

ALDRIN ANDRÉ HUAMÁN MENDOZA

**Potencial das membranas de células-tronco mesenquimais na regeneração
periodontal: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos em modelo
animal**

São Paulo
2022

ALDRIN ANDRÉ HUAMÁN MENDOZA

**Potencial das membranas de células-tronco mesenquimais na regeneração
periodontal: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos em modelo
animal**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira

São Paulo

2022

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Huamán-Mendoza, Aldrin André.

Potencial das membranas de células-tronco mesenquimais na regeneração periodontal: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos em modelo animal / Aldrin André Huamán-Mendoza; orientadora Marinella Holzhausen Caldeira -- São Paulo, 2022.

95 p. : fig. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Regeneração periodontal. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Periodontite. 4. Medicina regenerativa. 5. Engenharia tecidual. 6. Revisão sistemática. 7. Animais. I. Caldeira, Marinella Holzhausen. II. Título.

Huamán-Mendoza AA. Potencial das membranas de células-tronco mesenquimais na regeneração periodontal: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos em modelo animal. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 07/07/2022

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). Luciana Saraiva

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Prof(a).Dr(a). Carla Renata Sipert

Instituição: Universidade de São Paulo Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Emanuel da Silva Rovai

Instituição: Universidade de Taubaté Julgamento: Aprovado

Dedico esta disertación a mi familia:

Mis amados padres, **Miguel Ángel y Clelia Elisa**, mi ejemplo a seguir, mi mayor amor, mi fuente de valores, mi puerto más seguro, mi camino, motor y motivo.

Mi hermano **Miguel Ángel**, mi primer y mejor amigo de vida, por siempre cuidar de mí, ser mi modelo a seguir, mi soporte, mi apoyo y tener siempre el mejor de los consejos preparado para mí en el momento más oportuno.

Mi hermano **Kevin Arthur**, mi amigo más confiable, que a pesar de su corta edad nos enseña tanto sobre la vida. Su madurez e inteligencia emocional fueron fundamentales para mí en los momentos más difíciles lejos de la familia.

A mi **Carla**, por el gran apoyo, compañerismo, cariño, amor e incentivo durante este proceso importante en mi crecimiento profesional y personal.

A mi bebé **Miguel Angel**, nuestra bendición que está em camino y mi motivación diaria a seguir adelante.

Mi cuñada **Lady Diana**, la hermana que siempre quise y tengo la suerte de tener en mi familia, además me dió la bendición de tener a mi sobrina Samantha.

*A mi sobrina **Samantha**, el tenerla en casa es una verdadera bendición de Dios. Gracias por iluminar nuestro hogar.*

A mi abuela **Isabel Castillo**, mi consejera más experta, cada palabra de ella siempre queda grabada em mi mente y mi corazón.

A mis tíos **Rafael y Cristina**, quienes fueron como mis padres aquí en Brasil, les estaré eternamente agradecido por todo el apoyo y la estabilidad que me brindaron en todo momento.

A mis ángeles, **Hortencia Guevara, Miguel Huamán y Napoleón Espejo**, sé que desde el cielo siguen guiando mis pasos e iluminándome.

Soy muy agradecido a todos ustedes por entender y apoyar este logro, que no solo es mío sino también de ustedes. ¡Gracias por esta conquista!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** porque sem ele nada disso seria possível, por me colocar as pessoas certas para chegar até aqui.

Agradeço a minha orientadora **Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira** pela confiança, mesmo antes de me conhecer pessoalmente, por me oferecer a oportunidade de seguir meus sonhos e ter a possibilidade de estudar no Brasil e principalmente na FOU SP, por me incentivar sempre a crescer tanto como profissional quanto como ser humano, me inspirando a seguir em todo momento para frente, sonhando, mas sempre com os pés no chão; por ser uma orientadora presente, exemplo de professora e como uma mãe na pós-graduação para mim e para todos seus orientandos. Muito obrigado por tanto, prezada professora Marinella!

Agradeço aos professores dos quais tive a honra de aprender e conviver, oferecendo sempre o melhor deles para estimular meu aprendizado **Prof. Dr. Emanuel Silva Rovai, Prof. Dr. Cláudio Mendes Pannuti, Profa. Dra. Luciana Saraiva, Profa. Dra. Cristina Cunha Villar, Prof. Dr. Giuseppe A. Romito, Prof. Dr. João Batista César Neto, Prof. Dr. Giorgio de Micheli e Profa. Dra Carla Renata Sipert.**

Agradeço às amizades que a pós-graduação me apresentou e levarei para minha vida sempre. **Yasmin das Graças, Nathalia Vilela, Isabella Reis, Danilo Balzarini, Guilherme Castro Lima, Tomaz Alves, Lucas Macedo, Guilherme Costa, Mohamed Hassan, Laís Nakao, Nayara de Lucena, Dania Ramadan, Thiago Reina, Carlos Benitez, Julia Kohane, Jonathan Brito, Lilian Smeke, e todos os demais,** obrigado pelos bons momentos, conversas, risadas e rotinas de estudo, vocês fizeram o meu processo de adaptação no Brasil e a pós-graduação mais leve e agradável.

Agradeço também a **Marília Camargo e Catia Tiezzi** por serem tão prestativas e me ajudarem em todo momento.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior) pela bolsa de Mestrado.

Agradeço à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, principalmente ao Departamento de Periodontia, por proporcionar um excelente grupo docente, funcionários capazes e uma excelente infraestrutura; favorecendo, dessa forma, o aprendizado de todos nós.

"O conhecimento tem a ver com a evolução da técnica e das ciências, e a cultura é algo anterior ao conhecimento, uma propensão do espírito, uma sensibilidade e um cultivo da forma que dá sentido e orientação aos conhecimentos."

Mario Vargas Llosa

RESUMO

Huamán-Mendoza AA. Potencial das membranas de células-tronco mesenquimais na regeneração periodontal: uma revisão sistemática de estudos pré-clínicos em modelo animal [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

A periodontite é uma doença inflamatória crônica multifactorial caracterizada pela destruição progressiva do aparelho de suporte periodontal. Atualmente, as técnicas convencionais para regeneração desses tecidos periodontais perdidos tiveram sucesso limitado. A tecnologia de membranas de células usando células-tronco mesenquimais apareceu como uma estratégia promissora na medicina regenerativa periodontal. Embora estudos recentes tenham mostrado o papel das membranas de células-tronco mesenquimais (MSCs) no aumento dos tecidos de suporte dentário e ósseo, não há uma revisão sistemática focada especificamente na avaliação da regeneração periodontal em modelos animais ortotópicos. Esta revisão tem como objetivo avaliar o potencial das MSCs na regeneração periodontal em comparação ao controle, em modelos animais experimentais. Estudos pré-clínicos em defeitos periodontais de modelos animais foram considerados elegíveis. A busca eletrônica incluiu as bases de dados MEDLINE, Web of Science, EMBASE e LILACS. Além disso, uma busca manual avaliou as revistas científicas na área de “periodontia/regeneração”. A revisão sistemática foi conduzida de acordo com as diretrizes de “Preferred Reporting Item for Systematic Reviews and Meta-Analyses statement guidelines”. A ferramenta do Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório (SYRCLE) foi usada para avaliar o risco de viés. Dos 3989 estudos obtidos a partir da busca no banco de dados eletrônicos foram incluídos 17 artigos. Foram empregados MSCs autólogos, alógenos e xenógenos para melhorar a regeneração periodontal. Estes incluíram MSCs do folículo dentário (DF), MSCs do ligamento periodontal (PDL), MSCs da polpa dentária (DP), MSCs da medula óssea (BM), MSCs periosteais alveolares (AP) e MSCs gengivais (G). Em relação ao protocolo de indução de células, a maioria dos estudos utilizou ácido ascórbico (52,94%), outros utilizaram placas de cultura com polímero termo responsivo (47,06%). Os efeitos adversos, em relação à utilização das MSCs no sítio doador, não foram identificados na maioria dos estudos, mesmo com o uso adjunto de *scaffolds*, membranas ou ambos. Meta-análise não foi considerada devido a heterogeneidades metodológicas. PDL-MSCs demonstrou ser superior

para aumento da regeneração periodontal em comparação ao controle, mas em um microambiente inflamatório induzido, DF-MSCs foram melhores. Os DF-MSCs parecem estar relacionados à espessura do cemento e dimensão periodontal. Além disso, DP-MSCs e BM-MSCs mostraram resultados melhores em comparação com o controle. Em contraste, AP-MSCs não foram associados a melhorias na regeneração periodontal. A avaliação do risco de viés com a ferramenta da SYRCLE revelou que 44,12% dos estudos apresentavam baixo risco de viés, 55,29% foram incertos e 0,59%, alto risco. A presente revisão sistemática mostrou que as MSCs podem aumentar a regeneração periodontal em modelos animais de defeito periodontal, fornecendo uma estratégia promissora para aumentar a regeneração periodontal.

Palavras-chave: Regeneração periodontal. Células-tronco mesenquimais. Periodontite. Medicina regenerativa. Engenharia tecidual. Revisão sistemática. Animais.

ABSTRACT

Huamán-Mendoza AA. Potential of mesenchymal stem cell sheets on periodontal regeneration: a systematic review of pre-clinical animal studies [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2022. Versão Corrigida.

Periodontitis is a multifactorial chronic inflammatory disease characterized by progressive destruction of the tooth-supporting apparatus. Currently, conventional techniques for periodontal regeneration have had limited success. Cell membrane technology using mesenchymal stem cells has emerged as a promising strategy in periodontal regenerative medicine. Although recent studies have shown the role of mesenchymal stem cell membranes (MSCs) in increasing dental and bone supporting tissues, there is not a systematic review focused specifically on assessing periodontal regeneration in orthotopic animal models. This review aimed to evaluate the potential of MSCs on periodontal regeneration, compared to control, in experimental animal models. Pre-clinical studies in periodontal defects of animal models were considered eligible. The electronic search included the MEDLINE, Web of Science, EMBASE and LILACS databases. In addition, a manual search evaluated the scientific journals in the area of “periodontics/regeneration”. The systematic review was conducted according to the Preferred Reporting Item for Systematic Reviews and Meta-Analyses statement guidelines. The Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation’s tool was used to evaluate the risk of bias. A total of 17 of the 3989 studies obtained from the electronic database search were included. Autologous, allogeneous and xenogeneous MSCs were employed to improve periodontal regeneration. These included dental follicle (DF) MSCs, periodontal ligament (PDL) MSCs, dental pulp (DP) MSCs, bone marrow (BM) MSCs, alveolar periosteal (AP) MSCs and gingival (G) MSCs. Regarding cell sheet inducing protocol, most of the studies used ascorbic acid (52,94%). Others used culture dishes grafted with a temperature-responsive polymer (47,06%). Adverse effects were not identified in the majority of studies, even with the adjunct use of scaffold, membrane or both. Meta-analysis was not considered because of methodological heterogeneities. PDL-MSCs demonstrated to be superior for periodontal regeneration enhancement compared to control, but in an induced inflammatory microenvironment, DF-MSCs were better. DF-MSCs seem to be related to cementum thickness and periodontal width.

Moreover, DP-MSCs and BM-MSCs showed improved results compared to control. In contrast, AP-MSCs were not associated to improvements in periodontal regeneration. The SYRCLE risk of bias assessment revealed that 44.12% of studies had a low risk of bias, 55.29% unclear, and 0.59% a high risk. The present systematic review showed that MSCs can enhance periodontal regeneration in animal periodontal defect models, providing a promising strategy to enhance periodontal regeneration.

Keywords: Periodontal regeneration. Mesenchymal stem cells. Periodontitis. Regenerative medicine. Tissue engineering. Systematic review. Animals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Níveis de bioengenharia de tecidos: células, moléculas e <i>scaffolds</i>	23
Figura 2.2 - Características das células-tronco.....	24
Figura 2.3 - Classificação das células-tronco segundo seu potencial de diferenciação: totipotente, pluripotente e multipotente.....	25
Figura 2.4 - Fontes de células-tronco mesenquimais na região oral e maxilofacial. Células-tronco do folículo dentário (DFSCs), células-tronco da papila apical dentária (SCAP), células-tronco da polpa dentária (DPSCs), células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs), células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), células-tronco da medula óssea (BMSCs) e células-tronco do periósteo (PSCs).	26
Quadro 2.1 - Caracterização das células-tronco mesenquimais dado por Dominici et al.	27
Figura 2.5 - Efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais nas células do sistema imunológico. CTL, linfócito T citotóxico; DC, célula dendrítica; HLA, antígeno leucocitário humano; IL, interleucina; IFN- γ , interferon-gama; MSC, célula-tronco mesenquimal; NK, <i>natural killer</i> ; Th, T-helper; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; Treg, célula T-reguladora	28
Figura 2.6 - Técnicas mais utilizadas na periodontia para a indução de membranas de células (<i>cell sheets</i>): 1) com suplementação de ácido ascórbico ou vitamina c no meio de cultivo; 2) com cultura sensível à temperatura. ...	29
Figura 5.1 - Diagrama de fluxo PRISMA para identificar estudos elegíveis	40
Quadro 5.1 - Detalhes dos estudos incluídos.....	41
Quadro 5.2 - Avaliação do risco de viés dos estudos pré-clínicos incluídos usando a ferramenta SYRCLE.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais periosteais alveolares
BM-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais da medula óssea;
BV	volume ósseo
β-TCP	β-tricálcio fosfato
C-BM-MSCSs	aglomerados de um complexo BM-MSCSs / matriz extracelular
DAP-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais da papila dental apical
DF-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais do folículo dentário
DMSO	dimetilsulfóxido
DP-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais da polpa dentária
ECM	matriz extracelular
EPCs	células progenitoras endoteliais
G-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais gengivais
GM	meio de crescimento
GTR	regeneração tecidual guiada
HA / β-TCP	hidroxiapatita e β-tricálcio fosfato
H-PDL-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal saudável
H&E	hematoxilina e eosina
Micro-CT	micro tomografia computadorizada
MSC	células-tronco mesenquimais
MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais

MSCSs-HED	membranas de células-tronco mesenquimais de dentes decíduos exfoliados
OIM	meio osteoindutivo
PCL	policaprolactona
PDL	ligamento periodontal
PDL-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal
PGA	tecido de ácido poliglicólico
PIPAAm	polímero poli (N-isopropilacrilamida)
P-PDL-MSCSs	membranas de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal com periodontite
qRT-PCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
Ratos SD	ratos Sprague-Dawley
TDMP	partículas tratadas da matriz de dentina
TMD	densidade mineral do tecido
TV	volume de tecido
Vc	vitamina C

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	Bioengenharia Tecidual	23
2.2	Células-tronco	24
2.2.1	Definição de células-tronco	24
2.2.2	Tipos de células-tronco	25
2.2.3	Células-tronco ideais em periodontia	26
2.2.4	Caracterização das células-tronco mesenquimais	27
2.2.5	Propriedades das células-tronco	27
2.2.6	Efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais	27
2.3	Membranas de células-tronco	28
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Pergunta norteadora	35
4.2	Crítérios de elegibilidade	35
4.2.1	Intervenção e comparação	35
4.2.2	Medidas de desfecho	36
4.3	Fonte de informação e estratégia de pesquisa	36
4.4	Seleção de estudos	37
4.5	Coleta de dados	37
4.6	Risco de viés em estudos individuais	38
5	RESULTADOS	39
5.1	Resultados da pesquisa e estudos excluídos	39
5.2	Características do estudo	39
5.3	Modelos experimentais	39
5.3.1	Modelos animais	39
5.3.2	Modelos experimentais de defeito	53
5.4	Membranas de células-tronco mesenquimais e <i>scaffolds</i>	53
5.5	Efeitos adversos	53
5.6	Avaliação da qualidade do estudo e risco de viés	54

5.7	Efeito das intervenções	61
5.7.1	Efeito das membranas de células-tronco mesenquimais	61
5.7.2	Efeito de intervenções adicionais para MSCs	63
6	DISCUSSÃO	65
6.1	Resumo dos principais resultados	65
6.2	Comparação com estudos anteriores	66
6.3	Modelos experimentais de defeito periodontal	67
6.4	Impacto de intervenções adicionais às MSCs	68
6.5	Qualidade dos estudos e avaliação do viés	69
6.6	Limitações da literatura disponível	70
6.7	Recomendações para estudos futuros	70
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	75
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória multifatorial crônica associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparelho de suporte dentário. A área que estuda a nova formação de cemento, osso alveolar e ligamento periodontal funcional em uma superfície radicular previamente comprometida, produto da doença periodontal, é a regeneração periodontal (1). Atualmente, várias estratégias regenerativas tem sido avaliadas, incluindo regeneração tecidual guiada, regeneração óssea guiada, fatores de crescimento ou diferenciação, condicionamento da superfície radicular, proteínas da matriz do esmalte, fatores combinados e terapias combinadas (2). Embora haja evidência de que a regeneração periodontal pode ser alcançada com o uso dessas técnicas, todos os tipos de tratamentos regenerativos têm mostrado sucesso e previsibilidade limitados, especialmente em situações clínicas desafiadoras, como defeitos periodontais de uma ou duas paredes (1).

