias regenerativas.

## REFERÊNCIAS

- Agarwal S, Chandra CS, Piesco NP, Langkamp HH, Bowen L, Baran C. Regulation of Periodontal Ligament Cell Functions by Interleukin-1b. *Infect Immun.*1998; 66(3):932-7.
- Aleo JJ, De Renzis FA, Farber PA. *In vitro* attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J Periodontol* 1975; 46:639-45.
- Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 2004; 8(3):301-16.
- Bartold PM, Narayanan AS. Periodontal regeneration. *Biology of the Periodontal Connective Tissues*, Vol., Chapter 11. Chicago: Quintessence Publishing; 1998.
- Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: A new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol* 2000. 2000; 24:253-69.
- Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontology* 2000. 2006; 40, 164–72.
- Batouli S, Miura, M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, *et al.* Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003; 82,976–81.
- Battula VL, Bareiss PM, Treml S, Conrad S, Albert I, Hojak S, *et al.* Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing

medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation*. 2007; 75:279-91.

- Becker W & Becker BE. Periodontal regeneration: a contemporary re-evaluation. *Periodontology* 2000.1999; 19: 104–14.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001; 105(7):829-41.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006; 44(4):215-30.
- Bowers GG, Schallhorn RG, & Melloning JT. Histologic evaluation of new attachment in human intrabony defects. A literature review. *J Periodontol*. 1982;53:509–14.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, *et al*. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science*. 1999; 285:732-36.
- Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol*.1990; 61(9):597-601.
- Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, Janz FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 2009; 31(Supl.1):25-35.
- Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang C-Y. NF-kappaB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dental Res*. 2005; 84 (11): 994–8.
- Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Fang C, Wu Z-F. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. *Biomaterials*. 2010; 31: 7892-7927.

\*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* grupo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 2006b; 41:547-53.
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized micro niche. *J Bacteriol* 1994; 176:2137-42.
- Coura GS, Garcez RC, de Aguiar CB, Alvarez-Silva M, Magini RS, Trentin AG. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodontal Res*. 2008; 43: 531–36.
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K *et al*. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun*. 2004; 72:5041–51.
- Darveau RP. The oral microbial consortiums interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol* 2009; 28:389–95.
- Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Papapanou PN, Sacco RL. Relationship between periodontal disease, tooth loss, and carotid artery plaque: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Stroke* 2003; 34:2120-25.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8:315-17.
- Egelberg J. Regeneration and repair of periodontal tissues. *J Periodontal Res*. 1987; 22(3):233-42.

- Elangovan S, Srinivasan S, Ayilavarapu S. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. *Expert Opin Biol Ther.* 2009; 9 (4): 399-410.
- Elter JR, Offenbacher S, Toole JF, Beck JD. Relationship of periodontal disease and edentulism to stroke/TIA. *J Dent Res* 2003; 82:998-1001.
- Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, *et al.* Utility of PDL progenitors for *in vivo* tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.* 2010; 16: 20–28.
- Fodor WL. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1:102.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968; 6:230–47.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987; 20:263–72.
- Gaddis DE, Michalek SM, Katz J. Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Immunol.* 2009; 46:2493-2504.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007; 10:149-60.
- Gilbert P, Evans DJ, Brown MR. Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*. *J Appl Bacteriol* 1993; 74: 67S-78S.
- Goldschmidt-Clermont P J & Peterson ED. On the Memory of a Chronic Illness. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2003; 45:re8.
- Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by Oct4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2007; 25:3143-54.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-30.
- Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research.* 2002; 81, 531–35.
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, *et al.* Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1827-35.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Linde J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 1984; 11:494–503.
- Hajishengallis G, Martin M, Sojar HT *et al.* Dependence of bacterial protein adhesins on toll-like receptors for proinflammatory cytokine induction. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002a; 9:403–11.
- Hajishengallis G, Sharma A, Russell MW, Genco RJ. Interactions of oral pathogens with toll-like receptors: possible role in atherosclerosis. *Ann Periodontol.* 2002b; 7: 72–78.
- Hajishengallis G, Tapping RI, Harokopakis E *et al.* Differential interactions of fimbriae and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* with the Toll-like

receptor 2-centred pattern recognition Fibroblasts in interaction with *P. gingivalis* apparatus. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 1557–70.

