

MIKI TAKETOMI SAITO

ENGENHARIA TECIDUAL EM PERIODONTIA

PIRACICABA

2011

MIKI TAKETOMI SAITO

ENGENHARIA TECIDUAL EM PERIODONTIA

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. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

PIRACICABA

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

Sa28e Saito, Miki Taketomi.
Engenharia tecidual em periodontia / Miki Taketomi Saito. --
Piracicaba, SP: [s.n.], 2011.
32f.

Orientador: Francisco Humberto Nociti Júnior.
Monografia (Especialização) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Regeneração. I. Nociti Júnior, Francisco
Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Dedico este trabalho aos meus pais,
Kunihiro Saito e Julieta Taketomi Saito,
exemplos de dedicação e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela benção da vida e pelas oportunidades que me proporcionou no decorrer dela.

Aos meus pais, por me darem mais do que apoio, por me incentivarem a seguir em busca do melhoramento de minha formação acadêmica, por me mostrar que nada vence a dedicação e o trabalho honesto; pelo amor incondicional que nos une.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, onde pude aprofundar meus conhecimentos e aperfeiçoar minhas habilidades a fim de me tornar especialista em Periodontia.

Aos professores do Curso de Especialização em Periodontia, na pessoa do seu Coordenador, Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, pela dedicação em nos passar seus ensinamentos e nos assistir na clínica, dando-nos conforto e segurança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr., por, desde o início, estar disposto a ouvir meus anseios, sonhos, dando-me a oportunidade de ser sua orientada, permitindo que eu acompanhasse seus alunos de pós-graduação, em especial, a aluna Thaisângela Rodrigues, a quem também agradeço pelas palavras de carinho e incentivo, entre tantas outras ajudas.

Aos alunos de pós-graduação e de Especialização em Periodontia desta Faculdade, que com o passar do tempo, também se tornaram amigos, agradeço pelos conselhos, momentos de trabalho e momentos de descontração. Aqui não citarem nomes, pois são muitos os alunos que me ajudaram, direta ou indiretamente, e receio que, sem querer, possa esquecer injustamente de alguém. Assim, sintam-se todos agradecidos.

Aos funcionários da Faculdade, por sempre estarem disposto ajudar.

Ao meu namorado Patrick Lopes, por todo o carinho e compreensão, que me fizeram entender que dois olhares podem ser separados pela distância, mas os corações podem manter-se unidos pela intensidade do sentimento.

Aos meus amigos, em especial aos belenenses que moram em Piracicaba: Patrícia Feio, Camila Andrade e Lucas Moura, pelas alegrias divididas, pelo apoio nos momentos de tristeza e desânimo, pela torcida a cada desafio a ser enfrentado.

*“Se na tua dura vida a felicidade
Parece estar em distante lugar,
Maior precisa ser a tua vontade
De persegui-la até a encontrar.*

*E nunca temas uma tempestade,
Não deixes nada te desanimar,
Quanto maior for a dificuldade,
Com mais empenho debes lutar.*

*Sigas em frente com humildade,
Buscando o próximo respeitar,
Propagues a justiça e a verdade
E assim farás o mundo melhorar.*

*Aos princípios tenhas fidelidade,
O amor e a fé podem tudo mudar,
O teu sonho se tornará realidade
Se nele não deixares de acreditar.”*

Dennys Távora

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1. Procedimentos propostos para a regeneração periodontal	10
2.2. Engenharia tecidual.....	12
2.2.1. Células	12
2.2.2. Arcabouço	14
2.2.3. Moléculas sinalizadoras	16
2.2.4. Interação entre os elementos da engenharia tecidual	17
3. DISCUSSÃO	23
4. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

RESUMO

Nas últimas décadas, muitos procedimentos foram realizados para assegurar um ambiente onde a regeneração periodontal pudesse ocorrer, tais como a regeneração tecidual guiada, utilização de enxertos ósseos e derivados da matriz do esmalte. No entanto, estudos têm demonstrado que estas terapias apresentam baixa previsibilidade de regenerar o periodonto. A fim de aumentar o potencial e previsibilidade de regeneração, a engenharia tecidual tem sido proposta como uma alternativa para promover as condições necessárias para regenerar os tecidos periodontais. A engenharia tecidual se baseia em princípios de biologia celular e engenharia de biomateriais, envolvendo basicamente três elementos-chave: células, moléculas de sinalização e arcabouços. O conjunto de células obtidas a partir ligamento periodontal, assim como células isoladas com fenótipo de células mesenquimais indiferenciadas, tem sido investigado quanto ao potencial em promover a regeneração. Os efeitos das moléculas sinalizadoras sobre estas células e sobre o processo regenerativo também têm sido avaliados. Além disso, diversos arcabouços têm sido estudados com o objetivo de mimetizar a matriz extracelular, carrear células e liberar tais moléculas sinalizadoras na forma de proteínas recombinantes ou carrear vetores de maneira controlada, a fim de propiciar um micro-ambiente mais favorável à regeneração. Abordagens de engenharia tecidual envolvendo a interação destes três elementos têm demonstrado melhores resultados do que o uso isolado de um deles. Com base nestas abordagens, espera-se o desenvolvimento de técnicas que estimulem a regeneração periodontal, levando a resultados satisfatórios mais previsíveis.

ABSTRACT

In the past decades, many procedures were performed to ensure an environment where periodontal regeneration could occur, such as guided tissue regeneration, the use of bone grafts, and enamel matrix derivative. However, studies have shown that these therapies present low predictability of periodontal regeneration. In order to increase the regeneration potential and predictability, tissue engineering has been proposed as an alternative to promote necessary conditions for regenerating the periodontal tissues. Tissue engineering is based on principles of cellular biology and biomaterials engineering and basically involves three key-elements: cells, signaling molecules and scaffolds. The pool of cells obtained from periodontal ligament, as well as isolated cells presenting mesenchymal stem cells phenotype, has been investigated for the potential to promote regeneration. The effects of signaling molecules on these cells and on the regenerative process have also been evaluated. Moreover, many scaffolds have been studied in order to mimic the extracellular matrix, carry cells and deliver signaling molecules as recombinant proteins or carry vectors in a controlled manner, leading to the development of a more favorable microenvironment for regeneration. Tissue engineering approaches involving the interaction of these three elements have demonstrated better results than the isolated use of one of them. Based on these approaches, development of techniques that improve the periodontal regeneration is expected, leading to more predictable satisfactory outcomes.

1. INTRODUÇÃO

O periodonto corresponde ao aparato de inserção que circunda o dente e é composto por gengiva, cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Benatti *et al.*, 2007; Elangovan *et al.*, 2009). A periodontite é uma doença inflamatória iniciada pelo biofilme bacteriano, a qual resulta em destruição da inserção conjuntiva e de osso alveolar, podendo levar à perda dentária (Elangovan *et al.*, 2009). O principal objetivo da terapia periodontal é controlar a inflamação induzida pelas bactérias periodontopatogênicas a fim de restabelecer a saúde periodontal, permitindo a preservação do dente e do sistema mastigatório como um todo. Uma vez que o aspecto infeccioso-inflamatório da doença esteja controlado, a correção de defeitos anatômicos e a regeneração dos tecidos periodontais perdidos também devem ser objetivos da terapia periodontal (Elangovan *et al.*, 2009; Ivanovski, 2009).

