

Identificação de células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal e perspectivas na regeneração periodontal: Revisão de literatura

Identification of mesenchymal stem cells in the periodontal ligament and perspectives for periodontal regeneration: Literature review

Luciana Bastos Alves¹, Ruthinéia Diógenes Alves Uchôa Lins², Carlos Augusto Galvão Barboza³

¹ Mestre em Odontologia/Periodontia (UFRN); Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP).

² Especialista em Periodontia e Doutora em Patologia Oral (UFRN); Professora Adjunta de Periodontia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

³ Doutor em Patologia Bucal (USP); Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Descritores:

Células-tronco. Ligamento Periodontal. Regeneração.

Resumo

A busca por novas terapias com o intuito de restaurar a integridade estrutural do periodonto, destruído pela progressão da doença periodontal, tem ganhado novas perspectivas com os avanços das pesquisas com células-tronco e a bioengenharia tecidual. Além do embrião, as células-tronco também são encontradas em vários órgãos e tecidos do indivíduo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células devido à renovação fisiológica e abrindo novas perspectivas para a regeneração e recuperação de tecidos e órgãos. Tais populações celulares, ou células-tronco adultas têm sido facilmente identificadas pela sua morfologia e localização em alguns tecidos. A ideia de que estas células estão presentes no ligamento periodontal é baseada na capacidade reparadora destas células, uma vez que podem se diferenciar em osteoblastos, cemento-blastos, fibroblastos e componentes do tecido conjuntivo. Esta revisão de literatura tem como objetivo elucidar a identificação de células-tronco no ligamento periodontal, tendo em vista o interesse no potencial regenerativo dessas células e na sua aplicabilidade na regeneração periodontal.

Keywords:

Stem Cells. Periodontal Ligament. Regeneration.

Abstract

The search for new therapies to restore the structural integrity of the periodontium, destroyed by the progression of periodontal disease, has gained new perspectives with the advance in stem cell research and tissue bioengineering. In addition to the embryo, stem cells are also found in various organs and tissues of adult individuals, where they take part in tissue homeostasis, generating new cells owing to physiological renewal and opening new perspectives for regenerating and recovering tissues and organs. These cell populations or adult stem cells have been easily identified by their morphology and location in a the of tissues. The idea that these cells are present in the periodontal ligament is based on the repairing capacity of these cells, given that they can be differentiated in osteoblasts, cementoblasts, fibroblasts and conjunctive tissue components. This literature review aims to discuss the identifying of stem cells in the periodontal ligament, in light of the interest in the regenerative potential of these cells and in their applicability for periodontal regeneration.

Endereço para correspondência:

Carlos Augusto Galvão Barboza
Av. Salgado Filho, 3000 – Campus Universitário - CEP: 59072-970 Natal / RN - Brasil
Tel/fax: (84) 3211-9207
E-mail: cbarboza@cb.ufrn.br

INTRODUÇÃO

O reparo do aparato de inserção e sustentação do periodonto, destruído como resultado da progressão da doença periodontal, tem sido a meta principal da terapia periodontal. A regeneração periodontal busca a neoformação do cemento e do osso alveolar, além da nova inserção e reinserção das fibras do ligamento periodontal ao novo cemento e, por conseguinte, à superfície radicular².

Desde a década de 70, inúmeras técnicas têm sido utilizadas a fim de interromper a progressão da doença periodontal e obter a reconstrução da arquitetura e da função

das estruturas de suporte perdidas. A terapia periodontal inclui raspagem e alisamento radicular; cirurgias para descontaminação e biomodificação da superfície radicular; enxertos, utilizando substitutos ósseos, biomateriais e fatores de crescimento e a técnica da regeneração tecidual guiada (RTG), de acordo com os relatos de Polimeni, Xiropaidis e Wikesjo²⁵. Entretanto, essas terapias são limitadas pela severidade da doença periodontal bem como pelo tipo de defeito resultante e por fatores locais e sistêmicos, dentre outros.