Estudos recentes sobre regeneração periodontal têm focado seus esforços na bioengenharia tecidual, especificamente na tecnologia de membranas de células, que é um método de cultivo celular com estímulos específicos e sem nenhum subcultivo ou cultivo celular secundário, até que a camada celular se destaque da cultura (3,4). Diferentes tipos de técnicas foram aplicados para induzir a formação de membranas de células, como o uso de enzimas proteolíticas (por exemplo, tripsina), manipulação de cultura celular em poli N-isopropilacrilamida sensível à temperatura (5), força magnética e superfícies de cultura de células revestidas com lipossomas de magnetita catiônica conjugados com peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp), cultura polimerizada revestida com fibrina humana (6) ou empregando suplementação de ácido ascórbico em meio de cultura (7,8).

A técnica de membrana de célula pode ser usada com células-tronco mesenquimais (MSCs) e alguns exemplos podem ser: membranas de células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal (PDL-MSCs), membranas de células-tronco mesenquimais da polpa dentária (DP-MSCs), membranas de células-tronco mesenquimais do folículo dentário (DF-MSCs), membranas de células-tronco mesenquimais da papila apical dentária (DAP-MSCs), membranas de células-tronco mesenquimais de dentes decíduos esfoliados humanos (MSCs-HED), membranas de células-tronco mesenquimais periosteais alveolares (AP-MSCs), membranas de

células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSCs) e membranas de células-tronco mesenquimais gengivais (G-MSCs) (7,9,10).

As vantagens do uso da técnica de MSCs incluem a manutenção da matriz extracelular intacta após o autodesprendimento, sendo direta e facilmente transplantada para os tecidos do hospedeiro, sem o uso de arcabouços (*scaffolds*) ou transporte de biomateriais. Elas podem ser usadas para construir tecidos *in vitro*, colocando membranas de células individuais em camadas celulares (11). Dessa forma, essas camadas podem ser enxertadas nos tecidos receptores sem sutura (12,13). Além disso, a evidência mostrou regeneração de alta qualidade de tecidos danificados sem formação de cicatriz fibrosa, morbidade mínima do sítio doador em comparação com autoenxertos e um baixo risco de rejeição autoimune e transmissão de doenças (9).

Os modelos *in vivo* fornecem benefícios para uma melhor compreensão dos aspectos dos processos moleculares, celulares, teciduais e anatômicos que ocorrem em resposta à terapia reconstructiva periodontal utilizando MSCs. Alguns estudos demonstraram que as MSCs podem regenerar, tanto *in vitro* como *in vivo*, ligamento periodontal, osso, cimento e fibras de colágeno (14–16). Atualmente, apenas uma revisão sistemática avaliou os benefícios adicionais das MSCs na regeneração do tecido periodontal em termos de neoformação dos tecidos de suporte dentário e osso (17). O presente estudo tem um foco diferente à revisão tanto *in vitro* como *in vivo* mencionada, uma vez que os artigos aqui incluídos foram considerados por apresentarem modelos animais periodontais ortotópicos.

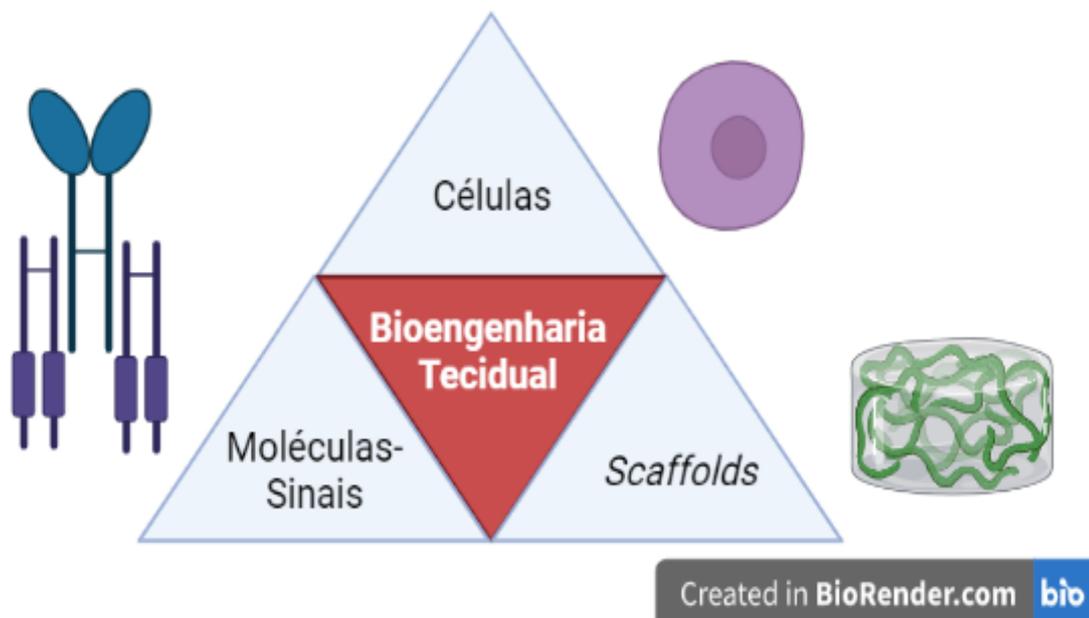
Assim, o objetivo desta revisão sistemática é avaliar os efeitos das membranas de células-tronco mesenquimais em defeitos periodontais de modelos animais, em comparação a grupos controle e / ou cirurgias simuladas (SHAM), na regeneração periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bioengenharia Tecidual

Mason e Dunnill descreveram a medicina regenerativa como uma terapia que regenera ou substitui células, tecidos ou órgãos humanos para restaurar ou estabelecer sua função normal (18). Esse é agora um campo de pesquisa estabelecido e denominado engenharia de tecidos/medicina regenerativa (TE / RM), com o objetivo de “estimular a regeneração de tecidos e órgãos por meio da implantação de biomateriais para regeneração *in vivo* ou da construção de substitutos *in vitro*”. TE / RM é uma área de pesquisa translacional que inclui uma ampla gama de disciplinas, tais como medicina, biologia de células-tronco, ciências de materiais, química e manufatura (18,19) (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Níveis de bioengenharia de tecidos: células, moléculas e *scaffolds*



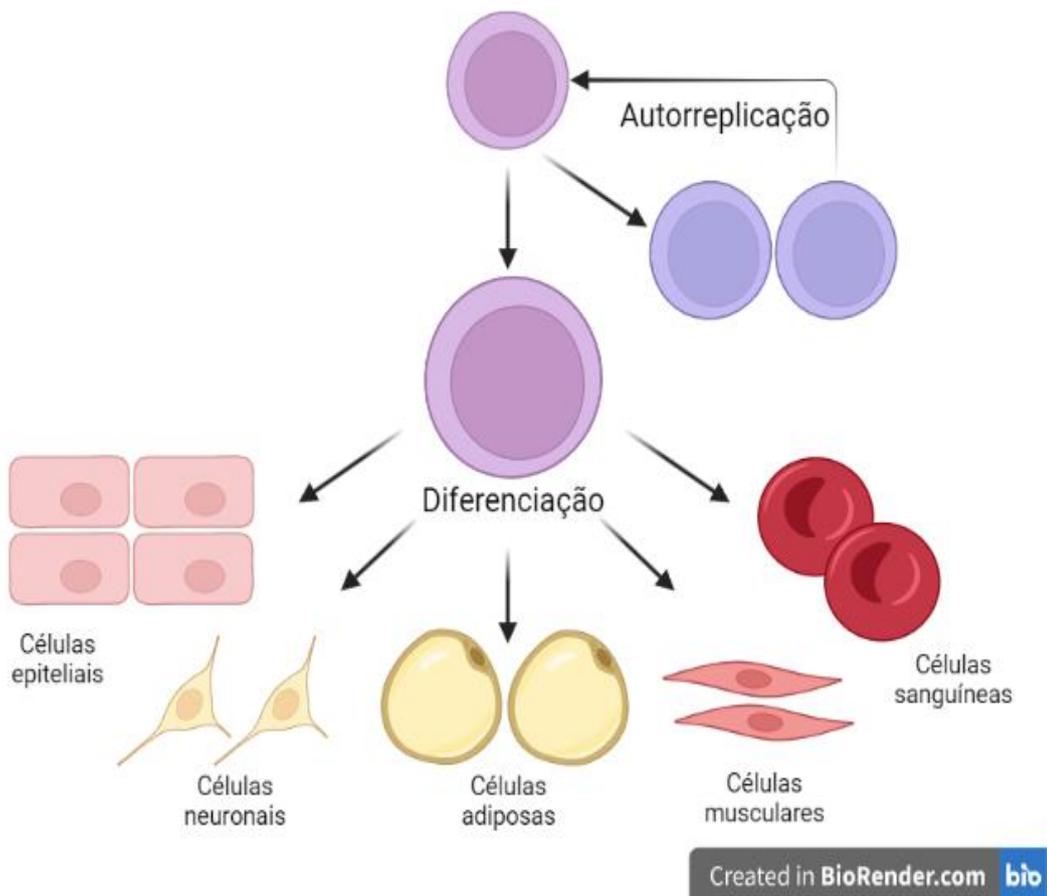
Fonte: o autor.

2.2 Células-tronco

2.2.1 Definição de células-tronco

As células-tronco são células indiferenciadas com a capacidade de autorreplicação e/ou autorrenovação, gerando outras células-tronco, e com a capacidade de diferenciação, podem tornar-se células mais especializadas quando estimuladas por estímulos internos e externos (10,20) (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Características das células-tronco



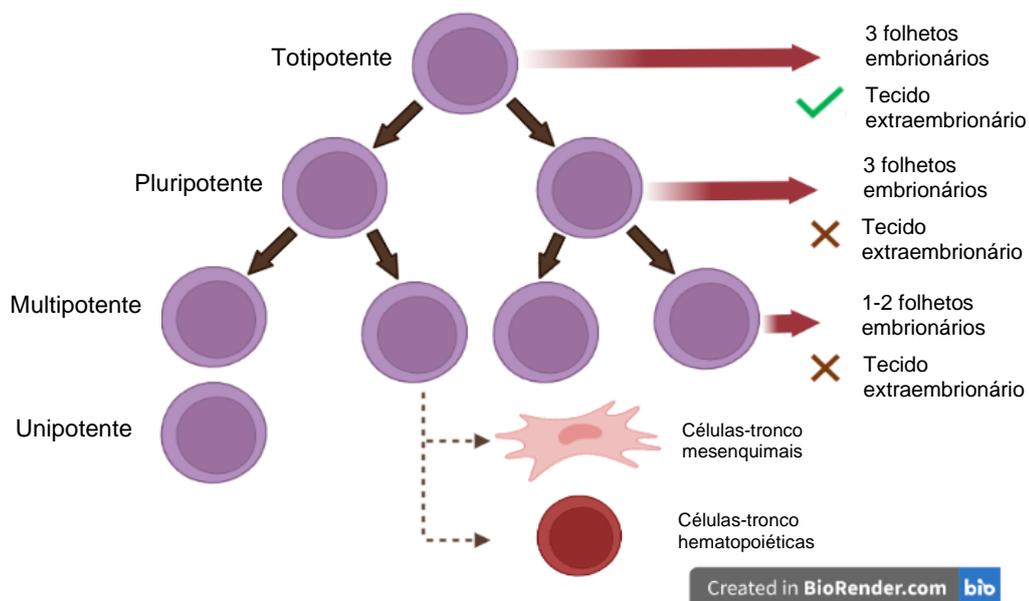
Fonte: o autor.

2.2.2 Tipos de células-tronco

Baseados em seu potencial de diferenciação (10):

- **Células totipotentes:** Diferenciam-se em células dos 3 folhetos embrionários ou germinativos (ectoderma, mesoderma, endoderma) e também em tecido extra-embriônico como a placenta.
- **Células pluripotentes:** Diferenciam-se em células dos 3 folhetos embrionários ou germinativos (ectoderma, mesoderma, endoderma) mas não em tecido extra-embriônico.
- **Células multipotentes:** Podem diferenciar-se em células de 1 ou 2 folhetos germinativos. Nesse grupo estão consideradas as células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas.
- **Célula unipotente:** Diferenciam-se em células de somente 1 tipo celular. Não são consideradas células-tronco. (Figura 2.3)

Figura 2.3 - Classificação das células-tronco segundo seu potencial de diferenciação: totipotente, pluripotente e multipotente



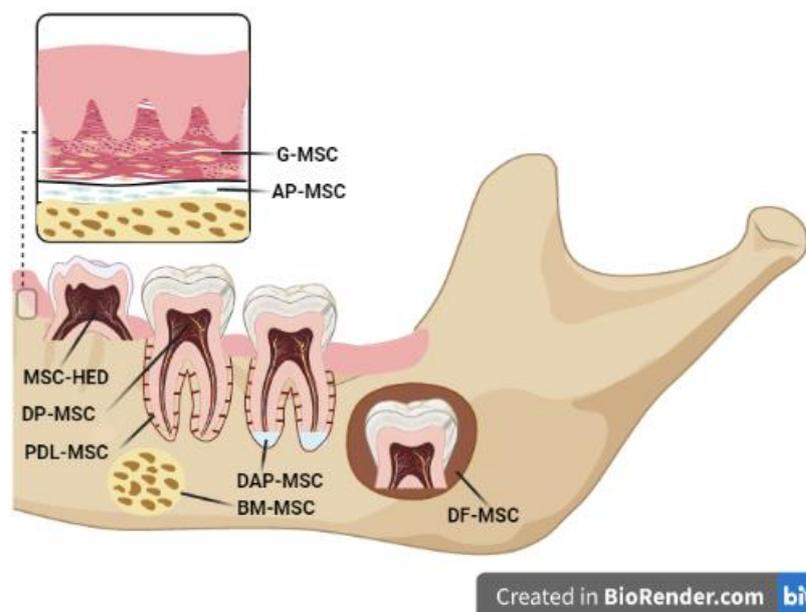
Fonte: o autor.

2.2.3 Células-tronco ideais em periodontia

Os problemas éticos relacionados ao uso de células-tronco embrionárias e a questão de que tanto as células-tronco embrionárias quanto as células-tronco pluripotentes induzidas possam ser capazes de formar tumores *in vivo*; explicam o fato de que as células-tronco mesenquimais sejam consideradas ideais para regeneração periodontal e também as mais estudadas (7,21).