Visando regenerar o periodonto, várias técnicas têm sido propostas desde o início dos anos de 1980, tais como regeneração tecidual guiada (RTG), utilização de enxertos e substitutos ósseos, condicionamento da superfície radicular, uso de proteínas derivadas do esmalte e fatores de crescimento. Contudo, como o periodonto é uma estrutura bastante complexa, não sendo composto apenas por um tipo tecidual, mas por diversos tecidos intimamente relacionados, a regeneração do periodonto tem se mostrado extremamente complexa e difícil de ser atingida, com ampla variabilidade dos resultados e baixa previsibilidade de regeneração utilizando-se tais técnicas regenerativas (Aichelmann-Reidy & Reynolds, 2008; Ivanovski, 2009). Além disso, tais técnicas apresentam indicação limitada a defeitos periodontais infra-ósseos e lesões de furca Grau II de Miller (Ivanovski, 2009).

Neste contexto, a engenharia tecidual surgiu com o objetivo de aumentar a previsibilidade de obtenção de regeneração e também de ampliar as indicações dos procedimentos regenerativos por meio da promoção de estímulo e condições ideais para a interação entre três elementos-chave, células, arcabouço e moléculas sinalizadoras (Bartold *et al.*, 2000). Este trabalho tem por objetivo revisar a literatura acerca dos princípios da engenharia tecidual e sua aplicação para a regeneração dos tecidos periodontais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Procedimentos propostos para a regeneração periodontal

Diversos procedimentos foram sugeridos para criar um ambiente favorável à regeneração dos tecidos periodontais. Inicialmente, o condicionamento da superfície radicular com agentes desmineralizantes, tais como o ácido cítrico e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), foi proposto com o objetivo de expor as fibras colágenas para favorecer a adesão do coágulo e a migração de fibroblastos. Apesar de alguns estudos terem demonstrado a formação de nova inserção em superfície radicular condicionada (Polson & Proye, 1982), outros estudos demonstraram que também poderia ocorrer reabsorção radicular e anquilose (Magnusson *et al.*, 1985). Em uma revisão sistemática realizada sobre o assunto, não se observou benefício clínico significativo do uso de condicionadores da superfície radicular (ácido cítrico, tetraciclina ou EDTA) para a regeneração periodontal em pacientes com periodontite crônica (Mariotti, 2003).

Enxertos e substitutos ósseos também têm sido utilizados em defeitos periodontais com o objetivo de regenerar o periodonto (Reynolds *et al.*, 2003). Eles podem ser classificados em enxertos autógenos (retirados do mesmo indivíduo), enxertos alógenos (retirado de outro indivíduo da mesma espécie), enxertos xenógenos (obtidos de animal de outra espécie) e materiais aloplásticos (materiais sintéticos). Apesar de estes materiais resultarem em melhoria dos parâmetros clínicos avaliados, tais como redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, comparados com o debridamento a retalho, a avaliação histológica de tais defeitos preenchidos com enxertos nem sempre demonstram regeneração periodontal, mas apresentam a formação de epitélio juncional longo entre o enxerto e a superfície radicular (Moskow *et al.*, 1979).

Baseado no conceito de que as células do ligamento periodontal possuem potencial para formar nova inserção conjuntiva e que a migração apical das células epiteliais compromete este potencial (Melcher, 1976), a utilização de uma membrana que servisse como barreira para o tecido epitelial e conjuntivo gengival migrar para a superfície da raiz, favorecendo a colonização da ferida por células do ligamento periodontal foi proposta e a técnica foi posteriormente denominada regeneração tecidual guiada (RTG) (Nyman *et al.*, 1982a), tendo o primeiro relato em humanos ocorrido em 1982 (Nyman *et al.*, 1982b). Contudo, mesmo com a comprovação histológica da possibilidade de regeneração do periodonto pela utilização de barreiras oclusivas na técnica de RTG, o resultado clínico parece

ser imprevisível e de pequena magnitude, provavelmente pela dificuldade de se selar completamente a área da ferida e pela infecção pós-operatória (Bartold *et al.*, 2000; Elangovan *et al.*, 2009). Apesar da RTG não ter alcançado os resultados clínicos e previsibilidade esperados, ela estimulou a investigação para o desenvolvimento de técnicas baseadas em maior fundamentação biológica.

Neste sentido, a investigação dos fenômenos ocorridos durante a formação do órgão dentário levou a proposição da utilização de proteínas derivadas da matriz do esmalte (EMD), comercializado como Emdogain[®] (Straumann, Waltham, MA, EUA), que mimetizariam os fenômenos ocorridos durante a formação do cimento na embriogênese, estimulando a diferenciação das células mesenquimais do ligamento periodontal em cementoblastos, que, por sua vez, produziriam uma nova camada de cimento sobre superfície radicular previamente exposta à doença (Hammarstrom, 1997). Um estudo de metanálise relatou que defeitos periodontais infra-ósseos demonstraram ganho de inserção e redução da profundidade de sondagem estatisticamente significativa com o uso de EMD em comparação com o debridamento cirúrgico e que não foram observadas diferenças em tais parâmetros clínicos quando se comparam os sítios tratados com EMD ou RTG (Esposito *et al.*, 2005). Entretanto, da mesma forma que a RTG, o uso de EMD também apresenta resultados com grande variabilidade, o que leva a técnica a ser considerada pouco previsível (Ivanovski, 2009).

Também com base nos fenômenos biológicos de cicatrização, a utilização de fatores de crescimento, tais como proteína óssea morfogenética (BMP) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), tem sido proposta para estimular a regeneração de osso e do periodonto. Atualmente, o PDGF recombinante humano (rhPDGF) em associação com enxerto de β -tricálcio-fosfato foi aprovado pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) nos Estados Unidos da América para a utilização em defeitos periodontais infra-ósseos e de furca (Lynch *et al.*, 2006), enquanto o BMP-2 recombinante humano (rhBMP-2) em associação com esponja de colágeno foi aprovado pela mesma instituição como uma alternativa ao enxerto autógeno para elevação de seio maxilar e para aumento de processo alveolar em defeito associados a extrações (Mckay *et al.*, 2007).

Apesar de melhorias em parâmetros clínicos, como redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção clínica, terem sido observadas com a utilização de alguns dos procedimentos regenerativos citados anteriormente, a previsibilidade dos resultados ainda não pode ser considerada satisfatória e a indicação destes procedimentos ainda é limitada a

defeitos infra-ósseos e lesões de furca Grau II de Miller (Ivanovski, 2009). Além disso, a avaliação histológica destes procedimentos regenerativos muitas vezes demonstra que somente a porção apical do defeito é regenerada de fato, isto é, apresenta formação de novo cemento, novo osso e fibras perpendicularmente inseridas nestes dois tecidos. Neste contexto, a engenharia tecidual tem sido investigada como uma alternativa para aumentar o potencial de regeneração do periodonto ao longo de toda a superfície radicular, melhorar a previsibilidade dos resultados clínicos e expandir as indicações dos procedimentos regenerativos para defeitos mais críticos, tais como os defeitos supra-ósseos e lesões de furca Grau III de Miller.