Portanto, na busca por novas terapias de reconstrução do periodonto destruído pela doença periodontal, recentes

técnicas de engenharia tecidual, baseadas na biologia de células-tronco ou bioengenharia, têm sido propostas^{7,12,22}.

As células mesenquimais indiferenciadas, ou células-tronco como são conhecidas, têm sido objetos de várias pesquisas recentes, sendo tratadas por pesquisadores e diversos profissionais da área da saúde como um importante artifício para combater múltiplas doenças, principalmente aquelas que desafiam a ciência há muito tempo. O destaque para a utilização das células-tronco é atribuído a sua capacidade de autorrenovação e de diferenciação em vários tipos celulares, de acordo com o estímulo recebido, conforme revelam Kolya e Castanho⁴⁶.

Há duas categorias de células-tronco: as células-tronco embrionárias pluripotentes, que são procedentes do embrião durante a fase de blástula do embrião e que são capazes de dar origem a todas as linhagens celulares do corpo e a categoria de células unipotentes ou multipotentes, denominadas células-tronco adultas, que têm a capacidade de originar tipos celulares específicos³⁶.

A maior vantagem do uso de células-tronco embrionárias é a sua capacidade de proliferação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Contudo, existem desvantagens, como a sua instabilidade genética, a obrigatoriedade de sua transplantação para hospedeiros imunocomprometidos e o risco de formação de teratocarcinomas, além da questão ética. Já as células-tronco adultas apresentam a vantagem de serem autogênicas, não incorrendo em limitações morais e responsivas aos fatores de crescimento inerentes ao hospedeiro³⁵.

Uma das características mais importantes das células-tronco adultas é o fato de que podem ser expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas (plasticidade), o que têm aumentado o interesse neste tipo celular nos últimos anos, devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados^{4,24,26,31}.

Existem várias fontes de células-tronco adultas, tais como: a medula óssea, o sangue, a córnea e a retina, o cordão umbilical, o fígado, a pele, o trato gastrointestinal e o pâncreas³³. Recentemente inúmeros estudos têm isolado células mesenquimais indiferenciadas, derivadas dos tecidos orais, incluindo a polpa dentária^{9,10,20,29,30,34} e o ligamento periodontal^{1,5,12,21,27}.

Diante deste contexto, o objetivo do presente estudo foi o de realizar uma revisão de literatura acerca da identificação das células-tronco mesenquimais no ligamento periodontal, tendo em vista o interesse no potencial regenerativo dessas células e em relação a sua aplicabilidade na regeneração dos tecidos periodontais.

REVISÃO DA LITERATURA

O conceito de que as células mesenquimais indiferenciadas podem estar presentes no ligamento periodontal foi inicialmente proposto por Melcher⁴⁹ em 1976, o qual observou que estas células presentes no ligamento periodontal eram capazes de formar fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos. A partir de então, a capacidade regeneradora das células do ligamento periodontal tem sido pesquisada através de vários estudos³.

Seo et al.²⁷ levantaram a hipótese de que o ligamento periodontal pode conter células indiferenciadas multipotentes, que podem ser usadas para regenerar o cimento e o ligamento periodontal *in vivo*. Os autores isolaram células do ligamento periodontal de terceiros molares extraídos de humanos e analisaram-nas através da técnica de imunohistoquímica, para identificar marcadores de células-tronco.

Quando transplantadas em ratos imunocomprometidos, as referidas células mostraram a capacidade de formar estruturas, como cimento e ligamento, e assim contribuir para o reparo tecidual periodontal. Os resultados desta pesquisa mostraram que as células do ligamento periodontal expressaram os marcadores de células-tronco mesenquimais: STRO-1 e CD146/MUC18 e, em condições de cultura, diferenciaram-se em cementoblastos, adipócitos e fibroblastos.