- Hajishengallis G, Wang M, Bagby GJ, Nelson S. Importance of TLR2 in early innate immune response to acute pulmonary infection with *Porphyromonas gingivalis* in mice. *J Immunol.* 2008; 181:4141–49.
- Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskandari MA et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011; 10(5): 497-506.
- Hatakeyama J, Tamai R, Sugiyama A, Akashi S, Sugawara S, Takada H. Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 14–23.
- Hausmann E, Weinfeld N, Miller WA. Effects of lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. *Calcif. Tissue Res.* 1972; 9: 272–82.
- Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, et al. Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1999; 163: 2382-86.
- Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, et al. Signaling by Toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun.* 2001; 69:1477-82.
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005; 7(5): 393-5.
- Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999; 20: 168-238.
- Hou L, Sasaki H, Stashenko P. Toll-like receptor 4-deficient mice have reduced bone destruction following mixed anaerobic infection. *Infect Immun.* 2000; 68: 4681-87.
- Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative Medicine. *J Dent Res.* 2009; 88(9): 792-806.
- Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS: Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells.* 2006; 24(12): 2744-52.
- Iino Y & Hopps RM. The bone resorbing activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Capnocytophaga ochracea* isolated from human mouths. *Arch. Oral Biol.* 1984; 19: 59–63.
- Isaka J, Ohazama A, Kobayashi M, Nagashima C, Takiguchi T, Kawasaki H, et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol.* 2001; 72: 314-23.
- Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials.* 2009; 30: 2716–23.
- Jepsen S, Eberhard J, Herrera D, Needleman I. A systematic review of guided tissue regeneration for periodontal furcation defects. What is the effect of guided tissue regeneration compared with surgical debridement in the treatment of furcation defects? *J Clin Periodontol.* 2002; 29 Suppl 3: 103-16.

- Jones KJ, Ekhlassi S, Montufar-Solis D, Klein JR, Schaefer JS. Differential cytokine patterns in mouse macrophages and gingival fibroblast following stimulation with *Porphyromonas gingivalis* or *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Periodontol.* 2010; 81: 1850-57.
- Jönsson D, Nebel D, Bratthall G, Nilsson B. LPS-induced MCP-1 and IL-6 production is not reversed by oestrogen in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 2008; 53(9): 896-902.
- Kadono H, Kido J, Kataoka M, Yamauchi N, Nagata T. Inhibition of osteoblastic cell differentiation by lipopolysaccharide extract from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 1999; 67: 2841-6.
- Kaldahl WB, Kalkwarf KL & Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol.* 1993; 64: 243-53.
- Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7(2): 96-105.
- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 51-60.
- 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(1): 26-35.
- Kawanabe N, Murakami K, Yamamoto-Takano T. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *BBRC.* 2006; 344: 1278-83.
- Kelliner S, Kikyo N. Transcriptional regulation of Oct4 gene, a master gene for pluripotency. *Histol Histopathol* 2010; 25:405-12.
- Kikkert R, Laine ML, Aarden LA, van Winkelhoff AJ. Activation of toll-like receptors 2 and 4 by gram-negative peri-odontal bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 145-51.
- Kobayashi Y, Hashimoto F, Miyamoto H, Kanaoka K, Miyazaki-Kawashita Y, Nakashima T, *et al.* Force-induced osteoclast apoptosis *in vivo* is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(10): 1924-34
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation.* *Arthritis Res Ther.* 2007; 9:204.
- Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 1999; 11:13-18.
- Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62: 1244-63.
- Lemischka IR. Stem cell biology: a view toward the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1044: 132-8.
- Lindemann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988; 67: 1131-35.
- Lindroos B, Mäenpää K, Ylikomi T, Oja H, Suuronen R, Miettinen S. Characterization of human dental stem cells and buccal mucosa fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 368: 329-35.
- Loomer PM, Ellen PR, Tenenbaum HC. Characterization of Inhibitory Effects of Suspected Periodontopathogens on Osteogenesis *In vitro*. *Infect immun.* 1995; 63(9): 3287-96.