Elas podem existir em diversas partes do corpo humano. Além disso, as principais fontes de células-tronco mesenquimais (MSC) na região oral e maxilofacial são: PDL-MSC, DP-MSC, DF-MSC, DAP-MSC, MSC-HED, AP-MSC, BM-MSC, G-MSC (7–9) (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Fontes de células-tronco mesenquimais na região oral e maxilofacial. Células-tronco mesenquimais do ligamento periodontal (PDL-MSC), células-tronco mesenquimais da polpa dentária (DP-MSC), células-tronco mesenquimais do folículo dentário (DF-MSC), células-tronco mesenquimais da papila apical dentária (DAP-MSC), células-tronco mesenquimais de dentes decíduos esfoliados humanos (MSC-HED), células-tronco mesenquimais periosteais alveolares (AP-MSC), células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSC) e células-tronco mesenquimais gengivais (G-MSC)



Created in BioRender.com 

2.2.4 Caracterização das células-tronco mesenquimais

São os requisitos mínimos estabelecidos por Dominici et al. para reconhecer as células-tronco mesenquimais como tais (10,22) (Quadro 2.1).

Quadro 2.1 - Caracterização das células-tronco mesenquimais dado por Dominici et al.

A) Aderência ao plástico em condições de cultura standard.		
B) Fenótipo	Positivo ($\geq 95\%$ +)	Negativo ($\leq 2\%$ +)
	CD105	CD45
	CD73	CD34
	CD90	CD14 ou CD11b
		CD79a ou CD19
HLA-DR		
C) Diferenciação <i>in vitro</i> : osteoblastos, adipócitos, condroblastos (Demonstrado por coloração de cultura de células <i>in vitro</i>).		

Fonte: Dominici et al. (22).

2.2.5 Propriedades das células-tronco

De acordo a Bassir et al (10) as propriedades das células-tronco são:

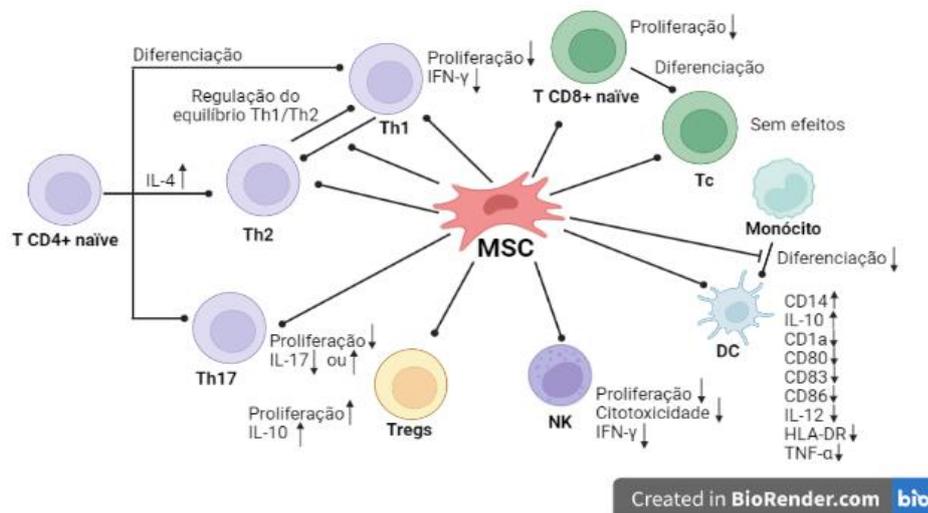
- Capacidade de diferenciação e autorrenovação
- Regeneração de alta qualidade
- Baixo risco de rejeição autoimune
- Imunomodulador

2.2.6 Efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais

É importante reconhecer o papel fundamental das células-tronco mesenquimais como imunomoduladores nas células do sistema imunológico. Elas

diminuem a proliferação de células que favorecem a inflamação, como células Th1, Th17 e aumentam as células que diminuem o processo inflamatório como linfócitos T reguladores. Junto com isso, diminuem citocinas pró-inflamatórias como IFN-gamma (Interferon gamma), TNF- α , IL-17 e aumentam a expressão de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 e IL-10 (23,24) (Figura 2.5).

Figura 2.5 - Efeitos imunomoduladores das células-tronco mesenquimais nas células do sistema imunológico. DC, célula dendrítica; HLA, antígeno leucocitário humano; IL, interleucina; IFN- γ , interferon-gama; MSC, célula-tronco mesenquimal; NK, *natural killer*; T, linfócito T; Tc, linfócito T citotóxico; Th, linfócito T-helper; TNF- α ; fator de necrose tumoral alfa; Tregs, linfócitos T-reguladores



Fonte: Adaptado pelo autor de Wada et al. (23)

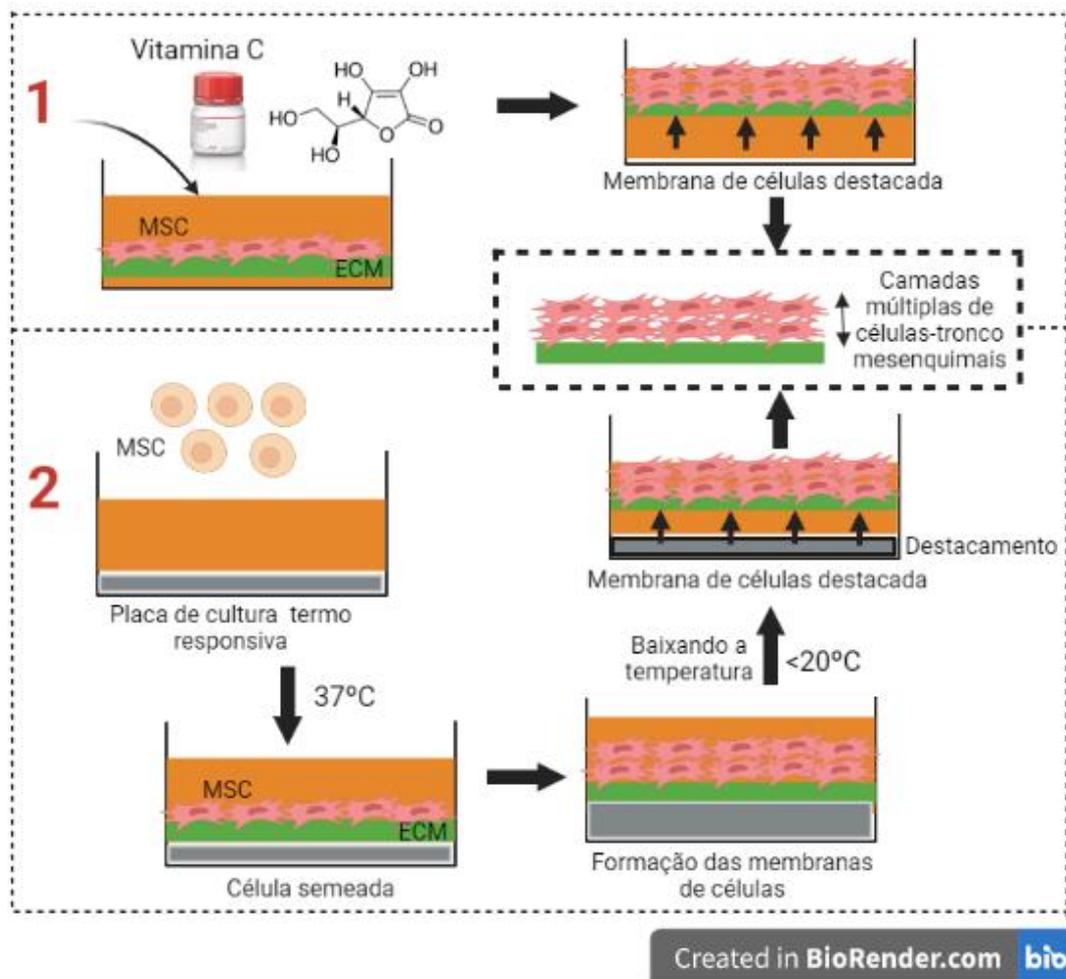
2.3 Membranas de células-tronco (*Cell sheets*)

Estudos recentes sobre o tratamento da doença periodontal têm focado seus esforços na tecnologia de membranas de células, que é um método de cultivo celular com estímulos específicos e sem nenhum cultivo secundário, até que a camada celular se destaque da cultura (3,4).

Diferentes tipos de técnicas foram aplicados para melhorar o método, como o uso de enzimas proteolíticas (por exemplo, tripsina), manipulação de cultura de poli N-isopropilacrilamida sensível à temperatura, onde a 37°C a superfície da placa é hidrofóbica e as células podem-se aderir à placa e proliferar; quando a temperatura é reduzida para 20°C, a superfície hidrofóbica das placas muda reversivelmente para

hidrofílica, determinando o descolamento gradual da camada de células da superfície da cultura (5). Também pode ser utilizada como sistema de preparação de membranas a força magnética e superfícies de cultura de células revestidas com lipossomas de magnetita catiônica conjugados com peptídeo RGD (Arg-Gly-Asp), cultura polimerizada revestida com fibrina humana (6) ou empregando suplementação de ácido ascórbico em meio de cultura (7,8) (Figura 2.6).

Figura 2.6 - Técnicas mais utilizadas na periodontia para a indução de membranas de células (*cell sheets*): 1) com suplementação de vitamina C no meio de cultivo; 2) com cultura sensível à temperatura. MSC, células-tronco mesenquimais; ECM, Matriz extracelular



Fonte: o autor.

A técnica de membrana de células pode ser usada com células-tronco mesenquimais, e alguns exemplos podem ser: PDL-MSCs, DP-MSCs, DF-MSCs, DAP-MSCs, MSCs-HED, AP-MSCs, BM-MSCs e G-MSCs (7,9,10).

A utilização da técnica de membrana de células com células-tronco mesenquimais apresenta diversas vantagens, tais como a manutenção da matriz extracelular intacta após o autodesprendimento, sendo direta e facilmente transplantada para os tecidos do hospedeiro. Além disso, podem tornar desnecessária a utilização de *scaffolds* ou de transporte por biomateriais. Elas podem ser usadas em camadas sobrepostas para construir tecidos *in vitro*, por serem altamente adesivas (11). Dessa forma, essas camadas podem ser enxertadas nos tecidos receptores sem sutura (12,13). A evidência mostrou regeneração de alta qualidade de tecidos previamente danificados sem formação de cicatriz fibrosa, morbidade mínima do sítio doador em comparação com autoenxertos e um baixo risco de rejeição autoimune e transmissão de doenças (9). Além disso, alguns estudos demonstraram que as MSCs podem regenerar ligamento periodontal, osso, cemento e fibras de colágeno *in vitro* e *in vivo* (14–16).

Uma revisão sistemática anterior mostrou que PDL-MSc e DP-MSc foram as fontes mais comuns de onde as células-tronco foram isoladas (25). Outra revisão pré-clínica em modelos ortotópicos demonstrou que BM-MSc e PDL-MSc foram os mais utilizados (26).

Amghar-Maach et al (2019), avaliaram principalmente DP-MSCs, e concluíram que mais regeneração óssea foi alcançada com a técnica de membrana de células comparado à injeção de células-tronco dissociadas. Além disso, os autores mencionaram que PDL-MSCs podem apresentar melhores resultados na regeneração periodontal em comparação com DP-MSCs (27).

Recentemente, uma revisão sistemática avaliou os benefícios adicionais das MSCs na regeneração do tecido periodontal em relação à neoformação dos tecidos de suporte dentário e osso (17). Magalhães et al avaliaram todos os estudos pré-clínicos em animais contendo experimentos *in vitro* e *in vivo*. O último incluiu modelos ectópicos, bio-raízes e ortotópicos. Além disso, fizeram uma comparação das MSCs com qualquer outro tipo de tratamento regenerativo (17).

Considerando os estudos prévios, é importante conduzir uma revisão sistemática com o intuito de avaliar modelos animais e transplante ortotópico em defeitos periodontais, o qual é o modelo animal mais próximo dos estudos clínicos. Além disso, é necessário comparar o grupo teste com MSCs, em relação aos grupos controle e/ou cirurgias simuladas na nova formação dos tecidos periodontais.

Por todas essas razões, acreditamos que nosso estudo é diferente as revisões já publicadas, demonstrando a importância da nossa revisão sistemática para a realização de estudos futuros utilizando MSCs na regeneração periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo desta revisão sistemática é avaliar os efeitos das membranas de células-tronco mesenquimais em defeitos periodontais de modelos animais, em comparação a grupos de controle e/ou cirurgias simuladas (SHAM), na regeneração periodontal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de estudo desta revisão sistemática foi registrado no Instituto Nacional de Pesquisa em Saúde PROSPERO (ANEXO A), Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>, número de registro CRD42020200810) (ANEXO B). O estudo de revisão foi elaborado de acordo com as diretrizes dos Itens de Relatório Preferenciais para Revisões Sistemáticas e Metanálises (PRISMA) (28), o Manual Cochrane de Revisões Sistemáticas de Intervenções (29) e a lista de verificação de Revisões.

4.1 Pergunta norteadora

Esta revisão sistemática foi baseada na seguinte questão: "Em defeitos periodontais de modelos animais, MSCSs aumentam a regeneração periodontal em comparação com um grupo controle e / ou cirurgias simuladas (SHAM)?"

4.2 Critérios de elegibilidade

Os critérios de inclusão foram os seguintes: 1) estudos pré-clínicos de modelos animais controlados, 2) MSCSs testados para regeneração de defeitos periodontais, 3) presença de um grupo controle, 4) resultados de regeneração periodontal avaliados por avaliação histológica, histomorfometria, microtomografia computadorizada (micro-CT) ou radiografia.

Os critérios de exclusão foram: estudos clínicos, relatos de casos, estudos *in vitro*, revisões e estudos que não continham informações suficientes sobre a terapia avaliada.

4.2.1 Intervenção e Comparação

Uso de MSCs (grupo teste) em comparação com um grupo controle ou cirurgias simuladas (grupo controle).

4.2.2 Medidas de desfecho

Para avaliar o potencial regenerativo das MSCs, o desfecho primário foi a quantidade de regeneração periodontal no grupo de intervenção em comparação com o grupo controle, avaliada por análise histológica, histomorfometria, Micro-CT ou radiografia.

4.3 Fonte de informação e estratégia de pesquisa

Foram realizadas pesquisas nas bases de dados MEDLINE, Web of Science, EMBASE e LILACS em artigos publicados até outubro de 2021. Termos e palavras-chave de cabeçalhos de assuntos médicos (MeSH) foram combinados com operadores booleanos e usados para pesquisar as bases de dados. As estratégias de pesquisa desenvolvidas para cada banco de dados foram: (“stem cells” OR “stem cell” OR “progenitor cells” OR “progenitor cell” OR “induced pluripotent stem cells” OR “iPS cells” OR “iPS cell” OR “adult stem cells” OR “pluripotent stem cells” OR “pluripotent stem cell” OR “multipotent stem cells” OR “multipotent stem cell” OR “totipotent stem cells” OR “totipotent stem cell” OR “hematopoietic stem cells” OR “hematopoietic stem cell” OR “mesenchymal stromal cells” OR “mesenchymal stromal cell” OR “mesenchymal stem cells” OR “mesenchymal stem cell” OR “mesenchymal progenitor cells” OR “mesenchymal progenitor cell” OR “bone marrow stromal cells” OR “bone marrow stromal cell” OR “stromal cell” OR “bone marrow cells” OR “bone marrow cell” OR “epithelial mesenchymal transition” OR “cell transplantation” OR “stem cell transplantation” OR “mesenchymal stem cell transplantation” OR “hematopoietic stem cell transplantation” OR “peripheral blood stem cell

transplantation" OR "MSC" OR "MSCs" OR "C-MSCs") AND ("cell sheet" OR "cell sheets" OR "cell aggregates" OR "clumps" OR "scaffold-free" OR "xeno-free") AND ("periodontal disease" OR "periodontitis" OR "periodontal defect" OR "alveolar bone loss" OR "periodontal attachment loss" OR "periodontal pocket" OR "vertical defect" OR "furcation" OR "furcation defect" OR "periodontal regeneration" OR "bone regeneration" OR "periodontal healing" OR "regeneration" OR "tissue regeneration").