Vários antígenos de superfície celular têm sido usados como marcadores para células-tronco e são importantes para isolar essas células de outros tecidos. Chen et al.⁵ realizaram um estudo com o objetivo de identificar e localizar células indiferenciadas no ligamento periodontal humano sadio e doente, usando marcadores de superfície celular para células mesenquimais (STRO-1, CD146 e CD44). Dentes afetados pela doença periodontal e sadios foram coletados, fixados em formal a 10%, descalcificados e embebidos em parafina para análise imunohistoquímica. Anticorpos contra STRO-1, CD146 e CD44 foram usados para identificar células-tronco no ligamento periodontal. Os resultados mostraram que as células mesenquimais indiferenciadas foram identificadas tanto no ligamento periodontal sadio quanto no ligamento periodontal doente.

Akizuki et al.¹, em um estudo piloto, isolaram e cultivaram células do ligamento periodontal de pré-molares extraídos de cães e, posteriormente, aplicaram essas células juntamente com um condutor de ácido hialurônico em cinco defeitos ósseos produzidos cirurgicamente nas superfícies mesiais das raízes dos primeiros molares mandibulares de uma hemi-arcada de cada cão. A outra hemi-arcada foi usada como grupo controle, em que foram criados os mesmos defeitos e neles aplicados, apenas, o condutor de ácido hialurônico. Após oito semanas, os animais foram sacrificados, e os espécimes, preparados a fim de avaliar histologicamente e histometricamente a cicatrização dos defeitos periodontais. Os resultados mostraram ausência de inflamação clínica ou recessão gengival em ambos os lados. No grupo experimental, foi observada a cicatrização periodontal com formação de osso, ligamento periodontal e cimento em três dos cinco defeitos, e, no grupo controle, não foi constatada a formação de tecido periodontal, exceto em, apenas, um defeito. A análise histométrica revelou que a formação de novo cimento no grupo experimental foi altamente significativa quando comparada à do grupo controle. Os autores concluíram que as células do ligamento periodontal têm o potencial de promover regeneração tecidual, sendo assim de grande importância para a terapia regenerativa.

Nagatomo et al.²¹ isolaram células do ligamento periodontal de pré-molares e terceiros molares extraídos de humanos, a fim de verificar as propriedades de renovação, multiplicação e expressão de marcadores dessas células. A análise de fluorescência ativada revelou que essas células expressaram os marcadores de células-tronco CD105, CD166, e STRO-1. Tais resultados sugerem que as células do ligamento periodontal incluem células-tronco mesenquimais juntamente com outras células progenitoras.

Gronthos et al.⁹ demonstraram que as células mesenquimais da polpa dentária expressavam a molécula de adesão celular CD106 (VCAM-1). Em 2003, Gronthos et al.¹¹ observaram que esta mesma molécula CD106 (VCAM-1) era também expressa nas células-tronco da medula óssea. Em 2006, pesquisadores do mesmo grupo¹² usaram uma estratégia de imunoseleção para purificar as células mesenquimais clonogênicas do ligamento periodontal de ovinos, baseada na reatividade ao anticorpo que identifica o CD106. A positividade para o antígeno CD106 das células do ligamento periodontal de ovinos demonstrou a capacidade

de de estas formarem um agregado de células semelhantes a fibroblastos quando manipuladas em baixa densidade *in vitro*. A expansão ex-vivo dessas células exibiu um alto grau de proliferação *in vitro*. Além disso, tais células expressaram um fenótipo consistente com o de células mesenquimais do ligamento periodontal de humanos, sendo ele CD44+, CD166+, Cbfa1+, colágeno-I+ e sialoproteína óssea+ e demonstraram a capacidade de regenerarem tanto tecido mineralizado, semelhante ao cimento, quanto ligamento periodontal, quando transplantadas em ratos imunocomprometidos.

Kawanabe, Murakami e Yamamoto¹⁵ observaram que as células mesenquimais do ligamento periodontal exibiam um perfil funcional de células-tronco e expressavam ABCG-2 (um marcador usual de células-tronco) e Oct-4 (um fator crítico transcricional para manutenção da pluripotencialidade), entretanto, somente 3,9% das células do ligamento periodontal cultivadas exibiam tais características.