- Liu WH, Yacobi R, Savion N, Narayanan AS, Pitaru S. A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of the mineralized tissue forming cell lineage of the periodontal ligament. *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1691–99.
- Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM *et al.* Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 2008; 26: 1065–73.
- Mahanonda R, Pichyangkul S. Toll-like receptors and their role in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000. 2007; 43: 41–55.
- Mahanonda R, Sa-Ard-lam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichit K, Fukuda MM, *et al.* IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol*. 2007; 178: 1151-57.
- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica*. 2001; 86: 1099-1100.
- Matera G, Muto V, Vinci M, *et al.* Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol*. 2009; 16: 1804-09.
- Mayrand D & Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 1988; 52: 134–37.
- McCulloch CA, Nemeth E, Lowenberg B & Melcher AH. Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. *Ana Rec*. 1987; 219: 233–42.
- McCulloch CAG, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res* 1991; 26: 144–54.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997; 388: 394-97.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol*. 1976; 47(5): 256-60.
- Melcher AH. Cells of periodontium: their role in the healing of wounds. *Ann R Coll Surg Engl*. 1985; 67: 130–31.
- Millar SJ, Goldstein EG, Levine MJ, Hausmann E. Modulation of bone metabolism by two chemically distinct lipopolysaccharide fractions from *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun*. 1986; 57: 302–06.
- Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, *et al.* SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 5807-12.
- Miura Y, Miura M, Gronthos S, Allen MR, Cao C, Uveges TE, *et al.* Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 14022-27.
- Miyauchi M, Sato S, Kitagawa S, Hiraoka M, Kudo Y, Ogawa I, Zhao M, Takata T. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. *Histochem Cell Biol*. 2001; 116:57–62.
- Mizuno H, Zuk PA, Zhu M, Lorenz HP, Benhaim P, Hedrick MH. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109: 199-209.

- Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biology*. 2008;9: 52.
- Moore WEC, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active disease destructive progression. *J. Clin. Periodontol.*1991; 18: 729–39.
- Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med.*1987; 38: 417–32.
- Morsczech C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, *et al.* Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol.* 2005; 24: 155-65.
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.* 2006; 41: 303-10.
- Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremo-to K, Matsuno T, Tabata Y *et al.* In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells. *Tissue Eng.* 2004; 10: 537–44.
- Nishimine D, O'Leary TJ. Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surface. *J Periodontol* 1979; 50: 345-49.
- Nociti FH Jr, Foster BL, Barros SP, Darveau RP, Somerman MJ. Cementoblast gene expression is regulated by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide partially via toll-like receptor-4/MD-2. *J Dent Res.* 2004; 83(8): 602–07.
- Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, *et al.* Effects of lipopolysaccharide on newly established rat dental pulp-derived cell line with odontoblastic properties. *J Endod.* 2007; 33(10): 1187–91.
- Nonnenmacher C, Dalpke A, Zimmermann S, Flores-De-Jacoby L, Mutters R, Heeg K. DNA from periodontopathogenic bacteria is immunostimulatory for mouse and human immune cells. *Infect Immun.* 2003; 71: 850–56.
- Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 394–401.
- Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. *Ann Periodontol.* 1996; 1: 821-78.
- Peters H, Balling R. Teeth. Where and how to make them. *Trends Genet.* 1999; 15: 59–65.
- Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origin and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res.* 1994; 19: 81–94.
- Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2006; 41: 30-47.
- Poncelet AJ, Vercruysse J, Saliez A, Gianello P. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic *in vitro*, intracardiac injection elicits an immune response *in vivo*. *Transplantation.* 2007; 83: 783-90.
- Porada CD, Zanjani ED, Almeida-Porad G. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2006; 1: 365-69.
- Pluchino S, *et al.* Persistent inflammation alters the function of the endogenous brain stem cell compartment. *Brain* 2008; 131: 2564-78.

- Ramakrishnan PR, Lin WL, Sodek J, Cho MI. Synthesis of noncollagenous extracellular matrix proteins during development of mineralized nodules by rat periodontal ligament cells *in vitro*. *Calcif Tissue Int*. 1995; 57: 52–9.
- Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am*. 2010;54:55-71.
- Rietschel E, Kirikae T, Schade F, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, *et al*. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994; 8: 217-25.
- Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, Schenkein HA. DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol*. 2010; 25: 123–35.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J. A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 8116–20.
- Scheres N, Laine ML, Sipos PM, Bosch-Tijhof CJ, Crielaard W, de Vries TJ, Everts V. Periodontal ligament and gingival fibroblasts from periodontitis patients are more active in interaction with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. 2011; 46: 407–16.
- Schifferle RE, Wilson ME, Levine MJ, Genco RJ. Activation of serum complement by polysaccharide-containing antigens of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*. 1993; 28: 248-54.
- Schöler HR, Ciesiolka T, Gruss P. A nexus between Oct-4 and E1A: Implications for gene regulation in embryonic stem cells. *Cell*. 1991; 66: 291-304.
- Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem*. 1999; 274: 17406-409.
- Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, *et al*. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-55.
- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001;29:532–39.
- 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.
- Shi S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofac Res*. 2005; 8: 191–99.
- Silvério KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament cells from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol*. 2010; 81: 1207-15.
- Slots J & Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in periodontal colonization, survival and tissue destruction. *J Dent Res*. 1984; 63: 412–21.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63: 322-31.
- Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135-87.
- Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells *in vitro*. *Arch Oral Biol*. 1990; 35: 241–7.