4.4 Seleção de Estudos

Dois revisores (AHM e DB) avaliaram independentemente os títulos e resumos para determinar seu potencial de inclusão inicial. Eles foram calibrados, nesta primeira fase, pelo uso do kappa (k) de Cohen. Além disso, manuscritos completos foram examinados para decidir se os estudos preenchem os critérios de inclusão. As discordâncias foram resolvidas por discussão com um terceiro revisor (ESR). Os estudos selecionados que preencheram os critérios de inclusão foram submetidos a uma avaliação de validade e extração de dados. Os estudos excluídos e os motivos de sua exclusão foram registrados.

4.5 Coleta de dados

Os dados foram extraídos independentemente por dois revisores (AHM e DB), com discordâncias resolvidas por discussão com um terceiro revisor (MH). Os autores das publicações selecionadas foram contatados para esclarecer os dados ou fornecer dados ausentes quando necessário.

Os seguintes dados foram extraídos e registrados independentemente pelos mesmos revisores: 1) citação, 2) ano de publicação, 3) origem das células-tronco mesenquimais 4) estado de diferenciação celular, 5) número de células transplantadas, 6) número de membranas de células, 7) modelo animal, 8) número de defeitos, 9) número de animais, 10) tipo de defeito, 11) tamanho do defeito, 12)

localização do defeito, 13) tratamento, 14) grupo controle, 15) medidas de resultado 16) conclusões dos autores e 17) fonte de financiamento e conflitos de interesse.

4.6 Risco de viés em estudos individuais

Dois revisores independentes e calibrados (AHM e DB) avaliaram o risco de viés de acordo com a Ferramenta do Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório (SYRCLE) para avaliação do risco de viés (RoB) (30). As discordâncias entre os examinadores foram resolvidas por um terceiro revisor (MH). Com base nesses domínios; viés de seleção, viés de performance, viés de detecção, viés de atrito e viés de relato, o risco de viés foi categorizado como segue: (1) baixo risco de viés se todos os critérios forem atendidos; (2) risco de viés incerto se um ou mais critérios forem parcialmente atendidos; ou (3) alto risco de viés se um ou mais critérios não forem atendidos.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da pesquisa e estudos excluídos

Um total de 3989 artigos potencialmente relevantes para esta revisão foram obtidos dos bancos de dados eletrônicos e busca manual. 2113 foram excluídos após revisão dos títulos e resumos. Nessa primeira fase, foi observada uma excelente concordância entre os dois revisores independentes ($\kappa = 0,93$, Figura 5.1). Os textos completos dos 28 estudos remanescentes foram revisados (3,14–16,31–54) e, destes, 11 (31–36,52–54) foram considerados não elegíveis para inclusão e seus motivos foram relatados (Figura 5.1).

5.2 Características do estudo

As características dos estudos incluídos podem ser observadas em detalhes no Quadro 5.1.

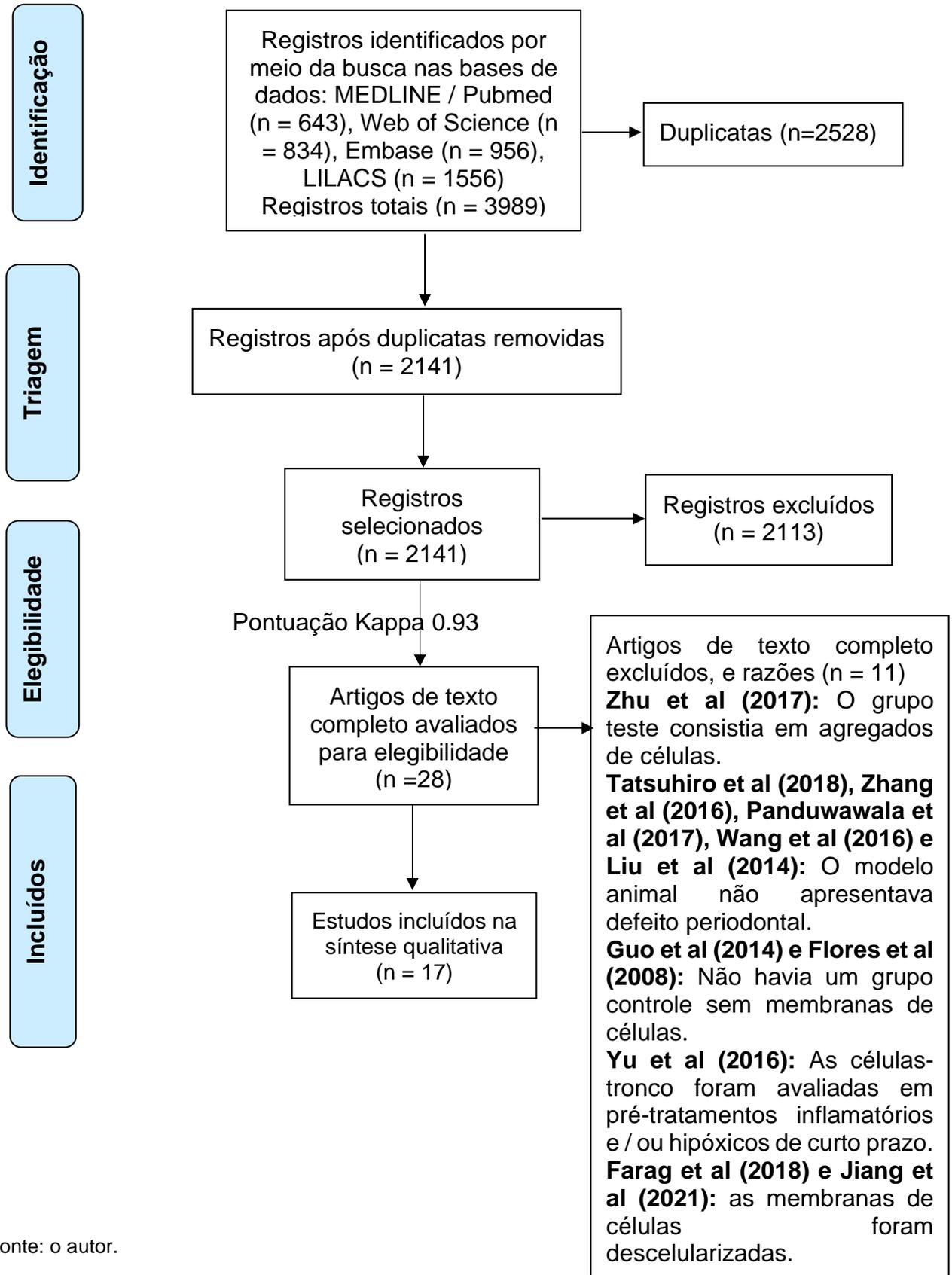
5.3 Modelos experimentais

5.3.1 Modelos animais

Sete estudos trabalharam com cães *Beagle* (15,39,43,46,48,49,51), cinco com ratos (14,40,44,45,47), três com porcos miniatura (3,16,41), um com ovelhas *Merino* (50), e um com camundongos (42).

A maioria dos estudos usou um desenho de boca dividida (3,14–16,39,43,49–51). Além disso, seis pesquisas foram realizadas com desenho paralelo (40–42,44,45,47), e duas utilizaram os dois desenhos (46,48).

Figura 5.1 - Diagrama de fluxo PRISMA para identificar estudos elegíveis



Fonte: o autor.

Quadro 5.1 – Detalhes dos estudos incluídos.

Referência	Origem da célula-tronco / Tipo de Enxerto (número de doadores) / Estado de saúde dos doadores / Caracterização das células-tronco	Sistema de preparação das membranas de células/ Caracterização das membranas de células/ Número de camadas das membranas/ Scaffold e membrana?	Diferenciação celular na aplicação	Modelo Animal/ Tipo de defeito e localização	Grupos/ Tipo de Estudo/ Acompanhamento	Resultados*	Efeitos adversos e outros
Guo e cols, 2017	DF-MSCSs, PDL-MSCSs/ Alógeno (n=5)/ Cães <i>Beagle</i> (características não reportadas)/ Microscopia de imunofluorescência, ensaio de proliferação celular CCK-8, qRT-PCR e Western Blot.	50 µg/mL Vc/ Microscopia de imunofluorescência, qRT-PCR e Western Blot/ Não e não.	Indiferenciadas	5 cães <i>Beagle</i> saudáveis/ Defeitos intra-ósseos de duas paredes (3x3x6mm) foram criados cirurgicamente na face mesial do terceiro e quarto pré-molares mandibulares bilateralmente. Posteriormente, ligadura de seda retentiva de placa bacteriana (3-0) foi colocada por 1 mês.	Grupo teste: Grupo DF-MSCSs (n=5) Grupo PDL-MSCSs (n=5) Grupo controle: Grupo periodontal saudável (n = 5) Grupo de defeitos não enxertados (n = 5)/ Boca dividida/ 3 meses.	Análise Histométrica: Altura do osso novo (mm): Grupo DF-MSCSs: 4,67 ± 0,35 mm (A) Grupo PDL-MSCSs: 3,42 ± 0,26 mm (A) Grupo periodontal saudável: 5,89 ± 0,05 mm (A) Grupo controle: 1,35 ± 0,30 mm (A) Altura do novo cemento (mm): Grupo DF-MSCSs: 5,16 ± 0,23 mm (A) Grupo PDL-MSCSs: 3,84 ± 0,30 mm (A) Grupo periodontal saudável: 6,23 ± 0,07 mm (A) Grupo controle: 2,03 ± 0,21 mm (A) Junção epitelial (mm): Grupo DF-MSCSs: 0,51 ± 0,06 mm (A, B) Grupo PDL-MSCSs: 0,62 ± 0,08 mm (C, D) Grupo periodontal saudável: 1,08 ± 0,04 mm (A, C, E) Grupo controle: 0,66 ± 0,10 mm (B, D, E) Medidas radiográficas: Altura do osso novo Grupo DF-MSCSs: 4,11 ± 0,46 (A) Grupo PDL-MSCSs: 2,92 ± 0,40 (A) Grupo periodontal saudável: 5,51 ± 0,05 (A) Grupo controle: 1,48 ± 0,43 (A) Regeneração periodontal completa foi detectada no grupo DF-MSCSs, enquanto regeneração periodontal parcial com epitélio juncional estendendo-se apicalmente foi observada no grupo PDL-MSCSs.	Imunoensaio turbidimétrico para avaliar complementos séricos (C3, C4), imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) e nível de proteína C reativa de complementos circulantes e anticorpos: Não elicitam respostas imunes fortes do hospedeiro. Histologicamente: nenhuma resposta inflamatória significativa do hospedeiro.

Continua

Continuação

<p>Hasegawa e cols, 2005</p>	<p>PDL-MSCSs/ Xenógeno (n=1)/ Paciente de sexo masculino, 20 anos, sem periodontite/ Microscopia de fluorescência (tipo anticorpo policlonal I), Immunoblotting: integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ e fibronectina.</p>	<p>Polímero termo-responsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm)/ Microscopia de fluorescência, Immunoblotting: integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 1$ e fibronectina. Seções histológicas de membranas de células HPDL coradas com tricromo de azan e H&E/ Não reportado/ Não e não.</p>	<p>Indiferenciadas</p>	<p>6 ratos atímicos/ Os defeitos de deiscência foram realizados removendo manualmente o osso com um cinzel na face mesial do primeiro molar superior bilateralmente.</p>	<p>Grupo teste: PDL-MSCSs (lado direito) (n = 3) Grupo controle: sítios controle com cirurgia SHAM sem transplante (lado esquerdo) (n = 3)/ Boca dividida/ 3 ratos, 1 semana e outros 3 ratos, 4 semanas.</p>	<p>Fibras imaturas recém formadas que ancoraram obliquamente as superfícies de dentina foram observadas no grupo teste. Regeneração de tecido semelhante ao ligamento periodontal foi detectada no grupo teste. Os tecidos gengivais dos lados controle foram destacados das superfícies de dentina radicular no grupo controle e não no grupo de tratamento. Novo osso e anquilose com reabsorção radicular foi detectada apenas no grupo controle. Avaliada com coloração H&E e Azan.</p>	<p>Houve anquilose em alguns cortes histológicos de 3 lados transplantados.</p>
<p>Hu e cols, 2016</p>	<p>DP-MSCSs/ Xenógeno (n=?)/ Terceiros molares impactados humanos normais foram coletados de adultos (19-29 anos de idade)/ Perfil de expressão de moléculas de superfície, ensaio de fibroblastos de unidades formadoras de colônias (CFU-F) e diferenciação multilinhagem.</p>	<p>20 μg/mL Vc / Contagem de células, exame histológico, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV)/ 1 camada de membrana de células 5-6 camadas de células/ Não e não.</p>	<p>Indiferenciadas</p>	<p>12 porcos miniatura Wuzhishan consanguíneos/ Defeitos intra-ósseos de três paredes (5x7x3mm) foram confeccionados com broca cirúrgica na face mesial dos primeiros molares superiores e inferiores. (5 mm de largura, 7 mm de comprimento e 3 mm de profundidade)</p>	<p>Grupo teste: Grupo DP-MSCSs (n=8) Grupo de injeção DP-MSC (n=8) Grupo controle (n=8)/ Boca dividida/ 12 semanas.</p>	<p>Análise Histométrica: Porcentagem de osso no periodonto (%): Grupo DP-MSCSs: 17,4 \pm 5,3% (A) Grupo de injeção de DP-MSC: 12,8 \pm 4,4% (A) Grupo de controle: 7,2 \pm 2,0% (A) Micro-CT: Volume do osso regenerativo (mm³) Grupo DP-MSCSs: 52,7 \pm 4,1 mm³ (A) Grupo de injeção DP-MSC: 32,4 \pm 5,1 mm³ (A) Grupo controle: 1,8 \pm 2,3 mm³ (A) Novo osso, nova camada semelhante ao cimento, nova inserção de fibras de Sharpy e expressão de β-globulina humana positiva foram observados no grupo DP-MSCSs e no grupo de injeção de DP-MSC.</p>	<p>Não houve indução de imunorejeição.</p>

Continuação

Iwata e cols, 2009	PDL-MSCSs/ Autólogo (n=4)/ Cães <i>Beagle</i> (características não reportadas)/ Ensaio de formação de colônias, atividade de fosfatase alcalina (ALP), isolamento de RNA e qRT-PCR.	Polímero termo-responsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm)/ Não reportado/ 3 camadas/ PGA, β TCP e não	Diferenciação osteoindutiva	4 cães Beagle machos/ Defeitos intra-ósseos de três paredes (5x5x4mm) foram criados cirurgicamente na face mesial dos primeiros molares inferiores bilaterais. (5 x 5 x 4 mm de profundidade, largura méso-distal e largura vestibulo-lingual, respectivamente)	Grupo teste: PDL-MSCSs (n=4): PDL-MSCSs +PGA membranas + β TCP. Controle negativo (n=4): apenas membranas de PGA + β TCP/ Boca dividida/ 6 semanas.	Análise Histométrica: Epitélio juncional (mm) PDL-MSCSs: $-0,01 \pm 0,12$ (A) Controle negativo: $0,19 \pm 0,51$ (B) Regeneração óssea (%) PDL-MSCSs: $76,95 \pm 5,08$ (A) Controle negativo: $52,74 \pm 14,34$ (A) Regeneração do cimento (%) PDL-MSCSs: $78,22 \pm 5,50$ (A) Controle negativo: $47,69 \pm 11,10$ (A) Pontuação periodontal (1-5) PDL-MSCSs: $4,63 \pm 0,25$ (A) Controle negativo: $3,50 \pm 0,41$ (A) Micro-CT: A análise de imagens 2D demonstrou quase 50% de preenchimento ósseo no grupo controle, e o preenchimento ósseo completo com um espaço apropriado do ligamento periodontal no grupo PDL-MSCSs. O defeito periodontal ainda foi observado em um modelo virtual 3D após o período de cicatrização de 6 semanas no grupo de controle. Por outro lado, rebordo alveolar completamente preenchido com osso foi observado no grupo PDL-MSCSs.	Não foi observada anquilose.
Liang e cols, 2016	BM-MSCSs/ Alógeno (n=?)/ Ratos SD (características não reportadas)/ As características de MSC foram avaliadas utilizando-se anticorpos anti-rato CD29-FITC, CD45-PE, CD90-PE-Cy5 e CD34-PE seguido por citometria de fluxo, vermelho de alizarina S, oil Red O.	50 μ g/mL Vc/ Coloração H&E, coloração com fosfatase alcalina (ALP) foi medida com o kit de desenvolvimento de cor de fosfatase alcalina BCIP / NBT e incubada em Alizarin Red S, PCR em tempo real/ Não reportado/ Não e não.	Diferenciação osteoindutiva	27 ratos SD de 8 semanas de idade/ Defeitos ósseos intra-ósseos (4x3x3mm) foram realizados cirurgicamente com o uso de brocas esféricas na face mesial dos primeiros molares superiores.	Grupo teste: Cirurgia recebida + BM-MSCSs (n = 9) Cirurgia recebida + EPC-BM-MSCSs (n = 9) Grupo controle (n = 9) Paralelo/ 6 semanas.	Micro-CT: TMD e BV / TV de defeitos transplantados com EPC-BM-MSCSs foram significativamente maiores em relação aos defeitos transplantados com BM-MSCSs e ao grupo controle. Análises histológicas e morfológicas: O grupo EPC-BM-MSCSs formou uma quantidade maior de osso novo e muito mais vasos sanguíneos em comparação com os outros grupos.	Não reportado