2.2. Engenharia tecidual

A engenharia tecidual é um crescente campo da ciência baseado em princípios de biologia celular e engenharia de biomateriais, que tem como objetivo o provimento de ambiente favorável à regeneração dos tecidos ou órgãos lesados (Bartold *et al.*, 2006). Os três componentes básicos da engenharia tecidual são células, arcabouço e moléculas sinalizadoras (Nakahara, 2006). Baseado nestes três elementos-chave da engenharia tecidual, tanto abordagens *in vitro* como *in vivo* visando propiciar condições favoráveis para a regeneração periodontal têm sido investigadas. A abordagem *in vitro* consiste na produção do tecido em laboratório (cultivo celular) e subsequente implantação do tecido formado no organismo onde o mesmo foi perdido. A formação de tecido em cultivo estático, contudo, é dificultada pela ausência de sistema circulatório que permita a nutrição ao longo de todo o volume de tecido e remoção dos metabólitos. Neste sentido, métodos de cultura dinâmicos têm sido investigados para permitir maior fluxo de nutrientes no interior do arcabouço (Sikavitsas *et al.*, 2002; Botchwey *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2003b) e demonstraram acelerar a proliferação e diferenciação celular de osteoblastos, assim como aumentar a mineralização nos arcabouços (Sikavitsas *et al.*, 2002). Já a abordagem *in vivo* consiste na implantação de arcabouços combinados com biomoléculas e/ou células no defeito a ser regenerado. A seguir, cada um dos elementos-chave será abordado isoladamente e seguidos por uma revisão de estudos que avaliaram a combinação destes elementos a fim de criar ambiente favorável à regeneração periodontal.

2.2.1. Células

De acordo com o estudo de Melcher (1976), sabe-se que o tipo celular que povoa a ferida cirúrgica periodontal durante os estágios iniciais de cicatrização é crítico para

determinar se reparo ou regeneração irá ocorrer. Neste sentido, uma das propostas da engenharia tecidual é a implantação de células com potencial para regenerar o defeito a fim de superar a necessidade de recrutamento celular, acelerando o processo regenerativo (Murphy & Mooney, 1999; Lin *et al.*, 2008).

A remoção do ligamento periodontal do terço médio da raiz de dentes saudáveis extraídos por razões ortodônticas é a fonte mais comumente utilizada para obtenção de células do ligamento periodontal em experimentos *in vitro* e *in vivo* para a engenharia tecidual periodontal. As células obtidas do ligamento periodontal (PDLCS) não representam uma população homogênea, apresentando subtipos celulares relacionados com a formação do periodonto de inserção (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar) (Ivanovski *et al.*, 2006). Esta complexidade celular levou à especulação de que o ligamento periodontal também possuiria células progenitoras que dariam origem às diversas subpopulações celulares do ligamento periodontal, o que foi posteriormente comprovado por 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 CD-146, marcadores relacionados a células indiferenciadas, e alta expressão de scleraxis, um fator de transcrição especificamente expresso em células do tendão, além de apresentarem capacidade de se diferenciar em células com fenótipo de cementoblastos e adipócitos *in vitro*.

Mais recentemente, células indiferenciadas também foram isoladas do ligamento periodontal de dentes decíduos e demonstraram apresentar 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 (Silverio *et al.*, 2010).

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 auto-renováveis, apresentam alta proliferação e capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares (Arosarena, 2005; Nagatomo *et al.*, 2006; Gay *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2008; Elangovan *et al.*, 2009; Silverio *et al.*, 2010). Neste sentido, Yamada *et al.* (2006) relataram um caso onde defeitos periodontais angulares foram acessados cirurgicamente, as raízes foram raspadas e alisadas e o defeito foi preenchido com células tronco mesenquimais da medula óssea da crista ilíaca em associação com plasma rico em plaquetas. Em avaliação um

ano após a cirurgia, observou-se redução de 4 mm na profundidade de sondagem e ganho também de 4 mm na inserção clínica, redução da profundidade do defeito radiograficamente, além do desaparecimento da mobilidade dental e do sangramento.

Alternativamente, o recrutamento de células dos tecidos periodontais remanescentes no local da ferida também tem sido proposto como uma nova estratégia de engenharia tecidual a fim de evitar a necessidade de cultivo celular *ex vivo*, o que poderia tornar a técnica menos dispendiosa e mais viável para ser aplicada por clínicos, uma vez que requereria menor infra-estrutura e treinamento técnico (Chen *et al.*, 2010). Para que tal recrutamento celular possa ocorrer, é essencial que moléculas sinalizadoras e carreadores apropriados sejam disponibilizados na área da ferida para que as condições ideais de migração, adesão e diferenciação celular possam ocorrer a fim de regenerar os tecidos perdidos.

2.2.2. Arcabouço

O arcabouço desenvolvido para engenharia tecidual deve apresentar estrutura tridimensional (3D) a fim de mimetizar a matriz extracelular (MEC) do tecido previamente perdido (Bartold *et al.*, 2000), além de outras características que favoreçam a regeneração tecidual, tais como: deve ser fabricado com material biocompatível, livre de doenças transmissíveis (Bartold *et al.*, 2006; Hutmacher & Cool, 2007); deve ter poros maiores que 100µm, permitindo a adesão e migração celular em sua superfície (Van Eeden & Ripamonti, 1994; Shors, 1999; Hutmacher, 2001; Bartold *et al.*, 2006; Hutmacher & Cool, 2007; Zhang *et al.*, 2007c; Scheller *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009) e difusão de nutrientes e metabólitos (Murphy & Mooney, 1999); deve ser suficientemente robusto para evitar o colapso dos tecidos subjacentes no defeito (Bartold *et al.*, 2000; Shea *et al.*, 2000; Hutmacher, 2001; Bartold *et al.*, 2006; Hutmacher & Cool, 2007; Kao *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2009); deve ser biodegradável e sua velocidade de degradação deve ser compatível com a formação do tecido regenerado (Bartold *et al.*, 2000; Shea *et al.*, 2000; Bartold *et al.*, 2006; Hutmacher & Cool, 2007; Zhang *et al.*, 2007c; Um *et al.*, 2008; Scheller *et al.*, 2009; Chen & Jin, 2010). Além de servir como estrutura tridimensional para a adesão e proliferação celular e sustentação tecidual, outra função que tem sido investigada para o arcabouço é que este sirva de carreador para moléculas sinalizadoras e que possa liberá-las de forma temporal e espacialmente controlada (Bartold *et al.*, 2000; Kao *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2009).

Muitos materiais têm sido estudados para a fabricação de arcabouços que atendam propriedades anteriormente descritas, podendo ser classificados basicamente em três categorias: cerâmicas, polímeros e compósitos (Frohlich *et al.*, 2008).

As cerâmicas podem ser tanto de origem natural, como as derivadas de coral (Shors, 1999), quanto sintéticas, como a hidroxiapatita (HA) e o β -tricálciofosfato (β -TCP) (Frank *et al.*, 1991; Oi *et al.*, 2009). As cerâmicas apresentam composição mineral similar a dos tecidos duros humanos, permitindo a formação óssea sobre sua superfície, contudo, também são rígidas e quebradiças (Um *et al.*, 2008; Chesnutt *et al.*, 2009).

Os polímeros também podem ser de origem natural ou sintética. Os polímeros naturais são obtidos a partir de elementos da MEC, como colágeno (Yang *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2009) e quitosana (Bartold *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007b; Peng *et al.*, 2009). Devido os polímeros naturais serem derivados de indivíduos ou animais, há um risco, mesmo que mínimo, de transmissão de doenças e reação imune (Yang *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2009; Yanagida *et al.*, 2009) e, desta forma, tem-se proposto a produção de colágenos com a remoção dos seus telopeptídeos terminais antigênicos ou a síntese de colágeno pela tecnologia recombinante (Yang *et al.*, 2004; Kao *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2009). Já os polímeros sintéticos são fabricados principalmente a partir de α -hidróxi-ácidos, tais como a poli(ϵ -caprolactone) (PCL), poli-(ácido glicólico) (PGA), poli-(ácido láctico) (PLA), e copolímeros de poli-(ácido láctico co-glicólico) (PLGA) (Buurma *et al.*, 1999; Jin *et al.*, 2003b; Barbanti *et al.*, 2004; Bartold *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2006; Gercek *et al.*, 2008). Os polímeros sintéticos apresentam certas vantagens, como a possibilidade de controle da forma, porosidade e pureza durante a fabricação (Shea *et al.*, 2000; Benatti *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009b; Chen & Jin, 2010). Contudo, certas desvantagens, como hidrofobicidade, também têm sido relatadas com relação a tais polímeros (Chen *et al.*, 2009b; Yanagida *et al.*, 2009).