Gay, Chen e MacDougall⁸ realizaram um estudo em que células do ligamento periodontal de humanos foram isoladas, marcadas para STRO-1 e separadas em meio de cultura, com o objetivo de analisar a sua capacidade de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo. Células da medula óssea foram usadas como controle nas mesmas condições de cultivo e indução. Esses autores concluíram que as células do ligamento periodontal contêm células mesenquimais que apresentam o potencial de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos, semelhantes às células-tronco da medula óssea.

Fujii et al.⁷ isolaram e cultivaram três linhagens celulares (linhas 1-4, 1-11 e 1-24) que expressam os marcadores celulares RUNX-2, colágeno I, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, RANKL, osteoprotegerina, escleraxina, periostina, colágeno XII e RNA mensageiro da alfa actina de músculo liso. A análise histoquímica demonstrou que o marcador celular CD146 foi expresso nas células das linhagens 1-4 e 1-11, e o STRO-1 foi expresso nas linhagens 1-11 e 1-24. As células das linhagens 1-4 e 1-11 se diferenciaram em células osteoblásticas e adipócitos, quando cultivadas em meio de diferenciação de linhagem específica. Quatro semanas depois das células da linhagem 1-11 serem transplantadas em ratos imunodeficientes com fosfato β -tricálcio (β -TCP), o transplante produziu tecidos semelhantes a cimento e osso ao redor do β -TCP. Oito semanas após, as células 1-11 transplantadas formaram estruturas semelhantes ao ligamento periodontal na superfície do β -TCP. Esses resultados sugerem que as células da linhagem 1-11 são derivadas das células progenitoras/ células mesenquimais do ligamento periodontal e podem ser bastante úteis para o estudo da biologia e da regeneração do periodonto humano.

Coura⁶, buscando verificar a possibilidade de o ligamento periodontal conter células mesenquimais crestoneurais, isolou e cultivou células do ligamento em dois grupos distintos: um com células do ligamento de 10 dentes de sete indivíduos diferentes e outro grupo com células do ligamento de quatro dentes de um mesmo indivíduo. Após serem cultivadas em um meio indutivo específico e analisadas através da técnica da imunohistoquímica, observou-se a presença de um marcador de células-tronco neurais e também marcadores para células crestoneurais indiferenciadas (HNK1, p75). Os resultados foram similares nos dois grupos, sugerindo evidências de que o ligamento periodontal humano em adição a derivados mesodérmicos produzem células semelhantes às células crestoneurais.

Lin et al.¹⁸ realizaram um estudo a fim de identificar e localizar células mesenquimais indiferenciadas em biópsias em bloco e em cultura de expansão celular dos tecidos

periodontais humanos regenerados. Para tal, foi utilizada a técnica de regeneração tecidual, guiada com membranas em defeitos de furca e na superfície dentária dos terceiros molares de humanos voluntários. Após o período de cicatrização de seis semanas, os dentes e os tecidos ao seu redor (tecidos regenerados, incluindo o osso alveolar) foram removidos cirurgicamente para o preparo das amostras em bloco, as quais foram processadas para análise imunohistoquímica e para a obtenção de células para cultura. Os marcadores de células-tronco mesenquimais STRO-1, CD146 e CD44 foram utilizados para identificar as referidas células. Culturas celulares obtidas dos tecidos regenerados foram analisadas pela citometria fluida, e os resultados revelaram positividade para tais marcadores. A mineralização, a concentração de cálcio e o potencial adipogênico das células dos tecidos regenerados foram acessados e comparados com aqueles das células mesenquimais do ligamento periodontal, das células-tronco da medula óssea e dos fibroblastos gengivais. Os resultados mostraram a capacidade desses tecidos em formarem depósitos minerais e adipócitos. Entretanto, o nível de mineralização dessas células foi mais baixo do que o das células mesenquimais do ligamento periodontal e das células-tronco da medula óssea.