Continua

Sun e cols, 2017	H-PDL-MSCSs, P-PDL-MSCSs/ Xenógeno (n=5; n=5)/ Dentes extraídos de humanos saudáveis, com idades entre 16-30 anos e dentes extraídos de humanos com periodontite, com idades entre 30-45 anos/ Citometria de Fluxo.	50 µg/mL Vc/ Coloração com fosfatase alcalina (ALP), coloração com Alizarin Red S (ARS), qRT-PCR, análise de western blot, coloração H&E, microscópio eletrônico de varredura (SEM)/ Não reportado/ Não e não.	Osthole para diferenciação osteoindutiva	15 ratos SD machos/ Os defeitos periodontais (3x2mm) foram confeccionados com uma broca cônica invertida para remover o osso alveolar e o cimento cobrindo as raízes dos molares inferiores.	Grupo controle: Sem cirurgia (n = 3) Cirurgia sem transplante (n = 3) Grupo teste: H-PDL-MSCSs + DMSO (n = 3) P-PDL-MSCSs + DMSO (n = 3) P-PDL-MSCSs + Osthole (n = 3)/ Paralelo/ 4 semanas.	Micro-CT: Na reconstrução 3D, observa-se que P-PDL-MSCSs após o tratamento com Osthole melhorou a restauração do defeito ósseo. Em contraste, P-PDL-MSCSs + DMSO não aumentou a regeneração óssea. Diferença significativa foi observada entre o grupo H-PDL-MSCSs + DMSO e o grupo P-PDL-MSCSs + DMSO; e grupo P-PDL-MSCSs + Osthole e grupo P-PDL-MSCSs + DMSO. O tratamento de Osthole melhorou a formação da membrana de células e melhorou a formação óssea de PDL-MSCSs.	Não reportado
Takewaki e cols, 2017	BM-MSCSs/ Autólogo (n=7)/ 7 cães <i>Beagle</i> de 12 a 20 meses de idade/ Indução osteogênica, adipogênica ou condrogênica.	50 µg/mL Vc/ H&E, vermelho de alizarina S, conteúdo de cálcio (kit Calcium E-test)/ Não reportado/ Não e não.	Indiferenciado Diferenciação osteoindutiva	7 cães <i>Beagle</i> / Defeitos de furca Classe III foram confeccionados com cinzeis ósseos e brocas esféricas nos segundos, terceiros e quartos pré-molares inferiores bilateralmente. Posteriormente, os defeitos foram infundidos com materiais de impressão de alginato (Morita) para induzir a inflamação.	Grupo teste: C-BM-MSCSs (n = 8): C-BM-MSCSs cultivados em GM durante 5 dias. OIM-C-BM-MSCSs (n = 8): C-BM-MSCSs cultivados em OIM por 5 dias. Grupo controle (n = 8): sem enxerto/ Boca dividida e paralelo/ 8 semanas (n=12) and 12 semanas (n=12).	Análise Histológica: Em 8 semanas, o grupo submetido ao transplante de C-BM-MSCSs e OIM-C-BM-MSCSs, apresentou quase toda a superfície radicular desnudada coberta por cimento, ligamento periodontal e osso. Em 12 semanas, C-BM-MSCSs e OIM-C-BM-MSCSs atingiram osso alveolar maduro, ligamento periodontal e cimento. As fibras de Sharpey conectando o osso e o cimento também foram observadas em ambos os grupos. Houve diferença significativa entre C-BM-MSCSs e OIM-C-BM-MSCSs apenas em 8 semanas na porcentagem de área de osso novo e densidade mineral óssea. Outros parâmetros foram semelhantes.	Não reportado
Takizawa e cols, 2019	DP-MSCSs/ Xenógeno (n=3)/ Dentes do siso saudáveis extraídos por motivos ortodônticos (de	50 µg/mL Vc/ Histológico: coloração HE, fosfatase alcalina, vermelho de alizarina e coloração de von Kossa. Marcadores de células de	Diferenciação osteoindutiva	Ratos SD machos de 6 semanas de idade/ Ligadura cervical do segundo molar	Grupo controle (n = 3): DP-MSCSs que foram mantidos por 4 semanas Grupo defeito ósseo (n = 11) Grupo teste (n =	Micro-CT: Diferença significativa entre o grupo teste e o grupo controle. Grupo controle vs grupo defeito ósseo ($p < 0,05$)	Nenhuma inflamação foi observada.

Continuação

	mulheres de 22 e 24 anos e de um homem de 27 anos)/ Ki - 67 e vermelho de alizarina.	imunocoloração CD29, CD44, CD105, CD146 e STRO-1/ Não reportado/ Membrana amniótica e não.		superior com fio por 4semanas.	5): os DP-MSCSs cultivados induzidos a se diferenciar em osso/ Paralelo/ 4 semanas.		
Tsumanum a e cols, 2011	BM-MSCSs, PDL-MSCSs, AP-MSCSs/ Autólogo (n=4)/ 4 cães <i>Beagle</i> saudáveis (10 kg, machos)/ Não reportado.	Polímero termorresponsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm) / Proliferação de PDLSC/ 3 camadas/ PGA e não.	Diferenciação osteoindutiva	4 cães <i>Beagle</i> machos saudáveis (10 kg)/ Defeitos intra-ósseos de uma parede (5x5mm) foram criados cirurgicamente nos lados mesial e distal dos terceiros pré-molares inferiores e na mesial dos primeiros molares inferiores bilateralmente. (5 x 5 mm de profundidade, largura mesio-distal).	Grupo controle (n=4): PGA+ β TCP/collagen. Grupo teste: Grupo BM-MSCSs (n=4): PGA+ β TCP/colágeno + BM-MSCSs. Grupo PDL-MSCSs (n=4): PGA + β TCP/colágeno + PDL-MSCSs. Grupo AP-MSCSs (n=4): PGA + β TCP/colágeno + AP-MSCSs./ Boca dividida/ 8 semanas.	Análises Histométricas: Espessura do cimento recém formado (μ m) Grupo PDL-MSCSs: 14,37 \pm 4,38 (A, B) Grupo BM-MSCSs: 7,80 \pm 2,67 (C) Grupo AP-MSCSs: 3,99 \pm 2,64 (A) Controle: 6,59 \pm 2,82 * (B) Pontuação periodontal (1 - 5) Grupo PDL-MSCSs: 4,00 \pm 1,41 (A) Grupo BM-MSCSs: 3,38 \pm 0,95 (B) Grupo AP-MSCSs: 2,63 \pm 0,48 (C) Controle: 1,75 \pm 0,96 (A) Taxa de regeneração óssea (%) Grupo PDL-MSCSs: 72,28 \pm 32,56 (A) Grupo BM-MSCSs: 72,05 \pm 12,92 (B) Grupo AP-MSCSs: 67,63 \pm 21,56 (C) Controle: 67,51 \pm 14,26 (D) Comprimento do epitélio juncional (mm) Grupo PDL-MSCSs: 0,15 \pm 0,30 (A) Grupo BM-MSCSs: 0,49 \pm 0,97 (B) Grupo AP-MSCSs: 0,63 \pm 0,52 (C) Controle: 0,64 \pm 0,46 (D) Os sinais NFP-positivos foram observados nos dois terços coronais do PDL regenerado apenas no grupo PDL-MSCSs. Os vasos sanguíneos positivos para CD31 foram observados no PDL regenerado de todos os grupos (dados não são mostrados).	Nenhuma anquilose ou reabsorção radicular foi observada em nenhuma das amostras.

Continua

Tsumanum a e cols, 2016	PDL-MSCSs/ Autólogo, alógeno (n=4)/ 4 cães <i>Beagle</i> saudáveis (10 kg, machos de 1 a 2 anos de idade)/ Citometria de fluxo, ensaio de diferenciação (diferenciação osteogênica e adipogênica) e atividade da fosfatase alcalina.	Polímero termo-responsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm) (35 mm em diâmetro) (UpCell; CellSeed)/ Não reportado/ 3 camadas/ Membrana PGA e GTR absorvível.	Suplementos osteoindutivos para produzir a membrana de células	8 cães <i>Beagle</i> machos saudáveis (10 kg, 1 a 2 anos)/ Defeitos horizontais foram criados cirurgicamente com cinzeis ósseos e brocas esféricas nos lados mesial e distal do terceiro e quarto pré-molar mandibular.	Grupo controle (n = 4): PGA + β -TCP / colágeno Grupo teste: Grupo autólogo (n = 4): PDL-MSCSs + PGA + β -TCP / colágeno Grupo alógeno (n = 4): PDL-MSCSs + PGA + β -TCP / colágeno/ Boca dividida e paralelo/ 8 semanas.	No grupo alogênico, fibras de colágeno densas encontradas aderidas perpendicularmente à camada de tecido semelhante ao cimento. Nenhuma diferença significativa nas análises histométricas (grupos autólogos vs alógenos). Nenhuma diferença significativa para a altura de regeneração óssea na Micro-CT e análises histométricas. Taxa de regeneração do cimento no grupo alógeno significativamente maior do que no grupo controle. Nenhuma diferença significativa nas concentrações séricas de CRP, IFN-c, IL-10 ou CD30 (grupos autólogos vs alógenos).	A anquilose não apresentou diferenças significativas entre os grupos. 8 semanas após o transplante, nenhuma infecção visível, supuração ou reações adversas foram observadas.
Vaquette e cols, 2019	BM-MSCSs, PDL-MSCSs, G-MSCSs/ Autólogo (n=10)/ 10 ovelhas <i>Merino</i> (características não relatadas)/ Mineralização com Alizarina vermelha.	50 μ g/mL Vc/ Não reportado/ Implante de construção multifásica/ Policaprolactona e membrana eletrofiada.	Diferenciação osteoindutiva	10 ovelhas <i>Merino</i> / Os defeitos de deiscência (6x5mm) foram confeccionados cirurgicamente com brocas esféricas removendo bilateralmente o osso alveolar e o cimento envolvendo as raízes do segundo pré-molar inferior e primeiro molar (4 defeitos por animal, 6 mm de altura x 5 mm de largura).	Grupo controle (n = 10): suporte bifásico não celularizado Grupos testes: G-MSCSs no suporte bifásico (n = 10) BM-MSCSs no suporte bifásico (n = 10) PDL-MSCSs no suporte bifásico (n = 10) / Boca dividida/ 5 semanas e 10 semanas.	Análise Histomorfolométrica: Preenchimento ósseo (%) 5 semanas Controle: 11,44 \pm 13,61 (A) G-MSCSs: 9,31 \pm 9,96 (B) BM-MSCSs: 9,49 \pm 6,65 (C) PDL-MSCSs: 8,25 \pm 5,96 (D) Espessura do cimento (μ m) 5 semanas Controle: 38,84 \pm 15,79 (A) G-MSCSs: 71,83 \pm 11,37 (A) BM-MSCSs: 47,49 \pm 23,05 (B) PDL-MSCSs: 77,88 \pm 124,57 (C) Cobertura do cimento (%) 5 semanas Controle: 53,73 \pm 25,25 (A) G-MSCSs: 64,70 \pm 30,64 (B) BM-MSCSs: 35,42 \pm 21,89 (C) PDL-MSCSs: 72,28 \pm 26,20 (C) Adesão de ligamento (%) 5 semanas Controle: 28,02 \pm 10,99 (A) G-MSCSs: 20,88 \pm 10,27 (B) BM-MSCSs: 33,58 \pm 24,13 (C) PDL-MSCSs: 28,94 \pm 8,68 (D) Regeneração periodontal (%) 5 semanas Controle: 17,21 \pm 13,37 (A) G-MSCSs: 11,67 \pm 12,35 (B) BM-MSCSs: 6,83 \pm 5,48 (C) PDL-MSCSs: 15,38 \pm 4,13 (D)	Excelente integração da estrutura bifásica com os tecidos circundantes. Efeito adverso não relatado.

Continuação

					<p>Preenchimento ósseo (%) 10 semanas Controle: 13,33 ± 5,75 (A) G-MSCSs: 11,30 ± 7,19 (B) BM-MSCSs: 21,82 ± 10,78 (B) PDL-MSCSs: 16,29 ± 5,74 (C)</p> <p>Espessura do cimento (µm) 10 semanas Controle: 119,11 ± 45,65 (A) G-MSCSs: 122,46 ± 65,35 (B) BM-MSCSs: 57,58 ± 17,33 (C) PDL-MSCSs: 90,88 ± 33,59 (D)</p> <p>Cobertura de cimento (%) 10 semanas Controle: 69,59 ± 30,32 (A) G-MSCSs: 73,20 ± 23,95 (B) BM-MSCSs: 102,83 ± 30,41 (C) PDL-MSCSs: 96,22 ± 4,02 (D)</p> <p>Adesão de ligamento (%) 10 semanas Controle: 43,98 ± 22,13 (A) G-MSCSs: 28,87 ± 10,82 (B) BM-MSCSs: 62,25 ± 28,32 (C) PDL-MSCSs: 79,10 ± 20,22 (B)</p> <p>Regeneração Periodontal (%) 10 semanas Controle: 49,91 ± 23,53 (A) G-MSCSs: 17,86 ± 14,39 (B, C) BM-MSCSs: 58,99 ± 19,52 (B) PDL-MSCSs: 62,19 ± 20,01 (C)</p> <p>Em 5 semanas: 10% de preenchimento ósseo; Em 10 semanas: 30% de preenchimento ósseo para todos os grupos, exceto G-MSCSs. Preenchimento ósseo médio: 10%.</p> <p>Em 5 semanas: Pouca histomorfometria quantitativa na área ocupada pelo osso em 5 e 10 semanas. Alto nível de deposição do cimento em ambos os momentos (> 50% de cobertura independentemente dos grupos e a espessura do cimento estava na faixa de 50 a 100 µm).</p> <p>Em 5 semanas: adesão de ligamento em torno de 30% para todos os grupos. Em 10 semanas: aumento significativo para o grupo PDL-MSCSs (grupo PDL-MSCSs significativamente superior ao grupo G-MSCSs).</p> <p>Regeneração periodontal, definida como a</p>
--	--	--	--	--	---

Continuação

						presença de fibras periodontais perpendiculares inseridas no osso e no cimento: Em 5 semanas: <25% para todos os grupos; em 10 semanas: aumentou significativamente para todos os grupos, exceto G-MSCSs.	
Wei e cols, 2012	PDL-MSCSs/ Autólogo (n=9)/ 9 porcos miniatura consanguíneos com 12 meses de idade (peso 40–50 kg)/ Perfil de expressão de superfície, moléculas e diferenciação multi-linhagem, tricrômico de Goldner, PCR em tempo real.	20 µg / mL Vc (x 10 dias. Diferentes concentrações de Vc) e placa de cultura responsiva à temperatura (placa UpCell, como controle)/ Exame histológico, Transmissão Eletrônica Microscopia (TEM), qRT-PCR e Western Blot/ 2 - 3 camadas/ Não e não.	Indiferenciadas	9 porcos miniatura consanguíneos de 12 meses de idade (40-50 kg)/ Defeitos infraósseos (3x7x5mm) foram criados com broca cirúrgica na face mesial dos primeiros molares superiores e inferiores. (3 mm de largura, 7 mm de comprimento e 5 mm de profundidade (Liu et al, 2008)).	Grupo PDL-MSCSs induzido por Vc (n = 6) Grupo PDL-MSCSs de placa UpCell (n = 6) Gelfoam scaffolds + grupo autólogo dissociado PDL-MSC (n = 6): PDLSC combinado com gelfoam/ Boca dividida/ 12 semanas.	O epitélio sulcular era fino e plano em PDL-MSCSs induzidos por Vc e PDL-MSCSs UpCell; mas muito mais espesso em PDL-MSCSs dissociados. As fibras de Sharpey foram formadas em PDL-MSCSs induzidos por Vc, PDL-MSCSs de placa UpCell e PDL-MSC dissociados; mas irregular no PDL-MSC dissociado. A porcentagem de osso alveolar foi significativamente maior em PDL-MSCSs induzidos por Vc e PDL-MSCSs de placa UpCell do que no PDL-MSC dissociado e significativamente maior nos PDL-MSCSs induzidos por Vc.	Excelente integração da estrutura bifásica com os tecidos circundantes. Efeito adverso não relatado.