Os compósitos são arcabouços desenvolvidos a partir da junção de materiais cerâmicos com os materiais poliméricos, tais como compósitos de coral/quitosana (Zhang *et al.*, 2007b), HA/quitosana (Zhang *et al.*, 2007c; Chesnutt *et al.*, 2009), nano-HA/colágeno (Cunniffe *et al.*, 2010), β -TCP/quitosana (Liao *et al.*, 2010) e HA/PLA (Yanagida *et al.*, 2009). Estes compósitos têm demonstrado melhores propriedades biológicas e mecânicas quando comparados com os arcabouços fabricados apenas com cerâmica ou polímeros isoladamente (Zhang *et al.*, 2007c; Chesnutt *et al.*, 2009; Yanagida *et al.*, 2009; Cunniffe *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2010). Os compósitos de HA/quitosana apresentaram maior rugosidade e área, maior flexibilidade, maior proliferação de osteoblastos *in vitro* (Chesnutt *et al.*, 2009),

além de maior expressão de ALP e colágeno tipo I por PDLCs humano (Zhang *et al.*, 2007c) quando comparados a arcabouços de quitosana. Já os compósitos de β -TCP/quitosana exibiram maior proliferação de PDLCs humano, assim como maior expressão de genes da BSP e proteína de adesão cementária (CAP) *in vitro*, além de maior expressão de ALP e osteopontina (OPN) *in vivo* quando comparados com os arcabouços de quitosana (Liao *et al.*, 2010). Enquanto os compósitos de HA/PLA demonstraram maior adesão de fibroblastos da linhagem L929 *in vitro* e menor reação inflamatória após implantação subcutânea em ratos quando comparados com arcabouços de PLA (Yanagida *et al.*, 2009). Compósitos de nano-HA/colágeno apresentaram módulo de compressão aumentado, com manutenção da porosidade, comparados com o arcabouço de colágeno (Cunniffe *et al.*, 2010).

2.2.3. Moléculas sinalizadoras

O processo de formação do periodonto é orquestrado por um grande número de moléculas sinalizadoras. Com o objetivo de mimetizar este processo e induzir a regeneração, diversos fatores de crescimento, como PDGF (Nevins *et al.*, 2003), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) (Oi *et al.*, 2009), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Palioto *et al.*, 2004), fator de crescimento transformante β (TGF- β) (Ripamonti *et al.*, 2009) e BMP (King, 2001), têm sido estudados quanto aos seus efeitos sobre as células do ligamento periodontal.

O PDGF é um potente mitogênico para células de origem mesenquimal, incluindo fibroblastos (Dereka *et al.*, 2006), podendo apresentar-se em quatro isoformas: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C e PDGF-D, os quais se combinam para formar homodímeros, como o PDGF-AA ou PDGF-BB, ou ainda heterodímeros, como o PDGF-AB (Dereka *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010). Em um estudo *in vitro* comparando-se os três dímeros, o PDGF-BB demonstrou produzir maior estímulo quimiotático e mitogênico às células do ligamento periodontal (Boyan *et al.*, 1994).

O FGF é considerado mitogênico e quimiotático, além de ser um fator angiogênico (Dereka *et al.*, 2006; Kitamura *et al.*, 2008; Kitamura *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010). O FGF-2, também denominado de FGF básico (bFGF), demonstrou aumentar a proliferação de células do ligamento periodontal humano *in vitro* ao mesmo tempo em que inibiu a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e formação de nódulos minerais (Murakami *et al.*, 1999). O FGF-2 também demonstrou aumentar a expressão gênica de colágeno tipo I e III e inibir a mineralização *in vitro* em células progenitoras do ligamento periodontal (Dangaria

et al., 2009). Em estudo clínico controlado aleatorizado, o uso de FGF-2 em concentrações de 0.03, 0.1 e 0.3% carregado em uma matriz de hidróxi-propil-celulose (HPC) foi avaliado em defeitos periodontais verticais de duas ou três paredes, e observou-se que, após 36 meses, a porcentagem de ganho de altura de osso alveolar foi significativa no grupo de HPC contendo 0.3% de FGF-2 comparando-se com o grupo controle (somente carreador de HPC sem FGF-2) (Kitamura *et al.*, 2008). Estes dados foram confirmados posteriormente por um estudo multicêntrico realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores (Kitamura *et al.*, 2010).

O IGF participa da organogênese e crescimento durante a embriogênese (Lee *et al.*, 2010), assim como estimula proliferação de células fibroblásticas (Dereka *et al.*, 2006). O IGF-1 demonstrou estimular a proliferação de cementoblastos *in vitro* e a expressão do gene da sialoproteína óssea (BSP) nestas células após 72 horas (Saygin *et al.*, 2000). O IGF-1 demonstrou também estimular a proliferação de fibroblastos do ligamento periodontal, mas não afetou na adesão, migração e expressão de colágeno tipo I nestas células (Palioto *et al.*, 2004), o que sugere que o IGF tem efeito limitado na regeneração periodontal (Dereka *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2010).

O TGF- β demonstrou estimular a produção de matriz extracelular e age como quimiotático para células ósseas (Dereka *et al.*, 2006), fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal (Nishimura & Terranova, 1996). O TGF- β 1 demonstrou aumentar adesão celular dos fibroblastos do ligamento periodontal humano *in vitro* (Rodrigues *et al.*, 2007).

Ainda dentro da superfamília do TGF- β , a BMP tem recebido especial atenção, devido seu potencial em estimular células progenitoras a se diferenciarem em células de linhagem osteoblástica (King, 2001), tendo papel essencial na formação, manutenção e reparo do tecido ósseo, além da estimulação da formação de novo cemento (Talwar *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010). Diversos tipos de BMP já foram identificados e avaliados quanto ao potencial para a regeneração óssea e periodontal, especialmente a BMP-2 (Wikesjö *et al.*, 1999; Talwar *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2003) e BMP-7 (Jin *et al.*, 2003a).

2.2.4. Interação entre os elementos da engenharia tecidual

A interação entre os elementos da engenharia tecidual é essencial para a criação de ambiente favorável para que a regeneração possa ocorrer. Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar qual o efeito da combinação destes fatores na formação dos tecidos periodontais, tanto em animais experimentais como em estudos em humanos.

Para a aplicação da terapia celular, diversos estudos têm investigado a capacidade de células obtidas de ligamento periodontal, cultivadas e carreadas em arcabouços, na regeneração do periodonto *in vivo* (Nakahara *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Ishikawa *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010). Nakahara *et al.* (2004) produziram defeitos tipo fenestração em cães *beagle* e avaliaram o potencial de células derivadas do ligamento periodontal carreadas em arcabouço de colágeno na regeneração dos tecidos periodontais nestes defeitos. Os autores observaram que, nos sítios onde o arcabouço de colágeno associado às células foi implantado, houve formação uniforme de cemento ao longo da superfície radicular, enquanto nos sítios controle (sem arcabouço nem célula), a formação de cemento limitou-se à porção apical do defeito.