Considerando que as células do ligamento periodontal são muito importantes para o processo de regeneração dos tecidos periodontais devido à sua localização e às suas propriedades de células indiferenciadas, e que a interleucina-11 (I-11) é uma citocina multifuncional que participa ativamente do metabolismo ósseo, Leon et al.¹⁷ realizaram um estudo para examinar o efeito da I-11 na diferenciação osteoblástica das células do ligamento periodontal de humanos. As células do ligamento periodontal cultivadas foram estimuladas com I-11 e/ou ácido ascórbico, com ou sem inibidores para o colágeno tipo 1. A diferenciação osteoblástica foi analisada pela atividade da fosfatase alcalina e pela expressão gênica do marcador RUNX2, da osteocalcina e da sialoproteína óssea, utilizando a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa. O colágeno tipo 1 e o fator inibidor da produção da metaloproteinase-1 foram medidos, usando imunoenaios ligados a enzimas. Os resultados mostraram que a I-11 aumentou a atividade da fosfatase alcalina e do marcador RUNX2 e que, na presença de ácido ascórbico, elevou a osteocalcina e a expressão gênica da sialoproteína óssea. A I-11 induziu a produção de células do ligamento periodontal pelo colágeno tipo 1 e do tecido inibidor da metaloproteinase-1. Os autores concluíram que a interleucina-11 e/ou o ácido ascórbico induzem à diferenciação osteoblástica das células do ligamento periodontal através da produção de colágeno tipo 1. Os resultados também sugerem que a I-11 pode funcionar como uma citocina osteopromotora, estimulando a diferenciação osteoblástica das células do ligamento periodontal principalmente através da síntese de colágeno tipo 1 e possivelmente pela indução do fator inibidor da metaloproteinase-1.

Isaka et al.¹³ realizaram um estudo a fim de determinar se as células do ligamento periodontal tinham um papel importante no reparo ósseo durante o processo de regeneração periodontal. Para alcançar esse objetivo, foi investigada a expressão *in vitro* do fenótipo osteoblástico, tal como a atividade da fosfatase alcalina, o fator dependente do hormônio da paratireóide 3' e o acúmulo de adenosina monofosfato cíclica 5', utilizando células isoladas do ligamento periodontal e células isoladas da mandíbula de cães. As raízes de pré-molares extraídos de cães foram divididas em grupos, sendo eles: o grupo PDL(+), no qual o ligamento periodontal foi preservado e o grupo PDL(-), no qual o ligamento periodontal foi removido. Essas raízes foram respectivamente transplan-

tadas em defeitos ósseos, criados cirurgicamente e cobertas com uma membrana biológica. Seis semanas após o transplante, os resultados mostraram o fenótipo osteoblástico em ambas as culturas de células ósseas e do ligamento. Um nova inserção de tecido conjuntivo foi observada somente no grupo PDL(+), entretanto o osso alveolar foi quase completamente regenerado em ambos os grupos, e a quantidade de novo osso formado não foi estatisticamente diferente entre os dois grupos. Os autores concluíram que as células do ligamento periodontal de cães demonstravam a capacidade de se diferenciarem em linhagem de osteoblástica e, assim, contribuírem para a regeneração periodontal.

Inanç, Elçin e Elçin¹⁴ investigaram o potencial de diferenciação de células-tronco embrionárias humanas (hESCs), quando co-cultivadas com fibroblastos do ligamento periodontal humano (hPDLF). Após serem expandidas e caracterizadas morfolologicamente e imunohistoquimicamente, hESC foram co-cultivadas com hPDLF, por 28 dias. Dois grupos foram determinados: (i) grupo de indução osteogênica com ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametazona, contendo as hESC em um meio de diferenciação e (ii) grupo de diferenciação espontânea com as hESC também em um meio de diferenciação. Mudanças morfológicas nas células foram analisadas em um microscópio invertido, e a imunohistoquímica foi realizada em espécimes fixados no 1° e no 28° dias, usando anticorpos para fosfatase alcalina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea (BSP) e osteocalcina (OSC). A reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa foi utilizada para a detecção da ligação octamérica da proteína 4, BSP e o nível de expressão de mRNA da OSC. A mineralização foi observada, usando vermelho de alizarina, e as mudanças nas superfícies das colônias foram demonstradas com microscopia eletrônica de varredura. Os resultados indicaram a viabilidade da diferenciação osteogênica das hESCs em co-cultura com hPDLF e sugeriram o papel dos fibroblastos do ligamento periodontal no modelo de diferenciação. Os autores concluíram que avanços neste campo podem permitir a aplicação das hESCs na engenharia tecidual periodontal, envolvendo regeneração óssea em áreas de destruição, decorrente da doença periodontal.