Continua

Yang, 2019	DF-MSCSs/ Alógeno (n=?)/ Cães <i>Beagle</i> de 2 meses/ Não reportado	50 µg/mL Vc/ Não reportado/ Não reportado/ TDMP, HA/β-TCP e não.	Indiferenciadas	4 cães <i>Beagle</i> machos (1-5 anos)/ Defeitos intra- ósseos de uma parede (5x4mm) foram criados cirurgicamente na face mesial dos quarto pré- molares inferiores bilateralmente.	Grupo branco (grupo controle), Grupo HA / β-TCP Grupo TDMP Grupo DF-MSCSs Grupo HA / β-TCP + DF-MSCSs Grupo TDMP + DF-MSCSs/ Boca dividida/ 8 semanas.	<p>Análises Histométricas (média ± DP): Adesão do tecido conjuntivo (mm) Controle: 0,99 ± 0,49 (A) HA / β-TCP: 0,85 ± 0,12 (B) TDMP: 0,96 ± 0,15 (C) DF-MSCSs: 0,90 ± 0,17 (D) HA + DF-MSCSs: 0,74 ± 0,34 (E) TDM + DF-MSCSs: 0,72 ± 0,21 (D)</p> <p>Altura de regeneração do cimento (mm) Controle: 1,12 ± 0,24 (A, B, C, D, E) HA / β-TCP: 2,32 ± 0,33 (A) TDMP: 2,27 ± 0,37 (B, F) DF-MSCSs: 2,20 ± 0,31 (C, G) HA + DF-MSCSs: 2,13 ± 0,47 (D, H) TDM + DF-MSCSs: 2,79 ± 0,24 (E, F, G, H)</p> <p>Largura do cimento (µm) Controle: 13,58 ± 6,62 (A, B, C) HA / β-TCP: 17,39 ± 7,23 (D, E) TDMP: 13,27 ± 8,58 (F, G) DF-MSCSs: 34,19 ± 18,71 (A, D, H) HA + DF-MSCSs: 35,46 ± 18,46 (B, E, F) TDM + DF-MSCSs: 35,26 ± 17,45 (C, H, G)</p> <p>Espessura periodontal (µm) Controle: 201,10 ± 41,27 (A, B) HA / β-TCP: 254,18 ± 183,07 (C, D) TDMP: 226,99 ± 63,86 (E, F) DF-MSCSs: 154,72 ± 58,07 (C, E, G, H) HA + DF-MSCSs: 130,24 ± 46,82 (A, D, G) TDM + DF-MSCSs: 136,22 ± 46,48 (B, F, H)</p> <p>Pequena quantidade de formação de osso novo na parte inferior do defeito no grupo controle em 8 semanas. As partículas de TDMP e HA / β-TCP não foram totalmente absorvidas. Maior formação de osso novo nos grupos de materiais em comparação com os grupos sem o uso de materiais. O tecido ósseo era mais denso e o espaço do ligamento periodontal formou-se nos grupos com DF-MSCSs em comparação com os grupos sem DF-MSCSs.</p>	Não reportado
------------	---	--	-----------------	--	--	--	---------------

Continua

Continuação

Akizuki e cols, 2015	PDL-MSCSs/ Autólogo (n=5)/ Cães <i>Beagle</i> saudáveis/ Não reportado.	Polímero termo-responsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm)/ Não reportado/ 1 camada/ Ácido hialurônico e não.	Indiferenciadas	5 cães <i>Beagle</i> saudáveis/ Os defeitos de deiscência (5 mm x 5 mm) foram preparados cirurgicamente na face vestibular das raízes mesiais dos primeiros molares inferiores bilateralmente.	Grupo controle (n=5) Grupo teste: grupo PDL-MSCSs (n=5)/ Boca dividida/ 8 semanas.	Análise Histométrica Altura do defeito Grupo PDL-MSCSs: 4,42 ± 0,25 (A) Grupo controle: 4,39 ± 0,25 (B) Osso novo Grupo PDL-MSCSs: 0,70 ± 0,79 (A) Grupo controle: 0,26 ± 0,58 (B) Novo cimento Grupo PDL-MSCSs: 2,42 ± 1,29 (A) Grupo controle: 1,78 ± 0,93 (A) Adesão do tecido conjuntivo Grupo PDL-MSCSs: 3,59 ± 0,36 (A) Grupo controle: 3,50 ± 0,35 (B) No grupo controle, nem osso nem cimento foi formado em quatro defeitos. Nessas amostras de controle, o tecido conjuntivo existia adjacente à superfície da raiz desnudada. A orientação do tecido conjuntivo adjacente à superfície radicular era paralela à superfície da raiz. No grupo teste, regeneração do tecido periodontal com formação de osso, cimento e ligamento periodontal foi observada em três dos cinco defeitos. Além disso, se observou nesse mesmo grupo fibras de colágeno inseridas perpendicularmente no osso recém formado e no cimento e também ligamento periodontal recém formado com ricos vasos capilares.	Sem efeitos adversos. Os sinais de anquilose eram observados em alguns espécimes
Dan e cols, 2014	PDL-MSCSs, AP-MSCSs, G-MSCSs / Xenógeno (n=?)/ Terceiro molar de uma mulher de 25 anos/ Mineralização (coloração de Von Kossa), formação de hidroxiapatita, coloração com Vermelho de alizarina S e expressão de RNAm da	Polímero termo-responsivo (placas de cultura de células enxertadas com PIPAAm)/ Não reportado/ Não reportado/ CaP-PCL <i>scaffold</i> e membrana de PCL.	Diferenciação osteoindutiva	30 ratos atímicos (<i>Rattus norvegicus</i> , <i>Strain-CBH-rnu / Arc</i>) / O modelo de defeito da fenestração periodontal (3 x 1,5 mm) foi criado cirurgicamente nas raízes dos primeiros molares inferiores.	Grupo controle: Grupo em branco (n = 6): defeito sozinho Grupo <i>scaffold</i> (n = 6): defeito com o <i>scaffold</i> CaP-PCL Grupo teste: Grupo PDL-MSCSs (n = 6): PDL-MSCSs + CaP-PCL <i>scaffold</i> G-MSCSs (n = 6): G-MSCSs + CaP-PCL <i>scaffold</i> AP-MSCSs (n = 6): AP-MSCSs + CaP-PCL <i>scaffold</i>	Formação de osso novo Em 4 semanas, os grupos <i>scaffold</i> , AP-MSCSs e PDL-MSCSs tinham uma porcentagem significativamente maior de cobertura óssea em comparação com o grupo em branco. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre o grupo G-MSCSs e o grupo em branco. As membranas G-MSCSs não promoveram a regeneração periodontal e inibiram a formação óssea dentro do <i>scaffold</i> CaP-PCL. Nova formação de cimento: Em 4 semanas, os grupos AP-MSCSs e PDL-MSCSs geraram mais cimento do que os outros grupos. Os grupos em branco e G-MSCSs não regeneraram cimento. Formação de novo ligamento periodontal: Os grupos em branco e G-MSCSs não geraram	Não reportado

Continuação

	Bonesialoproteína.				Paralelo/ 1 e 4 semanas.	fibras do ligamento periodontal orientadas (> 60°). Em 4 semanas, os grupos PDL-MSCSs tinham fibras do ligamento periodontal mais funcionalmente orientadas do que todos os outros grupos. O grupo AP-MSCSs exibiu fibras do ligamento periodontal significativamente mais bem orientadas do que o grupo em branco.	
Ding e cols, 2010	PDL-MSCSs/ Autólogo, alógeno (n=?)/ Porcos miniatura consanguíneos Wuzhishan fêmeas e Guizhou machos (minipig; 6 a 8 meses de idade, peso 30–40 kg)/ Citometria de fluxo, diferenciação osteogênica e adipogênica	40 mg de hidroxiapatita / fosfato tricálcico (HA / TCP)/ Não reportado/ 2 camadas/ HA/TCP <i>scaffold</i> e membrana de gelatina.	Indiferenciadas	15 porcos miniatura Wuzhishan fêmeas/ Defeitos periodontais (3x7x5mm) foram criados cirurgicamente na região mesial dos primeiros molares superiores e inferiores. Posteriormente, o fio de seda 4-0 foi suturado ao redor da porção cervical. (3 mm de largura, 7 mm de comprimento e 5 mm de profundidade) (Liu 2008).	Grupo controle (n = 6): apenas com terapia periodontal inicial Grupo HA / TCP (n = 6): HA / TCP <i>scaffolds</i> . Grupo autólogo PDL-MSCSs (n = 6): PDL-MSCSs autólogos + HA / TCP <i>scaffolds</i> . Grupo alógeno PDL-MSCSs (n = 6): PDL-MSCSs alógenas de porcos miniatura Guizhou masculinos + HA / TCP <i>scaffolds</i> Grupo de células PDL heterogênicas autólogas (pPDLs) (n = 6): membranas de pPDLs autólogas + HA / TCP <i>scaffolds</i> / Paralelo/ 12 semanas.	Porcentagens de osso periodontal Grupo controle: 10,1% ± 2,2% (A, B, G) Grupo HA / TCP: 8,3% ± 1,9% (C, D, H) Grupo autólogo PDL-MSCSs: 38,6% ± 2,3% (A, C, E) Grupo alógeno PDL-MSCSs: 35,7% ± 2,8% (B, D, F) Grupo de pPDLs autólogos: 18,9% ± 3,3% (E, F, G, H) O osso alveolar nos grupos autólogo e alógeno PDL-MSCSs foi recuperado para níveis quase normais de acordo com a tomografia computadorizada. A coloração H&E mostrou que o novo osso, cimento e ligamento periodontal foram regenerados em ambos os grupos autólogo e alógeno PDL-MSCSs. A profundidade de sondagem, recessão gengival e perda de inserção foram significativamente melhoradas em grupos PDL-MSCSs alógenos ou PDL-MSCSs autólogos em comparação com grupos de controle HA / TCP e PDLs autólogos.	Sem efeitos adversos. Sem rejeições imunológicas.
Raju e cols, 2020	PDL-MSCSs / Xenógeno (n=?)/ Ratos SD machos com 4-5 semanas de idade (características não reportadas)/ Morfologia celular por microscópio	Polímero termo-responsivo (UpCell dish)/ Observação morfológica por microscópio óptico e estereomicroscópio, análise imunohistoquímica, hibridização	Indiferenciadas	Camundongos fêmeas <i>CB17/1cr-scld/scld</i> / Defeitos periodontais (2x0,5x1,5mm) foram criados cirurgicamente no osso	Grupo controle: Grupo de tecido periodontal natural: sem defeito periodontal (n = 4) Grupo de defeito periodontal: defeito periodontal no dia 1 (n = 4) Grupo controle:	Micro-CT: O volume do osso regenerado (volume do osso / volume do tecido; BV / TV) não apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o grupo do complexo de membranas de células. No entanto, esse último grupo foi significativamente maior do que o grupo PDL-MSCSs e controle. Alta formação de matriz mineralizada com um espaço PDL apropriado foi observada em cortes	Não reportado

Conclusão

de luz, PCR semiquantitativa para identificação dos genes relacionados a cada tipo de célula.	fluorescente <i>in situ</i> (fiSH), coloração com vermelho de alizarina/ 1 camada de membranas de células de MC3T3-E1 e 1 camada de PDL-MSCSs/ Não e não.		palatino dos primeiros molares superiores. (2 mm de comprimento x 0,5 mm de largura x 1,5 mm de profundidade).	defeito periodontal sem transplante de membranas de células após 8 semanas (n = 6) Grupo teste: Grupo PDL-MSCSs: apenas PDL-MSCSs (n = 6) Grupo do complexo de membranas de células (2X): membranas de células <i>MC3T3-E1</i> + PDL-MSCSs (n = 6)/ Paralelo/ 8 semanas.	coronais 3D nas porções anterior, média e posterior do dente e no local da lesão no grupo do complexo de membranas de células e grupo de tecido periodontal natural. Em contraste, a recuperação parcial dos defeitos com tecido mineralizado foi observada nos grupos controle e PDL-MSCSs. Análise histológica: A coloração por H&E revelou fibras semelhantes a PDL e formação de tecido semelhante a osso no grupo do complexo de membranas de células. A coloração de Tricromo de Azan mostrou conexões funcionais de fibras semelhantes a PDL à superfície da raiz semelhante ao PDL natural.	
<p>* As mesmas letras indicam diferença estatisticamente significativa (p <0,05)</p> <p>MSCSs, membranas de células-tronco mesenquimais AP-MSCSs, MSCSs periosteais alveolares; BM-MSCSs, MSCSs da medula óssea; BV, volume ósseo, βTCP, fosfato β-tricálcio poroso C-BM-MSCSs, aglomerados de um complexo BM-MSCSs / matriz extracelular (ECM) DF-MSCSs, MSCSs do folículo dentário; DP-MSCSs, MSCSs da polpa dentária; DMSO, dimetilsulfóxido EPC, células progenitoras endoteliais G-MSCSs, MSCSs gengivais; GM, meio de crescimento; GTR, regeneração tecidual guiada HA / β-TCP, hidroxiapatita e fosfato tricálcico; H-PDL-MSCSs, MSCSs do ligamento periodontal saudável; H&E, hematoxilina e eosina Micro-CT, micro tomografia computadorizada; MSC, células-tronco mesenquimais OIM, meio osteoindutivo PCL, policaprolactona; PDL, ligamento periodontal; PDL-MSCSs, MSCSs do ligamento periodontal; PGA, tecido de ácido poliglicólico; PIPAAm, polímero poli (N-isopropilacrilamida); P-PDL-MSCSs, ligamento periodontal MSCSs com periodontitis qRT-PCR, reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real Ratos SD, ratos Sprague-Dawley; TDMP, partículas tratadas da matriz de dentina; TMD, densidade mineral do tecido; TV, volume de tecido Vc, vitamina C</p>						

Fonte: o autor.

5.3.2 Modelos experimentais de defeito

Variabilidades na morfologia do defeito foram observadas entre os estudos. A maioria dos defeitos foi criada cirurgicamente (3,14–16,39–46,48–51), dos quais, além da cirurgia, dois estudos usaram ligadura de seda retentiva de placa bacteriana (41,43) e outros materiais de impressão de alginato (46) para induzir um microambiente inflamatório. Por outro lado, um estudo utilizou apenas ligaduras de fio metálico para a confecção do modelo do defeito ósseo alveolar (47).