Já o potencial de células indiferenciadas do ligamento periodontal em regenerar defeitos periodontais experimentais em *mini-pigs* foi avaliado por Liu *et al.* (2008). Neste estudo, defeitos periodontais foram criados em porcos e aleatoriamente divididos em três grupos: controle (defeitos sem tratamento); HA/TCP (defeitos submetidos à cirurgia a retalho, implantação de arcabouço de hidroxiapatita e tricálciofosfato e membrana de gelatina); e PDLSC (defeitos submetidos à cirurgia a retalho, implantação de arcabouço de hidroxiapatita e tricálciofosfato contendo células indiferenciadas e membrana de gelatina). Doze semanas após as cirurgias, os porcos foram avaliados clinicamente e, em seguida, sacrificados para que espécimes fossem submetidos à avaliação histológica. Clinicamente, observou-se melhoria dos parâmetros como profundidade de sondagem e nível de inserção clínica do grupo PDLSC em relação aos demais grupos; histologicamente, observou-se no grupo PDLSC a formação de novo cemento e osso alveolar e formação de fibras de Sharpey ancoradas, sendo que a altura de osso alveolar formada foi significativamente maior no grupo PDLSC do que nos demais.

Zhao *et al.* (2004) avaliaram o potencial de cementoblastos e de células do folículo dental carreados em arcabouço sintético de PLGA em regenerar os tecidos periodontais em ratos. Estes autores observaram que, nos defeitos onde cementoblastos foram carreados em PGLA, houve maior preenchimento do defeito com tecido mineralizado do que no grupo controle (defeito preenchido apenas com PGLA) e grupo onde células do folículo dental foram carreadas em PGLA. Contudo, observou-se também a formação de tumor na porção superficial dos defeitos onde os cementoblastos foram implantados, sendo o ocorrido relacionado ao fato de que estes cementoblastos eram imortalizados.

Suaid *et al.* (2011) avaliaram o potencial de células derivadas do ligamento periodontal carreadas em arcabouço de colágeno e associadas com técnica de RTG em

regenerar lesões de furca grau II em cães *beagle*. Os autores observaram que no local onde as células foram implantadas, houve maior extensão de cemento e regeneração periodontal, assim como maior área de novo osso formado, enquanto nos sítios onde as células não foram implantadas houve maior cicatrização por tecido epitelial/conjuntivo e menor área de formação óssea de forma estatisticamente significativa.

Em estudo clínico, Feng *et al.* (2010) relataram a capacidade de células do ligamento periodontal humano em melhorar parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, recessão gengival e nível clínico de inserção. Os autores obtiveram células a partir do ligamento periodontal de terceiros molares de três pacientes voluntários, as cultivaram *in vitro*, semearam em um arcabouço de hidroxiapatita/tricalciofosfato (HA/TCP) e implantaram o conjunto das células autólogas juntamente com o arcabouço em defeitos periodontais destes pacientes. Os pacientes apresentaram melhoria nos parâmetros clínicos avaliados, como redução da profundidade de sondagem e ganho de inserção, durante o período de avaliação que variou entre 32 a 72 meses.

A incorporação de fatores de crescimento nos arcabouços para serem libertados de maneira controlada durante a biodegradação do arcabouço também tem sido investigada (Talwar *et al.*, 2001; Nakahara *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009a), devido ao fato de os fatores de crescimento apresentar meia-vida curta e a pobre retenção na ferida quando aplicados diretamente, fazendo com que seus efeitos para a regeneração dos tecidos sejam minimizados, levando a resultados imprevisíveis (Tabata *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007a). No estudo de Nakahara *et al.* (2003), defeitos periodontais de três paredes foram confeccionados em caninos de cães *beagle* para avaliar o potencial regenerativo de uma esponja de colágeno com micro-esferas de gelatina contendo 100 µg de FGF-2. Após 4 semanas, observou-se que, nos defeitos tratados com esponja de colágeno contendo micro-esferas com FGF-2, houve formação de cemento com fibras colágenas perpendicularmente inseridas, enquanto que nos defeitos tratados com esponja de colágeno e micro-esferas sem FGF-2, não houve formação de cemento e a formação de osso foi limitada às margens do defeito ósseo. O FGF-2 também foi avaliado em combinação com o β -TCP na regeneração de defeitos periodontais de uma parede em cães *beagles*, sendo demonstrado, por meio de avaliação histológica 6 semanas após a aplicação dos materiais, que nos defeitos preenchidos com FGF-2 em combinação com o β -TCP, a extensão de ligamento periodontal e cemento regenerado, assim como a altura e área de novo osso formado, foi significativamente maior do que nos defeitos preenchidos apenas com β -TCP, sem FGF-2 (Anzai *et al.*, 2010).

A BMP-2 recombinante humana (rhBMP-2) em concentrações de 0.05, 0.1 e 0.2 mg/mL implantada em de esponja de colágeno foi avaliada quanto ao seu potencial em regenerar osso alveolar e cemento, assim como em causar reabsorção radicular e anquilose em defeitos periodontais críticos supra-alveolares em cães por Wikesjö *et al.* (1999). Neste estudo, após 8 semanas, observou-se histologicamente que, nos defeitos que receberam rhBMP-2 a 0,05, 0,1 e 0,2 mg/mL, houve regeneração óssea do defeito em 86%, 96% e 88% da altura do defeito, respectivamente, e regeneração de cemento compreendendo 6%, 8% e 6% da altura do defeito, respectivamente; já nos defeitos tratados sem rhBMP-2, a regeneração de osso e cemento, quando presente, foi limitada. Entretanto, também se observou reabsorção radicular e anquilose na maioria dos sítios tratados com esponja de colágeno contendo rhBMP-2.

Sigursson *et al.* (1996) avaliaram vários tipos de carreadores para a rhBMP-2, tais como matriz óssea mineralizada alógena e xenógena, esponja de colágeno absorvível, micropartículas e grânulos poliméricos, em defeitos periodontais críticos em cães e observaram que o tipo de carreador pode influenciar tanto a capacidade de formação óssea como a na formação de cemento e presença de anquilose, sendo os melhores resultados associados à matriz óssea mineralizada alógena e xenógena.

Além disso, Talwar *et al.* (2001) demonstraram que a velocidade de liberação do fator de crescimento a partir do carreador pode influenciar sobre o tipo de regeneração periodontal. Neste estudo, arcabouços de gelatina com diferentes ligações cruzadas, que permitiam diferentes velocidades de liberação de BMP-2, foram implantados em defeitos de fenestração em ratos e observou-se que a cinética de liberação pode ter importante efeito na regeneração periodontal, com maior formação de osso quando a BMP-2 foi liberada rapidamente e maior formação de cemento quando a mesma foi liberada lentamente.

A liberação de dois fatores de crescimento a partir de um arcabouço também já foi investigada, onde se observou que BMP-2 e IGF-1 liberadas de forma independente a partir de micro-partículas incorporadas a um arcabouço demonstram aumentar a adesão celular, proliferação e diferenciação osteoblásticas de fibroblastos do ligamento periodontal humano de forma sinérgica em cultura dinâmica (Chen *et al.*, 2009a).

Outra abordagem para superar a meia-vida curta dos fatores de crescimento é por meio da terapia gênica, a qual se baseia na incorporação do gene do fator de crescimento na célula para que esta então passe a produzir o fator desejado (Taba *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007b; Kao *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009).