Ohta et al.²³ criaram cavidades dentinárias nas raízes mesiais dos primeiros molares de ratos, os quais foram sacrificados um, três, cinco, sete e 14 dias após a cirurgia. Em cada um desses tempos de sacrifício, as seções foram marcadas histoquimicamente para CD44s, CD34, c-KIT, OCNE, Cbfa-1 e 5-bromo-deoxiuridina, usando anticorpos primários. Para análise morfométrica, os níveis de células positivas para Cbfa-1 e PCNA foram calculados de um número total de células positivas/ 104 μ 2 nas cavidades. Os resultados obtidos mostraram que as células positivas para 5-bromo-2-deoxiuridina foram observadas no ligamento periodontal e haviam migrado para as áreas de cicatrização. Um pequeno número de células positivas para CD44s, CD34 e c-KIT foram observadas na medula óssea, porém nada foi observado no ligamento periodontal. Células positivas para CD44s foram observadas somente em cavidades do osso alveolar no quinto dia após a cirurgia. Células positivas para CD23 e c-KIT foram detectadas, apenas, na cavidade dentinária no sétimo dia após a cirurgia. Os valores de Cbfa-1 e PCNA tenderam a mostrar um aumento também no sétimo dia após a cirurgia. Dessa forma, os autores concluíram que as células-tronco mesenquimais e as células-tronco hematopoieticas na medula óssea não estão envolvidas na regeneração do periodonto. As células que migraram do ligamento periodontal residual formaram novo osso alveolar em um estágio mais precoce, e a regeneração ao redor da dentina nas cavidades foi mais tardia do que nas outras partes.

Seo et al.²⁸ utilizaram o ligamento periodontal de humanos para testar a hipótese de que o ligamento periodontal criopreservado conteria células-tronco pós-natais recuperáveis. Estas células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal preservadas pelo frio mantiveram as características normais das células mesenquimais do ligamento periodontal, incluindo a expressão do marcador de superfície celular STRO-1, a formação de colônias celulares, o potencial de diferenciação, a formação de cimento e tecido de regeneração semelhante ao ligamento periodontal, além de um cariótipo diploide normal. Este estudo demonstrou que as células-tronco pós-natal podem ser recuperadas a partir de células do ligamento periodontal criopreservadas, promovendo, dessa forma, uma acessível prática clínica para a utilização de tecidos congelados para isolamento de células-tronco e regeneração tecidual.

Silvério et al.³² realizaram um estudo de revisão de literatura com ênfase na caracterização *in vitro* e *in vivo* das células mesenquimais derivadas de tecidos dentais e no seu potencial para promover regeneração dos tecidos periodontais. Os primeiros resultados destacaram a necessidade de investigações adicionais para determinar a eficácia da expansão ex-vivo de células mesenquimais no reparo das estruturas dentais e tecidos periodontais, visto que, mesmo com as limitações de cada experimento, as células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal mostraram uma habilidade de originar estruturas semelhantes ao cimento radicular e ao ligamento periodontal. Contudo, como as referidas células são heterogêneas, devido a sua capacidade de proliferarem e se diferenciarem em células formadoras do tecido periodontal, um número maior de pesquisas é necessário para investigar a função destas no processo de regeneração. Além disso, células precursoras do folículo dental humano de terceiros molares podem ser, no futuro, geneticamente modificadas *in vitro*, estando portanto, hábeis para se diferenciarem em células do tecido periodontal antes de serem transplantadas *in vivo*. Apesar de novos estudos serem necessários para colocar em prática essas terapias alternativas, neste momento o melhor entendimento das células-tronco e dos seus possíveis papéis na regeneração tecidual podem ajudar a desenvolver novas abordagens para um tratamento mais previsível dos defeitos periodontais.