- Sonoyama W, Liu Y, Fang D *et al.* Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. PLoS ONE. 2006; 1(e79): 1–8.
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. J Endod. 2008; 34: 166-71.
- Suaid FF, Ribeiro FV, Gomes TR, Silvério KG, Carvalho MD, Nociti FH Jr *et al.* Autologous periodontal ligament cells in the treatment of Class III furcation defects: a study in dogs. J Clin Periodontol. 2012; 39(4): 377-84.
- Sun Y, Shu R, Zhang MZ, Wu AP. Toll-like receptor 4 signaling plays a role in triggering periodontal infection. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008; 52:362-69.
- Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. J Periodontol. 2010; 81(10): 1488-96.
- Tabeta K, Yamazaki S, Akashi K, Miyake K, Kumada H, Umemoto T. Toll-like receptors confer responsiveness to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in human gingival fibroblasts. Infect Immun. 2000; 68: 3731-35.
- Takashiba S, Naruishi K, Murayama Y. Perspective of cytokine regulation for periodontal treatment: fibroblast biology. J Periodontol. 2003; 74: 103–10.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. Immunity 1999; 11: 443–51.
- Tamura M, Tokuda M, Nagaoka S, Takada H. Lipopolysaccharides of *Bacteroides intermedius* (*Prevotella intermedia*) and *Bacteroides* (*Porphyromonas*) *gingivalis* induce interleukin-8 gene expression in human gingival fibroblast cultures. Infect. Immun. 1992; 60: 4932–37.
- Thesleff I & Aberg T. Molecular regulation of tooth development. Bone. 1999; 25: 123–5.
- Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. A systematic review of graft materials and biological agents for periodontal intraosseous defects. J Clin Periodontol. 2002; 29 Suppl 3: 117-35.
- Trombelli L. Which reconstructive procedures are effective for treating the periodontal intraosseous defect? Periodontol 2000. 2005; 37: 88-105.
- van Winkelhoff AJ, van Appelmelk BJ, Kippuw N, de Graaff J. K-antigens in *Porphyromonas gingivalis* are associated with virulence. Oral Microbiol Immunol. 1988; 8: 259-265.
- van Winkelhoff AJ, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U. *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. J Clin Periodontol. 2002; 29: 1023–28.
- Villar CC & Cochran DL. Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. Dent Clin North Am 2010; 54: 73-92.
- Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. Stem Cells Dev. 2009; 18: 487-96.
- Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A. Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappa B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. Bone. 2004; 35(3): 629–35.

- Wang PL & Ohura K. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts – CD14 and Toll-like receptors. Crit Rev Oral Biol Med. 2002; 13(2): 132-42.
- Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontal pathogenic bacteria. J Periodontal Res. 1996; 31: 393–407.
- Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Baba S. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: a clinical case report. Int J Periodontics Restorative Dent. 2006b; 26: 363-69.
- Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K, Sato S, Suzuki Y, Kumada H, et al. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. Infect Immun. 1995; 63(9): 3576– 81.
- Yamamoto T, Kita M, Oseko F, Nakamura T, Imanishi J, Kanamura N. Cytokine production in human periodontal ligament cells stimulated with Porphyromonas gingivalis. J Periodont Res. 2006; 41: 554–9.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. Immun. 1999; 163: 1-5.
- Zannettino ACW, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, et al. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype *in vitro* and *in vivo*. J Cell Physiol. 2008; 214: 413-21.
- Zhao Q, Gong P, Tan Z, Yang X. Differentiation control of transplanted mesenchymal stem cells (MSCs). Medical Hypotheses 2008; 70: 944–47.
- Zhou Q & Amar S. Identification of signaling pathways in macrophage exposed to Porphyromonas gingivalis or to its purified cell wall components. J Immunol. 2007; 179: 7777–90.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001; 7: 211-28.