A introdução do gene no interior da célula pode ser feita por vetores virais (transdução) e não-virais (transfecção) (Nakahara, 2006). Os vetores virais são os mais comumente utilizados e apresentam alta eficiência de transdução, mas podem apresentar efeitos colaterais tais como exacerbada resposta imunológica (Arosarena, 2005; Elangovan *et al.*, 2009). Na abordagem não-viral, plasmídeos são incorporados em micropartículas ou lipossomos, e, apesar menor eficiência, tem a vantagem de ter menor custo e menor risco de mutagênese (Zhang *et al.*, 2007b; Elangovan *et al.*, 2009). Em estudo buscando-se comparar vetores virais e não-virais para o gene TGF- β 1 incorporados em arcabouços, observou-se que, no grupo de arcabouços de contendo vetor viral, houve maior proliferação de células do ligamento periodontal humano e expressão de colágeno tipo I e III *in vitro*, além de maior marcação imunohistoquímica para TGF- β 1 nos arcabouços com vetores virais após 2 semana de implantação subcutânea em camundongos (Zhang *et al.*, 2006).

A incorporação do gene na célula pode ser feita tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Na incorporação *in vivo*, o vetor é diretamente implantado na área da ferida, permitindo a transfecção/transdução (Nakahara, 2006) das células localmente (Arosarena, 2005; Taba *et al.*, 2005; Kao *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009). Na incorporação *in vitro*, células são cultivadas e transfectadas/transduzidas em laboratório e, em seguida, implantadas na área a ser regenerada (Murphy & Mooney, 1999; Taba *et al.*, 2005; Nakahara, 2006; Peng *et al.*, 2009), o que parece reduzir o espalhamento dos vetores para outros tecidos (Arosarena, 2005) e evitar a intensa resposta imune como aquela causada pela implantação direta de adenovírus *in vivo* (Zhang *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007b).

Estudos avaliando arcabouços de coral (Zhang *et al.*, 2007b) ou colágeno (Peng *et al.*, 2009) contendo plasmídeos codificantes de PDGF encapsulados em quitosana demonstraram que células do ligamento periodontal transfectadas *in vitro* apresentaram maior proliferação e expressão de PDGF *in vitro* do que as células cultivadas nos arcabouços sem vetores.

A terapia gênica utilizando-se de adenovírus codificando PDGF-B, carregados em arcabouço de colágeno, para transdução *in vivo* também tem demonstrado aumentar a formação de osso e de cimento quando aplicada em defeitos alveolares adjacente a dente em ratos (Jin *et al.*, 2004) sem causar alterações hematológicas ou sistêmicas significativas nos animais avaliados (Chang *et al.*, 2009).

Adenovírus também foram utilizados para transdução fibroblastos *in vitro* para produzir BMP-7 e, em seguida, as células transduzidas foram carregadas em arcabouço de

gelatina para defeitos periodontais criando em ratos (Jin *et al.*, 2003a). Após 35 dias da implantação das células transduzidas, os animais foram sacrificados e observou-se que os defeitos tratados com células transduzidas com o gene da BMP-7 apresentavam maior formação de osso e cimento que os defeitos com células não transduzidas.

A expressão de duas moléculas sinalizadoras (BMP-7 e IGF-1) por células do ligamento periodontal humano transduzidas por adenovírus *in vitro* já foi investigada e demonstrou atuar sinergicamente aumentando a atividade de ALP e a expressão de colágeno tipo I e do Runx2, o qual é um fator de transcrição primário para diferenciação osteoblástica, além de promover maior formação de estrutura semelhante a osso nos arcabouços de quitosana/colágeno contendo células transduzidas com as duas moléculas do que nos arcabouços com células transduzidas apenas com BMP-7 quando implantados subcutaneamente em camundongos (Yang *et al.*, 2010).

3. DISCUSSÃO

A determinação dos elementos ideais na engenharia tecidual para proporcionar um ambiente ótimo para a regeneração periodontal significativa e previsível tem se mostrado bastante complexa, uma vez que, mesmo dentro de cada um dos elementos-chaves da engenharia tecidual, diversas variáveis devem ser levadas em consideração, tais como tipo celular, material e arquitetura do arcabouço, moléculas sinalizadoras, sua concentração e forma de liberação, entre outros, o que leva à necessidade investigação destes diversos fatores que podem influenciar no processo regenerativo.

Dentre os elementos da engenharia tecidual, aquele que é investigado há mais tempo são os arcabouços, pois diversos biomateriais já foram avaliados como candidatos a substitutos ósseos. Contudo, como abordado anteriormente, os arcabouços destinados à engenharia tecidual devem permitir mais do que a simples manutenção do espaço na ferida cirúrgica, devendo apresentar, além propriedades biomecânicas, propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, e até mesmo permitir a liberação de moléculas sinalizadoras, a fim de estimular o processo regenerativo. Neste sentido, os estudos demonstram que os arcabouços fabricados pela combinação de materiais, também chamados de compósitos, têm demonstrado superioridade tanto nas propriedades mecânicas (Chesnutt *et al.*, 2009; Cuniffé *et al.*, 2010), quanto biológicas (Zhang *et al.*, 2007c; Chesnutt *et al.*, 2009; Yanagida *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010), em comparação aos arcabouços fabricados apenas com um tipo de material.

Como o processo de cicatrização da ferida é orquestrado por diversos fatores de crescimento, o efeito combinado de moléculas sinalizadoras tem sido investigado a fim de potencializar o estímulo à regeneração. Neste sentido, algumas combinações de moléculas sinalizadoras demonstraram ter efeito sinérgico sobre as células do ligamento periodontal, favorecendo a expressão de fenótipo osteoblástico, como foi observado por Yang *et al.* (2010), ao avaliarem o efeito de células transfectadas para a co-expressão de BMP-7 e IGF-1, e no estudo de Chen *et al.* (2009a), onde se observou a BMP-2 e IGF-1 liberadas de forma a partir de micro-partículas incorporadas a um arcabouço. Contudo, observou-se também que nem todas as combinações de moléculas sinalizadoras agem de forma sinérgica, como relatado pelo estudo de Rodrigues *et al.* (2007), onde se observou que TGF- β 1 aumentou a adesão das células do ligamento periodontal enquanto a EMD aumentou a proliferação, migração celular e síntese de proteínas totais, mas a sua combinação não influenciou positivamente as células em comparação ao uso isolado de cada uma delas.

Para que a regeneração dos diversos tecidos que compreendem o periodonto possa ocorrer, é necessário que um microambiente favorável seja estabelecido através da presença de células apropriadas que interajam com a matriz extracelular e as moléculas sinalizadoras, a fim de que a diferenciação tecidual seja dirigida de forma controlada. Diante disto, a combinação dos elementos-chave da engenharia tecidual tem demonstrado melhores resultados do que o efeito destes elementos isoladamente, como demonstrados pelos estudos comparando o efeito do arcabouço isoladamente *versus* o efeito da associação de células com arcabouços (Zhao *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008) ou o efeito do arcabouço isoladamente *versus* o efeito de moléculas sinalizadoras associadas com arcabouços (Wikesjö *et al.*, 1999; Nakahara *et al.*, 2003; Kitamura *et al.*, 2008; Anzai *et al.*, 2010; Kitamura *et al.*, 2010); assim como a utilização de terapia gênica para a produção de moléculas sinalizadoras pelas células transfectadas tem demonstrado melhores resultados do que quando a terapia gênica não é aplicada (Jin *et al.*, 2003a; Jin *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007b; Peng *et al.*, 2009).