Trubiani et al.³⁷ utilizaram células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal de humanos que foram induzidas à osteogênese, semeadas em arcabouços tridimensionais biocompatíveis (esponja de fibrina, substitutos de derivados ósseos) e examinadas usando microscopia de luz e eletrônica de varredura e transmissão. Observações morfológicas mostraram um crescimento extensivo da biomassa celular, cobrindo parcialmente os arcabouços após quatro semanas de incubação, no meio de mineralização. Esses resultados indicaram que o ligamento periodontal pode ser fácil e eficientemente uma fonte autóloga de células mesenquimais indiferenciadas com uma grande capacidade de expansão e habilidade de se diferenciarem em células osteogênicas que podem colonizar e crescer conectadas ao arcabouço biocompatível.

Células-tronco adultas multipotentes têm sido isoladas de vários tecidos não neurais. Techawattanawisal et al.³⁸ relataram, pela primeira vez, o isolamento de células mesenquimais indiferenciadas, derivadas do ligamento periodontal com características de células-tronco neurais primitivas. Células mesenquimais multipotentes do ligamento periodontal de ratos foram cultivadas, utilizando o sistema de cultura formadora de neurosféricas. Tais células foram dissociadas enzimaticamente e cultivadas em um meio básico,

livre de soro, contendo EGF e bFGF. Esferas livres, expressando GFAP e vimentina, foram formadas em sete dias de cultura. Em adição, as esferas expressaram RNAm de fatores de transcrição associados à crista neural, tais como: Twist, Slug, Sox2 e Sox9. As esferas derivadas do ligamento periodontal diferenciaram-se em miotubos multinucleados, células semelhantes a neurônios NFM-positivas, células semelhantes a astrócitos GFAP-positivas e células semelhantes a oligodendrócito CNPase-positivas. A análise da formação de colônias de metilcelulose revelou que uma simples célula do ligamento periodontal poderia formar uma esfera em uma frequência de, aproximadamente, 0,01 % do total de células. Esses dados indicam que as esferas derivadas do ligamento periodontal contêm células-tronco adultas multipotentes, e estas, por sua vez, podem ser usadas no tratamento de várias doenças, incluindo as neuro-degenerativas e a distrofia muscular.

Zhou et al.³⁹ investigaram a diferença dos marcadores de superfície celular em diferentes células periodontais, tais como: osteoblastos alveolares (AOs), fibroblastos do ligamento periodontal (PDLFs) e fibroblastos gengivais (GFs), e os seus potenciais de diferenciação em fenótipos osteogênicos e adipogênicos. As células periodontais foram isoladas, e a expressão padrão do antígeno de superfície foi analisada pela citometria de fluxo, sendo as caracterizações moleculares e histológicas das induções osteogênicas e adipogênicas monitoradas pela reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa e pelas técnicas de Western blot e imunocitoquímica. Os resultados mostraram que os fenótipos celulares dos AOs foram verificados pela alta expressão de CD29 e CD49a, enquanto os PDLFs mostraram distintivamente baixos níveis de CD63 e CD73. Em indução adipogênica, limitados AOs originaram células semelhantes a adipócitos de formato cúbico, enquanto os PDLFs formaram células semelhantes a adipócitos fusiformes. Todos os três tipos celulares expressaram genes osteorelacionados à linha de base. Os AOs demonstraram maior habilidade osteogênica, seguidos dos PDLFs e GFs. Através deste experimento, pôde-se concluir que as células do osso alveolar e do ligamento periodontal possuem progenitoras osteogênicas e adipogênicas, indicando a possibilidade de sua aplicação para regeneração dos tecidos periodontais.