5.4 Membranas de células-tronco mesenquimais e *scaffolds*

Foram utilizados enxertos autólogos (3,15,39,46,49,50), alógenos (43,44,51) e xenógenos (14,16,40,42,45,47). Apenas dois estudos utilizaram transplantes autólogos e alógenos (41,48). Além disso, cinco fontes diferentes de MSCs foram descritas. Entre eles, DF-MSCs foram usados em dois ensaios (43,51). PDL-MSCs foram utilizados em doze estudos (3,14,15,39–43,45,48–50). DP-MSCs foram usados em dois estudos (16,47). BM-MSCs foram usados em quatro ensaios (44,46,49,50). Finalmente, AP-MSCs (40,49) e G-MSCs (40,50) foram utilizados em dois estudos.

Em relação ao protocolo de indução de células, a maioria dos estudos utilizou vitamina C (Vc) (3,16,43,44,46–51). Outros usaram placas de cultura tratadas com polímero termicamente reativo (3,14,15,39,40,42,48). Além das membranas de células-tronco, metade de todos os estudos usaram *scaffolds* (15,39–41,47,51). Aliás, um estudo destacou os melhores resultados na regeneração óssea periodontal obtidos por PDL-MSCs induzidos por Vc em comparação com a técnica responsiva à temperatura (3).

5.5 Efeitos adversos

Cinco estudos relataram ausência de inflamação local (39,41,43,47,50). Três estudos não revelaram imunorejeição (16,41,43). Em relação à anquilose como efeito colateral no grupo de tratamento, não foi observada em dois estudos (15,49). Ao contrário, três estudos relataram anquilose em cortes histológicos (14,39,48). Outros estudos falharam em relatar informações sobre a segurança da intervenção (3,40,42,44–46,51).

5.6 Avaliação da qualidade do estudo e risco de viés

De acordo com a ferramenta para avaliar risco de viés (RoB) da SYRCLE, 170 entradas foram obtidas a partir das dez perguntas de sinalização relevantes. Destes, 44% das entradas revelaram um RoB baixo, 55% um RoB incerto e 1% um RoB alto (Quadro 5.2).

Em relação à avaliação do viés de seleção no item 1, seis estudos foram considerados com baixo RoB (3,16,41,45,46,51). Eles apenas mencionaram uma geração de sequência aleatória, mas falharam em relatar qual método de randomização foi aplicado.

Todos os estudos em animais apresentaram baixo RoB no domínio das características basais que pertencem ao Item 2. Na primeira pergunta de sinalização adicional, quatro estudos foram considerados como RoB incerto (3,40,42,50) devido à falta de informações importantes relacionadas às características dos animais, como sexo, idade e peso.

No item 3, todos os estudos foram considerados como tendo um RoB incerto porque eles não relataram nenhuma ocultação de alocação.

Ao considerar a avaliação de viés de performance, todos os estudos foram determinados como incerto para alojamento aleatório e cegamento do investigador pelo conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu no item 4 e 5, respectivamente. Da mesma forma, o item 6, que avalia se os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados, todos os estudos foram considerados como tendo um RoB obscuro. Além disso, a maioria dos estudos no item 7 indicou RoB Incerto. Por outro lado, quatro estudos apresentaram baixo RoB

(15,39,48,49) devido ao cegamento do avaliador do desfecho; no entanto, todos eles não referiram o método para assegurá-lo.

Com relação ao viés de atrição, quase todos os estudos apresentaram baixo RoB para dados de desfecho incompletos no item 8. Ao contrário, apenas um estudo foi avaliado incerto (48). O item 9, que analisa o viés de relato, foi respondido como Sim em todos os estudos e, conseqüentemente, um RoB baixo. A maioria dos estudos aparentemente estava isenta de outros problemas que poderiam resultar em alto RoB, conforme mostrado no item 10.

Quadro 5.2 - Avaliação do risco de vies dos estudos pré-clínicos incluídos usando a ferramenta SYRCLE

Ferramenta SYRCLE para avaliar o risco de vies em estudos em animais	Estudos																	
	Guo 2017	Hasegawa 2005	Hu 2016	Iwata 2009	Liang 2016	Sun 2017	Takevaki 2017	Takizawa 2019	Tsumanuma 2011	Tsumanuma 2016	Vaquette 2019	Wei 2012	Yang 2019	Akizuki 2015	Dan 2014	Ding 2010	Raju 2020	
1	A sequência de alocação foi gerada e aplicada adequadamente?	Incerto	Incerto	Sim*	Incerto	Incerto	Sim*	Sim*	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Sim*	Sim*	Incerto	Incerto	Sim*	Incerto
	* Os investigadores descreveram um componente aleatório no processo de geração de sequência, como: Referindo-se a uma tabela de números aleatórios; Usando um gerador de números aleatórios de computador.	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
2	Os grupos foram semelhantes no início do estudo ou foram ajustados para fatores de confusão na análise?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incerto
	* A distribuição das características relevantes no baseline foi balanceada para os grupos de intervenção e controle?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incerto	Incerto	Sim	Sim	Incerto	Yes	Incerto
	* Se relevante, os investigadores ajustaram adequadamente a distribuição desigual de algumas características relevantes do baseline na análise?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incerto	Sim	Sim	Sim	Incerto
	* O momento da indução da doença foi adequado?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
3	A alocação aos diferentes grupos foi ocultada de forma adequada durante o processo?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto

Continua

Continuação

	* O investigador que alocou os animais para o grupo de intervenção ou controle não pode prever a atribuição devido a um dos seguintes métodos ou métodos equivalentes? Codificação de terceiros da randomização central de alocação do grupo experimental e controle por um terceiro Envelopes selados opacos, numerados sequencialmente.	Incerto																	
4	Os animais foram alojados aleatoriamente durante o experimento?	Incerto																	
	* Os autores colocaram aleatoriamente as gaiolas ou animais dentro da sala / instalação dos animais? Os animais foram selecionados aleatoriamente durante a avaliação dos resultados.	Incerto																	
	* É improvável que o resultado ou a medição do resultado tenha sido influenciado por não alojar os animais aleatoriamente?	Sim																	
5	Os cuidadores e / ou investigadores ficaram cegos quanto ao conhecimento de qual intervenção cada animal recebeu durante o experimento?	Incerto																	
	* Foi garantido o cegamento dos cuidadores e investigadores, e foi improvável que o cegamento pudesse ter sido quebrado?	Incerto																	
6	Os animais foram selecionados aleatoriamente para avaliação dos resultados?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Sim	Incerto												

Continua

Continuação

	* Os investigadores escolheram aleatoriamente um animal durante a avaliação do resultado ou usaram um componente aleatório na geração da sequência para avaliação do resultado?	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Sim	Incerto											
7	O avaliador do resultado ficou cego?	Incerto	Incerto	Incerto	Sim	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Sim	Sim	Incerto	Incerto	Incerto	Sim	Incerto	Incerto	Incerto
	* O cegamento do avaliador de resultados foi garantido e foi improvável que o cegamento pudesse ter sido quebrado?	Incerto	Incerto	Incerto	Sim*	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Sim*	Sim*	Incerto	Incerto	Incerto	Sim*	Incerto	Incerto	Incerto
	* O avaliador do resultado não foi cegado, mas os autores da revisão julgam que o resultado provavelmente não será influenciado pela falta de cegamento?	Incerto	Incerto	Incerto	Não	Incerto	Incerto	Incerto	Incerto	Não	Não	Incerto	Incerto	Incerto	Não	Incerto	Incerto	Incerto
8	Os dados dos resultados incompletos foram tratados de forma adequada?	Sim	Incerto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incerto								
	* Todos os animais foram incluídos na análise?	Sim	Incerto	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Incerto								
	* As razões para a falta de dados do resultado provavelmente não estavam relacionadas ao resultado verdadeiro? (por exemplo, falha técnica)	Sim																
	* Os dados de resultados perdidos foram balanceados em números entre os grupos de intervenção, com motivos semelhantes para dados perdidos entre os grupos?	Incerto																
	* Os dados de resultados ausentes foram imputados usando métodos apropriados?	Incerto																

Continua

Conclusão

9	Os relatórios do estudo são isentos de relatos seletivos de desfecho?	Sim																
	* O protocolo do estudo estava disponível e todos os resultados primários e secundários pré-especificados do estudo foram relatados no manuscrito atual?	Sim																
	* O protocolo do estudo não estava disponível, mas estava claro que o relatório publicado incluía todos os resultados esperados (ou seja, métodos de comparação e seção de resultados)?	Sim																
10	O estudo estava aparentemente livre de outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim											
	* O estudo estava livre de contaminação (pooling de drogas)?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim											
	* O estudo não teve influência inadequada dos financiadores?	Sim																
	* O estudo estava livre de erros de unidade de análise?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim											
	* Os riscos de desenho específicos do projeto estavam ausentes?	Não																
	* Foram adicionados novos animais aos grupos de controle e experimental para substituir os drop-outs da população original?	Incerto																

* O item 1 foi respondido como Sim*, quando a alocação aleatória foi comentada, mas não especificou qual processo de geração de sequência foi seguido.
 O item 2 foi respondido como Sim quando duas ou mais das perguntas de sinalização adicionais foram respondidas como Sim. A primeira questão de sinalização foi julgada com base no fato dos autores mencionarem ou não as principais características do animal, como sexo, idade e peso.
 O item 3 foi determinado de acordo com a pergunta de sinalização única.

O item 4 foi julgado como pouco claro se uma das duas perguntas sinalizadoras foi respondida como Incerto.
Os itens 5 e 6 foram avaliados de acordo com a pergunta de sinalização única.
O item 7 foi respondido como Sim, se uma das duas perguntas de sinalização foi respondida como Sim.
A primeira pergunta de sinalização foi avaliada como Sim*, quando o cegamento do avaliador do resultado foi mencionado, mas não referiu a maneira de fazê-lo.
O item 8 foi determinado como Sim, se duas ou mais das duas perguntas de sinalização foram respondidas como Sim; quando três das perguntas de sinalização não eram claras, o item principal era classificado como Incerto.
O item 9 foi julgado como Sim, quando uma das duas perguntas de sinalização foi respondida como Sim.
O item 10 foi determinado como Sim ou Não, se a maioria das perguntas de sinalização foram respondidas como Sim ou Não, respectivamente.

Fonte: o autor.

5.7 Efeito das intervenções

5.7.1 Efeito das membranas de células-tronco mesenquimais

Em relação ao potencial das MSCs, as PDL-MSCs produziram regeneração do cimento, formação óssea e alto escore periodontal, que avalia a densidade e adesão das fibras periodontais (55), em um modelo de deiscência bilateral (14) e defeitos intra-ósseos de três paredes (15). Por outro lado, em um modelo de defeito horizontal, PDL-MSCs autólogo, PDL-MSCs alógeno e grupo controle não diferiram na regeneração óssea e no escore periodontal (48). Neste estudo, o grupo alógeno PDL-MSCs apresentou maior taxa de regeneração do cimento do que o grupo controle (48). Outro estudo, em modelos de defeitos crônicos, revelou os melhores resultados para regeneração periodontal de grupos PDL-MSCs autólogos e alógenos em comparação a todos os outros grupos, sem diferença entre eles (41). Parâmetros clínicos como profundidade de sondagem, recessão gengival e perda de inserção também melhoraram significativamente após 12 semanas de transplante (41). É importante mencionar que a criopreservação não afetou as propriedades biológicas e imunológicas dos PDL-MSCs (41).

Akizuki et al. relataram, em defeitos de deiscência, uma quantidade estatisticamente maior de novo cimento no grupo PDL-MSCs em comparação com o grupo controle. O primeiro apresentava fibras de colágeno inseridas perpendicularmente ao osso neoformado e ao cimento e, ao mesmo tempo, observava-se um ligamento periodontal neoformado com vasos capilares ricos (39). Da mesma forma, PDL-MSCs tinham mais fibras do ligamento periodontal funcionalmente orientadas ($> 60^\circ$) do que os grupos AP-MSCs, G-MSCs, branco e scaffold (40).

Além disso, melhores resultados na regeneração óssea foram observados no grupo H-PDL-MSCs + DMSO e no grupo P-PDL-MSCs + Osthole quando comparados ao grupo P-PDL-MSCs + DMSO (45). Outro estudo animal mostrou maior regeneração do cimento, maior regeneração óssea, maior escore periodontal no grupo PDL-MSCs em comparação com BM-MSCs, AP-MSCs e grupo controle em defeitos intra-ósseos de uma parede (49). No entanto, Vaquette et al.

demonstraram resultados semelhantes no grupo PDL-MSCSs e no grupo BM-MSCSs e diferença significativa quando comparados com o grupo G-MSCSs ($p < 0,05$). Todos eles sob um suporte bifásico (dois compartimentos) (50). Outro estudo demonstrou que G-MSCSs não promoveu a regeneração periodontal e inclusive inibiu a formação óssea dentro do arcabouço CaP-PCL (40).

Além disso, os PDL-MSCSs mostraram epitélio sulcular mais fino e plano, as fibras de Sharpey com melhor orientação e maior porcentagem de osso periodontal do que os *scaffolds* de Gelfoam mais PDL-MSC dissociados (3).

Raju et al. fabricou um complexo tridimensional de membranas de células composta por membranas celulares osteoblásticas de camundongo (MC3T3-E1) e PDL-MSCSs (42). Este complexo demonstrou ser superior em volume de osso regenerado em comparação ao grupo PDL-MSCSs e aos três grupos controle: grupo sem defeito periodontal, grupo com defeito periodontal no dia 1 e grupo com defeito periodontal após 8 semanas (42). Além disso, o grupo de membranas de células complexas revelou fibras semelhantes a PDL e formação de tecido semelhante ao osso no grupo de membranas de células complexas com conexões funcionais de fibras semelhantes a PDL à superfície da raiz similar ao ligamento periodontal natural (42).

DF-MSCSs exibiu melhores propriedades do que PDL-MSCSs em um ambiente inflamatório induzido de defeitos intra-ósseos de duas paredes, mostrando regeneração periodontal completa, incluindo ligamento periodontal, cimento e estrutura óssea (43,51). Além disso, a espessura do cimento e a largura da estrutura periodontal nos grupos com DF-MSCSs foram significativamente maiores do que aqueles sem DF-MSCSs (51).

Novo osso, nova camada semelhante ao cimento, nova adesão de fibras de Sharpey e expressão positiva de β -globulina humana, a qual é necessária para a função de transporte de oxigênio dos eritrócitos, o que caracteriza um microambiente em regeneração, foram observados no grupo de injeção de DP-MSC e no grupo de DP-MSCSs. Por outro lado, o grupo DP-MSCSs apresentou maior volume de osso regenerativo e maior porcentagem de osso no periodonto do que o grupo com injeção de DP-MSC (16). Além disso, no grupo DP-MSCSs, que foi submetido a um meio osteoindutor, foi observado um crescimento significativo de tecido semelhante ao osso em comparação com o grupo de defeito ósseo e controle no transplante de defeito periodontal (47).

Os grupos de células progenitoras endoteliais (EPCs) -BM-MSCSs e BM-MSCSs demonstraram que aumentam a regeneração e vascularização óssea, mas o primeiro mostrou-se significativamente maior (44). Além disso, osso alveolar maduro, ligamento periodontal e cemento foram detectados em ambos os grupos C-BM-MSCSs e OIM-BM-MSCSs (46). Por fim, considerando as MSCSs de AP, obtiveram valores semelhantes ao grupo controle (49).