4. CONCLUSÃO

Diversas pesquisas têm sido realizadas em busca de fatores que estimulem a regeneração do periodonto, tendo-se observado resultados promissores pela utilização de técnicas baseadas na engenharia tecidual. A combinação entre os elementos da engenharia tecidual, ou seja, células, arcabouços e moléculas sinalizadoras, tem demonstrado melhores resultados do que a utilização destes elementos isoladamente. Contudo, a combinação ideal ainda não foi definida, sendo que mais estudos para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de regeneração são necessários para embasar o desenvolvimento de abordagens de engenharia tecidual que possam ser aplicadas com segurança nos procedimentos clínicos, levando a resultados satisfatórios de forma mais previsíveis.

REFERÊNCIAS*

- Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. **J Periodontol**. 2008; 79(3): 387-93.
- Anzai J, Kitamura M, Nozaki T, Nagayasu T, Terashima A, Asano T, *et al*. Effects of concomitant use of fibroblast growth factor (FGF)-2 with beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) on the beagle dog 1-wall periodontal defect model. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010; 403(3-4): 345-50.
- Arosarena O. Tissue engineering. **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg**. 2005; 13(4): 233-41.
- Barbanti SH, Santos AR, Jr., Zavaglia CA, Duek EA. Porous and dense poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds: in vitro degradation in culture medium and osteoblasts culture. **J Mater Sci Mater Med**. 2004; 15(12): 1315-21.
- 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, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration. **Periodontol** 2000. 2006; 41): 123-35.
- Benatti BB, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. **J Biosci Bioeng**. 2007; 103(1): 1-6.
- Botchwey EA, Dupree MA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Tissue engineered bone: measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. **J Biomed Mater Res A**. 2003; 67(1): 357-67.
- Boyan LA, Bhargava G, Nishimura F, Orman R, Price R, Terranova VP. Mitogenic and chemotactic responses of human periodontal ligament cells to the different isoforms of platelet-derived growth factor. **J Dent Res**. 1994; 73(10): 1593-600.
- Buurma B, Gu K, Rutherford RB. Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds. **Eur J Oral Sci**. 1999; 107(4): 282-9.
- Chang PC, Cirelli JA, Jin Q, Seol YJ, Sugai JV, D'Silva NJ, *et al*. Adenovirus encoding human platelet-derived growth factor-B delivered to alveolar bone defects exhibits safety and biodistribution profiles favorable for clinical use. **Hum Gene Ther**. 2009; 20(5): 486-96.
- Chen FM, Chen R, Wang XJ, Sun HH, Wu ZF. In vitro cellular responses to scaffolds containing two microencapsulated growth factors. **Biomaterials**. 2009a; 30(28): 5215-24.
- Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. **Tissue Eng Part B Rev**. 2010; 16(2): 219-55.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseado no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Chen FM, Shelton RM, Jin Y, Chapple IL. Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives. **Med Res Rev.** 2009b; 29(3): 472-513.
- Chen FM, Zhang J, Zhang M, An Y, Chen F, Wu ZF. A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. **Biomaterials.** 2010; 31(31): 7892-927.
- Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, Guda T, Appleford MR, *et al.* Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. **J Biomed Mater Res A.** 2009; 88(2): 491-502.
- Chou AM, Sae-Lim V, Huttmacher DW, Lim TM. Tissue engineering of a periodontal ligament-alveolar bone graft construct. **Int J Oral Maxillofac Implants.** 2006; 21(4): 526-34.
- Cunniffe GM, Dickson GR, Partap S, Stanton KT, O'Brien FJ. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med.** 2010; 21(8): 2293-8.
- Dangaria SJ, Ito Y, Walker C, Druzinsky R, Luan X, Diekwisch TG. Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells. **Differentiation.** 2009; 78(2-3): 79-90.
- Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. **Growth Factors.** 2006; 24(4): 260-7.
- Elangovan S, Srinivasan S, Ayilavarapu S. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. **Expert Opin Biol Ther.** 2009; 9(4): 399-410.
- Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. **Cochrane Database Syst Rev.** 2005; (4): CD003875.
- 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(1): 20-8.
- Frank RM, Klewansky P, Hemmerle J, Tenenbaum H. Ultrastructural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions. **J Clin Periodontol.** 1991; 18(9): 669-80.
- Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobic M, Vunjak-Novakovic G. Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. **Curr Stem Cell Res Ther.** 2008; 3(4): 254-64.
- Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. **Orthod Craniofac Res.** 2007; 10(3): 149-60.
- Gercek I, Tigli RS, Gumusderelioglu M. A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying. **J Biomed Mater Res A.** 2008; 86(4): 1012-22.

Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. **J Clin Periodontol**. 1997; 24(9 Pt 2): 658-68.

Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. **J Biomater Sci Polym Ed**. 2001; 12(1): 107-24.

Hutmacher DW, Cool S. Concepts of scaffold-based tissue engineering--the rationale to use solid free-form fabrication techniques. **J Cell Mol Med**. 2007; 11(4): 654-69.

Ishikawa I, Iwata T, Washio K, Okano T, Nagasawa T, Iwasaki K, *et al*. Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration. **Periodontol** 2000. 2009; 51): 220-38.

Ivanovski S. Periodontal regeneration. **Aust Dent J**. 2009; 54 Suppl 1): S118-28.

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. **Oral Dis**. 2006; 12(4): 358-63.

Jin Q, Anusaksathien O, Webb SA, Printz MA, Giannobile WV. Engineering of tooth-supporting structures by delivery of PDGF gene therapy vectors. **Mol Ther**. 2004; 9(4): 519-26.

Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. **J Periodontol**. 2003a; 74(2): 202-13.

Jin QM, Zhao M, Webb SA, Berry JE, Somerman MJ, Giannobile WV. Cementum engineering with three-dimensional polymer scaffolds. **J Biomed Mater Res A**. 2003b; 67(1): 54-60.

Kao RT, Murakami S, Beirne OR. The use of biologic mediators and tissue engineering in dentistry. **Periodontol** 2000. 2009; 50): 127-53.

King GN. The importance of drug delivery to optimize the effects of bone morphogenetic proteins during periodontal regeneration. **Curr Pharm Biotechnol**. 2001; 2(2): 131-42.

Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, *et al*. FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multi-center randomized clinical trial. **J Dent Res**. 2010; 90(1): 35-40.

Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, *et al*. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2: randomized controlled phase II clinical trial. **PLoS One**. 2008; 3(7): e2611.

Lee J, Stavropoulos A, Susin C, Wikesjo UM. Periodontal regeneration: focus on growth and differentiation factors. **Dent Clin North Am**. 2010; 54(1): 93-111.

Liao F, Chen Y, Li Z, Wang Y, Shi B, Gong Z, *et al.* A novel bioactive three-dimensional beta-tricalcium phosphate/chitosan scaffold for periodontal tissue engineering. **J Mater Sci Mater Med.** 2010; 21(2): 489-96.

Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. **Aust Dent J.** 2008; 53(2): 108-21.

Lin NH, Gronthos S, Mark Bartold P. Stem cells and future periodontal regeneration. **Periodontol 2000.** 2009; 51): 239-51.

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(4): 1065-73.

Lynch SE, Wisner-Lynch L, Nevins M, Nevins ML. A new era in periodontal and periimplant regeneration: use of growth-factor enhanced matrices incorporating rhPDGF. **Compend Contin Educ Dent.** 2006; 27(12): 672-8; quiz 679-80.

Magnusson I, Claffey N, Bogle G, Garrett S, Egelberg J. Root resorption following periodontal flap procedures in monkeys. **J Periodontal Res.** 1985; 20(1): 79-85.

Mariotti A. Efficacy of chemical root surface modifiers in the treatment of periodontal disease. A systematic review. **Ann Periodontol.** 2003; 8(1): 205-26.