CONCLUSÃO

De acordo com a literatura consultada, percebe-se que o ligamento periodontal pode ser uma fonte autógena fácil e eficiente de células mesenquimais indiferenciadas, com capacidade de expansão e habilidade de diferenciação em células fibroblásticas, cementoblásticas e osteoblásticas. Talvez, em um futuro não muito distante, o uso de células-tronco mesenquimais na regeneração do periodonto represente um procedimento corriqueiro, significando, assim, um grande avanço na terapia periodontal regenerativa.

REFERÊNCIAS

1. Akizuki T, Oda S, Komaki M, Tsuchioka H, Kawakatsu N, Kikuchi A et al. Application of periodontal ligament cell sheet for periodontal regeneration: a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol Res.* 2005;40:245-51.

2. Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol.* 2000. 2006;24:253-69.

3. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol.* 2000. 2006;40:164-72.

4. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:568-84.

5. Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res.* 2006;41:547-53.

6. Coura GS. Human periodontal ligament: a niche of neural crest stem cells. *J Periodont Res.* 2008;43:531-36.

7. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/ stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008; 215:743-49.

8. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10:149-60.

9. Gronthos S, Mankaji 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.

10. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-35.

11. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116:1827-35.

12. Gronthos S, Mrozik M, Shi S, Bartold PM. Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif Tissue Int.* 2006;79:310-17.

13. 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.

14. Inanç B, Elçin AE, Elçin YM. Effect of osteogenic induction on the in vitro differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *Artificial Organs.* 2007;31:792-800.

15. Kawanabe K, Murakami K, Yamamoto TT. The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 344:1278-83.

16. Kolya CL, Castanho FL. Células-tronco e a Odontologia. *Conscientiae Saúde.* 2007;6(1):165-71.

17. Leon ER, Iwasaki K, Komaki M, Kojima T, Ishikawa I. Osteogenic effect of interleukin-11 and synergism with ascorbic acid in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res.*

2007;42:527-35.

18. Lin N-H, Menicanin D, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM. Putative stem cells in regenerating human periodontium. *J Periodont Res*. 2008;43:514-23.

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

20. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:5807-12.

21. 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.

22. Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;19(2).

23. Ohta S, Yamada S, Matuzaka K, Inoue T. The behavior of stem cells and progenitor cells in the periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical methods. *J Periodont Res*. 2008;43:595-603.

24. Pitternger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosa JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-47.

25. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;41:30-47.

26. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int*. 2003;72:135-42.

27. 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.

28. Seo BM, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*. 2005;84:907-12.

29. 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.

30. 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.

31. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003; 34:565-71.

32. Silvério KG, Benatti BB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. Stem cells: potential therapeutics for periodontal regeneration. *Stem Cell Rev*. 2008;4:13-19.

33. Slack JM. Stem cell in epithelial tissue. *Science*. 2000; 287:1431-33.

34. Sloan AJ, Smith AJ. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*. 2007;13:151-57.

35. Soares AP, Knop LAH, Jesus AA, Araújo TM. Células-tronco em odontologia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2007;12:33-40.

36. Souza VF, Lima LMC, Reis SRA, Ramalho LMP, Santos JN. Células-tronco: uma breve revisão. *R Ci Méd Biol*. 2003; 2:251-56.

37. Trubiani O, Orsini G, Zini N, Di Iorio D, Piccirilli M, Piatelli A et al. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report. *Biomed Mater Res A*. 2008; 87:986-93.

38. Techawattanawisal W, Nakahama K, Komaki M, Abe M, Takagi Y, Morita I. Isolation of multipotent stem cells from adult rat periodontal ligament by neurosphere-forming culture system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357:917-23.

39. Zhou Y, Huttmacher DW, Sae-Lim V, Zhou Z, Woodruff M, Lim TM. Osteogenic and adipogenic induction potential of human periodontal cells. *J Periodontol*. 2008;79:525-34.