McKay WF, Peckham SM, Badura JM. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). **Int Orthop.** 2007; 31(6): 729-34.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. **J Periodontol.** 1976; 47(5): 256-60.

Moskow BS, Karsh F, Stein SD. Histological assessment of autogenous bone graft. A case report and critical evaluation. **J Periodontol.** 1979; 50(6): 291-300.

Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, *et al.* Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. **J Periodontal Res.** 1999; 34(7): 425-30.

Murphy WL, Mooney DJ. Controlled delivery of inductive proteins, plasmid DNA and cells from tissue engineering matrices. **J Periodontal Res.** 1999; 34(7): 413-9.

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, *et al.* Stem cell properties of human periodontal ligament cells. **J Periodontal Res.** 2006; 41(4): 303-10.

Nakahara T. A review of new developments in tissue engineering therapy for periodontitis. **Dent Clin North Am.** 2006; 50(2): 265-76, ix-x.

Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Inoue M, Shigeno K, Tabata Y, *et al.* Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane. **Tissue Eng.** 2003; 9(1): 153-62.

Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, Kuremoto 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(3-4): 537-44.

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. **J Periodontol.** 2003; 74(9): 1282-92.

Nishimura F, Terranova VP. Comparative study of the chemotactic responses of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts to polypeptide growth factors. **J Dent Res.** 1996; 75(4): 986-92.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. **J Clin Periodontol.** 1982a; 9(3): 257-65.

Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. **J Clin Periodontol.** 1982b; 9(4): 290-6.

Oi Y, Ota M, Yamamoto S, Shibukawa Y, Yamada S. Beta-tricalcium phosphate and basic fibroblast growth factor combination enhances periodontal regeneration in intrabony defects in dogs. **Dent Mater J.** 2009; 28(2): 162-9.

Palioto DB, Coletta RD, Graner E, Joly JC, de Lima AF. The influence of enamel matrix derivative associated with insulin-like growth factor-I on periodontal ligament fibroblasts. **J Periodontol.** 2004; 75(4): 498-504.

Peng L, Cheng X, Zhuo R, Lan J, Wang Y, Shi B, *et al.* Novel gene-activated matrix with embedded chitosan/plasmid DNA nanoparticles encoding PDGF for periodontal tissue engineering. **J Biomed Mater Res A.** 2009; 90(2): 564-76.

Polson AM, Proye MP. Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. **J Clin Periodontol.** 1982; 9(6): 441-54.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. **Ann Periodontol.** 2003; 8(1): 227-65.

Ripamonti U, Parak R, Petit JC. Induction of cementogenesis and periodontal ligament regeneration by recombinant human transforming growth factor-beta3 in Matrigel with rectus abdominis responding cells. **J Periodontal Res.** 2009; 44(1): 81-7.

Rodrigues TL, Marchesan JT, Coletta RD, Novaes AB, Jr., Grisi MF, Souza SL, *et al.* Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor-beta1 on human periodontal ligament fibroblasts. **J Clin Periodontol.** 2007; 34(6): 514-22.

Saito E, Saito A, Kawanami M. Favorable healing following space creation in rhBMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. **J Periodontol.** 2003; 74(12): 1808-15.

- Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. **J Periodontol**. 2000; 71(10): 1591-600.
- Scheller EL, Krebsbach PH, Kohn DH. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. **J Oral Rehabil**. 2009; 36(5): 368-89.
- 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(9429): 149-55.
- Shea LD, Wang D, Franceschi RT, Mooney DJ. Engineered bone development from a pre-osteoblast cell line on three-dimensional scaffolds. **Tissue Eng**. 2000; 6(6): 605-17.
- Shors EC. Coralline bone graft substitutes. **Orthop Clin North Am**. 1999; 30(4): 599-613.
- Sigurdsson TJ, Nygaard L, Tatakis DN, Fu E, Turek TJ, Jin L, *et al*. Periodontal repair in dogs: evaluation of rhBMP-2 carriers. **Int J Periodontics Restorative Dent**. 1996; 16(6): 524-37.
- Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. **J Biomed Mater Res**. 2002; 62(1): 136-48.
- Silverio KG, Rodrigues TL, Coletta RD, Benevides L, Da Silva JS, Casati MZ, *et al*. Mesenchymal Stem Cell Properties of Periodontal Ligament Cells From Deciduous and Permanent Teeth. **J Periodontol**. 2010.
- Suaid FF, Ribeiro FV, Rodrigues TL, Silverio KG, Carvalho MD, Nociti FH, Jr., *et al*. Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class II furcation defects: a study in dogs. **J Clin Periodontol**. 2011.
- Taba M, Jr., Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. **Orthod Craniofac Res**. 2005; 8(4): 292-302.
- Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. **J Clin Periodontol**. 2001; 28(4): 340-7.
- Um YJ, Jung UW, Chae GJ, Kim CS, Lee YK, Cho KS, *et al*. The effects of hydroxyapatite/calcium phosphate glass scaffold and its surface modification with bovine serum albumin on 1-wall intrabony defects of beagle dogs: a preliminary study. **Biomed Mater**. 2008; 3(4): 044113.
- van Eeden SP, Ripamonti U. Bone differentiation in porous hydroxyapatite in baboons is regulated by the geometry of the substratum: implications for reconstructive craniofacial surgery. **Plast Reconstr Surg**. 1994; 93(5): 959-66.
- Wikesjö UM, Guglielmoni P, Promsudthi A, Cho KS, Trombelli L, Selvig KA, *et al*. Periodontal repair in dogs: effect of rhBMP-2 concentration on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment. **J Clin Periodontol**. 1999; 26(6): 392-400.

Wu YC, Lee TM, Chiu KH, Shaw SY, Yang CY. A comparative study of the physical and mechanical properties of three natural corals based on the criteria for bone-tissue engineering scaffolds. **J Mater Sci Mater Med**. 2009; 20(6): 1273-80.

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**. 2006; 26(4): 363-9.

Yanagida H, Okada M, Masuda M, Ueki M, Narama I, Kitao S, *et al*. Cell adhesion and tissue response to hydroxyapatite nanocrystal-coated poly(L-lactic acid) fabric. **J Biosci Bioeng**. 2009; 108(3): 235-43.

Yang C, Hillas PJ, Baez JA, Nokelainen M, Balan J, Tang J, *et al*. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. **BioDrugs**. 2004; 18(2): 103-19.

Yang L, Zhang Y, Dong R, Peng L, Liu X, Wang Y, *et al*. Effects of adenoviral-mediated coexpression of bone morphogenetic protein-7 and insulin-like growth factor-1 on human periodontal ligament cells. **J Periodontal Res**. 2010; 45(5): 532-40.

Zhang Y, Cheng X, Wang J, Wang Y, Shi B, Huang C, *et al*. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor-beta1 DNA for periodontal tissue engineering. **Biochem Biophys Res Commun**. 2006; 344(1): 362-9.

Zhang Y, Song J, Shi B, Wang Y, Chen X, Huang C, *et al*. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects. **Biomaterials**. 2007a; 28(31): 4635-42.

Zhang Y, Wang Y, Shi B, Cheng X. A platelet-derived growth factor releasing chitosan/coral composite scaffold for periodontal tissue engineering. **Biomaterials**. 2007b; 28(8): 1515-22.

Zhang YF, Cheng XR, Chen Y, Shi B, Chen XH, Xu DX, *et al*. Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue. **J Biomater Appl**. 2007c; 21(4): 333-49.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH, Jr., Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. **J Periodontol**. 2004; 75(1): 154-61.