5.7.2 Efeito de intervenções adicionais para MSCSs

Algumas estratégias foram utilizadas além das membranas de células-tronco com foco na otimização da regeneração periodontal. EPCs e BM-MSCSs foram cocultivados na proporção de 1: 1, potencializando a regeneração periodontal (44). Além disso, os P-PDL-MSCSs após o tratamento com Osthole aumentaram a restauração do defeito ósseo (45). Finalmente, um estudo implantou uma construção multifásica. Os resultados da regeneração periodontal avaliados aqui demonstraram ser melhores nos grupos BM-MSCSs e PDL-MSCSs em comparação com G-MSCSs. No entanto, não houve diferença com o grupo controle (50).

6 DISCUSSÃO

6.1 Resumo dos principais resultados

A presente revisão sistemática mostrou que as MSCs podem aumentar a regeneração periodontal em modelos animais de defeito periodontal, fornecendo uma estratégia promissora para aumentar a nova formação do tecido periodontal. As MSCs proporcionaram maior regeneração do cemento, formação óssea e formação de tecido semelhante ao ligamento periodontal quando comparadas com os controles.

A tecnologia de membrana celular é uma estratégia de alto nível na medicina regenerativa periodontal. Ela permite manter a matriz extracelular intacta após o autodesprendimento, cedendo as estruturas semelhantes a tecidos tridimensionais e permitindo o transplante diretamente em sítios de tecido alvo sem a necessidade de sutura ou uso de *scaffolds* e transporte de biomateriais. Usando esta estratégia em células-tronco mesenquimais, as MSCs, têm benefícios terapêuticos adicionais, como capacidade de diferenciação multilinhagem, o que leva a uma substituição tecidual e melhoria da recuperação do tecido por meio de sinalização parácrina, utilizando as diversas citocinas secretadas (56).

Assim, a fim de avaliar os resultados relacionados à qualidade dos tecidos neoformados induzidos pelas estratégias regenerativas de células-tronco, observamos a presença de novo osso, nova camada semelhante ao cemento, inserção e disposição de fibras, bem como expressão de β -globina humana, para cada estudo (3,14–16,43–51).

Não foram observadas diferenças entre MSCs alógenas e autólogas (41,48). Além disso, os grupos PDL-MSCs utilizando placa de cultura termo-responsiva ou vitamina C, para indução das membranas de células, demonstrou ser superior ao grupo PDL-MSC autólogo dissociado para regeneração periodontal. No entanto, o grupo das PDL-MSCs induzida por vitamina C apresentou maior formação de osso novo (3).

Hu et al. mostraram novo osso, nova camada semelhante ao cemento e nova adesão de fibras de Sharpey tanto no grupo de injeção de DP-MSC quanto no grupo de DP-MSCs. Além disso, a porcentagem e o volume do osso regenerado foram

significativamente maiores no último grupo, demonstrado por medidas histométricas e micro-CT (16).

AP-MSCs e G-MSCs não potencializaram a regeneração periodontal, apresentando resultados semelhantes em comparação ao grupo controle (40,49,50).

Em relação à resposta imunológica adversa às estratégias, cinco estudos não relataram resposta inflamatória local (39,41,43,47,50) e três estudos não relataram nenhum tipo de imunorejeição (16,41,43). Esses achados estão de acordo com a literatura e podem estar relacionados às já demonstradas propriedades imunomoduladoras das células-tronco mesenquimais, considerando a ausência de expressão de fatores co-estimuladores imunes, suportando a baixa imunogenicidade e mecanismos imunossupressores. É definitivamente uma questão crítica na bioengenharia de tecidos, estabelecendo a segurança do MSC com a técnica de membranas de células (23,57–60).

6.2 Comparação com estudos anteriores

Uma revisão sistemática anterior mostrou que PDL-MSC e DP-MSC foram as fontes mais comuns de onde as células-tronco foram isoladas (25). Outra revisão pré-clínica em modelos ortotópicos demonstrou que BM-MSC e PDL-MSC foram os mais utilizados (26). Da mesma forma, de acordo com nossos achados, o MSC mais comum empregado com a tecnologia de membrana de células em um modelo animal com defeito periodontal foi PDL-MSCs (3,14,15,39–43,45,48–50) seguido por BM-MSCs (44,46,49,50).

Uma revisão sistemática, que avaliou principalmente DP-MSCs, afirmou que mais regeneração óssea foi alcançada com a técnica de membrana de células do que com injeção de células-tronco dissociadas. Além disso, os autores mencionaram que PDL-MSCs podem ter melhores resultados na regeneração periodontal em comparação com DP-MSCs (27). Aqui, obtivemos resultados semelhantes.

Outra revisão recente, com foco em MSCs de origem dentária para regeneração periodontal, foi publicada. Magalhães et al. avaliaram todos os estudos pré-clínicos em animais contendo experimentos *in vitro* e *in vivo*. O último incluiu modelos ectópicos, bio-raízes e ortotópicos. Além disso, fizeram uma comparação das

MSCSs com qualquer outro tipo de tratamento regenerativo (61). Em contraste, nosso estudo centrou-se na avaliação de modelos animais de transplante ortotópico em defeitos periodontais, o qual é o modelo animal mais próximo dos estudos clínicos. Além disso, nossa revisão comparou MSCSs com grupos controle e / ou cirurgias SHAM na regeneração periodontal.

Em relação à avaliação do risco de viés, Magalhães et al. utilizaram uma ferramenta específica denominada “Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments” (ARRIVE), resultando em 87,9% da parte *in vivo* dos estudos considerados com risco de viés (61). Em contrapartida, utilizamos a ferramenta SYRCLE, obtendo resultados diferentes: apenas 0,59% das entradas do estudo consideradas com alto risco de viés e a maioria deles avaliados como incerto com 55,29%.

Por todas essas razões, acreditamos que nosso estudo mostra maiores informações das MSCSs especificamente na área de regeneração periodontal em comparação às revisões sistemáticas já publicadas, demonstrando a importância de nossa revisão sistemática para a realização de estudos futuros utilizando essa tecnologia.

6.3 Modelos experimentais animais de defeito periodontal

Vários dos estudos utilizaram modelo de pequeno defeito em ratos e camundongos. Esses modelos são econômicos, fáceis de manusear e permitem a padronização de condições experimentais em indivíduos geneticamente semelhantes. No entanto, a cirurgia e a avaliação dos desfechos do estudo são desafiadoras devido ao pequeno tamanho dos animais. Além disso, a dentição do roedor sofre erupção dentária contínua, incluindo aposição de osso e cimento, o que deve ser considerado quando um estudo for planejado (14,40,44,45,47).

Dado que a maioria dos modelos de defeitos ósseos de roedores não representam defeitos de tamanho crítico ou uma situação de cicatrização de feridas comprometida bem caracterizada, animais grandes geralmente validam uma mudança para consideração de aplicações clínicas. Esses grandes modelos incluem cães, ovelhas e miniporcos (3,16,41,50). A maioria dos estudos na presente revisão

trabalharam com cães *Beagle*. O *Beagle* é um dos animais mais utilizados devido ao seu tamanho e ao seu temperamento cooperativo. Em geral, todos os tecidos periodontais e o tamanho dos dentes são bastante semelhantes aos observados em humanos. No entanto, existem algumas diferenças importantes entre cães e humanos como a ausência de contatos oclusais para todos os pré-molares, a falta de movimentos laterais, a presença de contatos abertos entre os dentes e a frequente falta de sulco gengival e fluido crevicular o que leva a uma composição diferente da placa periodontal e cálculo comparado aos humanos. Além disso, os cães têm uma suscetibilidade natural a doenças periodontais na idade adulta. As alterações periodontais, incluindo gengivite e periodontite, aumentam em prevalência e gravidade com a idade, mais rapidamente do que no homem, mas com os mesmos fatores etiológicos. O modelo animal mais comumente utilizado na pesquisa periodontal, principalmente para regeneração periodontal, parece ser o cão *Beagle* devido aos defeitos reprodutíveis de tamanho crítico e às características já mencionadas (15,39,43,46,48,49,51).

Em relação aos defeitos periodontais em animais, os modelos de inflamação crônica induzidos por ligadura ou materiais de impressão como alginato são mais apropriados para simular o ambiente inflamatório da periodontite em comparação aos modelos agudos. O primeiro é o modelo de defeito periodontal mais próximo dos estudos em humanos (62,63). Apenas quatro estudos incluídos em nossa revisão o utilizaram (41,43,46,47).

De acordo com a análise histométrica e radiográfica, DF-MSCSs mostrou significativamente maior quantidade de novo cemento e regeneração óssea em defeitos intra-ósseos crônicos (43). Guo et al. afirmaram que isso foi alcançado por duas propriedades desempenhadas por DF-MSCSs: a capacidade de diferenciação em um microambiente inflamatório e as características embrionárias que induzem um nicho favorável de células-tronco (43).

6.4 Impacto de intervenções adicionais às MSCSs para regeneração periodontal de acordo com o efeito biológico

Intervenções adicionais para membranas de células-tronco foram empregadas a fim de melhorar os resultados da regeneração periodontal. EPCs e BM-MSCSs foram co-cultivados para aumentar o tecido periodontal (44). Liang et al. destacaram a melhora da neoformação óssea utilizando o co-cultivado principalmente devido ao aumento da vascularização e foi sugerido que as EPCs podem fornecer um ambiente local que poderia favorecer a diferenciação osteogênica das BM-MSCSs (44).

Outro estudo evidenciou que P-PDL-MSCSs após o tratamento com Osthole, uma cumarina natural contida em ervas chinesas (principalmente no *Cnidium monnieri*), melhorou a restauração do defeito ósseo porque o Osthole aprimorou o potencial de formação de novo osso de P-PDL-MSCSs por meio de modificação epigenética. Além disso, foi estabelecido que a melhor concentração de Osthole para diferenciação osteogênica e proliferação de P-PDL-MSCSs foi de 10^{-7} Mol / L (45).

Finalmente, um estudo empregou a implantação de um construto multifásico que consiste em duas técnicas de fabricação: para o compartimento periodontal, eletrofiação de solução e eletrofiação de fusão, para o compartimento ósseo. Esta tecnologia por si só teve um desempenho eficiente e produziu compartimentação benéfica para que as células-tronco mesenquimais pudessem se regenerar. Isso foi demonstrado já que não houve diferença significativa entre as MSCSs e os grupos controle na regeneração periodontal (50).

6.5 Qualidade dos estudos e avaliação do viés

Neste estudo, usamos a ferramenta SYRCLE para avaliar o risco de viés. Após a coleta de dados, a maioria dos estudos realizou apenas análises qualitativas. Embora tenha sido encontrada grande variabilidade nos métodos implementados para avaliar os desfechos relacionados à regeneração, a maioria dos estudos *in vitro* apresentou baixo risco de viés, o que é consistente com a revisão publicada recentemente (61). Em geral, os detalhes *in vitro* relativos à origem da cultura de células, processo de obtenção, caracterização fenotípica, métodos de indução de diferenciação e procedimentos de obtenção de membranas de células foram claros, bem referenciados e com reprodutibilidade permitida.

Para os modelos animais, um grande número de metodologias foi aplicado para avaliar os resultados da regeneração. Por exemplo, o sítio de implantação, o tipo de defeito, o tamanho do defeito e a forma na implantação de membranas de células. Essa ampla inconstância metodológica reduz a reprodutibilidade e a validade externa, implicando em um maior risco de viés. Além disso, a maioria dos estudos não forneceu informações relacionadas às camadas das membranas, e alguns estudos não relataram as características de sexo, idade e peso dos animais (3,40,42,50), o que é relevante de acordo com o item 2 da ferramenta SYRCLE.

Apesar do fato de que algumas entradas dos estudos foram consideradas como baixo risco de viés, um grande número delas eram incertas. É importante destacar que a falta de alguns dos itens avaliados pode impactar nos resultados. Portanto, os resultados aqui obtidos devem ser interpretados com cautela.

6.6 Limitações da literatura disponível

Algumas limitações importantes existiram na literatura disponível para conduzir a presente revisão sistemática, por uma ampla variedade de desfechos primários e secundários, bem como uma vasta heterogeneidade metodológica. Os estudos incluídos não nos forneceram dados suficientes para realizar uma meta-análise. A alta heterogeneidade metodológica, demonstrada na Tabela 1, incluiu diferentes fontes celulares, modelos animais, métodos de análise de resultados, tipo de enxerto, *scaffolds* e membranas empregados.

É importante ressaltar que os estudos não relataram o estado de saúde dos doadores de células-tronco. Da mesma forma, a maioria dos estudos não divulgou o número de camadas das membranas (14,16,43–47,51) nem o número de células / membranas (3,14,15,43–51).

6.7 Recomendações para estudos futuros

Estudos futuros devem principalmente padronizar protocolos para o processo de obtenção, indução e enxertia de membranas celulares em modelos animais periodontais. Atualmente, existem muitas divergências sobre o sítio de implantação, o melhor tipo de defeito, o tamanho do defeito e a forma dos implantes das membranas de células.

Estudos futuros devem ser conduzidos para padronizar o melhor modelo de defeito periodontal para a técnica de membrana de células na regeneração periodontal. Os estudos devem selecionar principalmente um modelo de defeito crônico em vez de um modelo agudo (64).

Recomendamos fortemente a realização de mais estudos utilizando DF-MSCSs, que mostraram aqui resultados promissores na regeneração periodontal, e não apenas centrados em PDL-MSCSs.

A metodologia de estudos em animais deve ser atualizada para aumentar a validade interna. Eles devem descrever em detalhe qual método de randomização e sigilo de alocação foi aplicado. Além disso, os animais devem ser selecionados aleatoriamente para avaliação do resultado e o avaliador do resultado deve ser cego. O relato das características dos animais, como sexo, idade e peso, também é obrigatório.

É essencial investigar quais *scaffolds*, fatores de crescimento ou co-culturas podem melhorar o potencial das MSCSs para a regeneração periodontal.

7 CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática mostrou que as MSCs podem potencializar a regeneração periodontal em modelos animais de defeitos periodontais, fornecendo uma estratégia promissora para aumentar a regeneração periodontal. Estudos clínicos são necessários para comprovar os resultados aqui encontrados.

REFERÊNCIAS¹

1. Reynolds MA, Kao RT, Camargo PM, Caton JG, Clem DS, Fiorellini JP, et al. Periodontal Regeneration – Intrabony defects: A consensus report from the AAP regeneration workshop. *J Periodontol*. 2015 Feb;86(2Suppl):S105–7. doi:10.1902/jop.2015.140378.
2. Sallum EA, Ribeiro F V., Ruiz KS, Sallum AW. Experimental and clinical studies on regenerative periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2019 Feb;79(1):22–55. doi:10.1111/prd.12246.
3. Wei F, Qu C, Song T, Ding G, Fan Z, Liu D, et al. Vitamin C treatment promotes mesenchymal stem cell sheet formation and tissue regeneration by elevating telomerase activity. *J Cell Physiol*. 2012 Sep;227(9):3216–24. doi:10.1002/jcp.24012.
4. Desai KU, Salve PM, Sapkal NB, Dave JR, Tomar GB. Scaffold-free spheroids derived from stem cells for tissue-engineering applications. *Crit Rev Biomed Eng*. 2018;46(5):469–93. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.2018028254.
5. Okano T, Yamada N, Sakai H, Sakurai Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res*. 1993 Oct;27(10):1243–51. doi:10.1002/jbm.820271005.
6. Ito A, Ino K, Kobayashi T, Honda H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(31):6185–93. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.039.
7. Chen M, Xu Y, Zhang T, Ma Y, Liu J, Yuan B, et al. Mesenchymal stem cell sheets: a new cell-based strategy for bone repair and regeneration. *Biotechnol Lett*. 2019 Mar;41(3):305–18. doi: <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02649-7>
8. Lu Y, Zhang W, Wang J, Yang G, Yin S, Tang T, et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application. *Int J Oral Sci*. 2019 May;11(2):17. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s41368-019-0050-5>

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Sanz AR, Carrión FS, Chaparro AP. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering. *Periodontol 2000*. 2015 Feb;67(1):251–67. doi:10.1111/prd.12070.
10. Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, et al. Potential for stem cell-based periodontal therapy. *J Cell Physiol*. 2016 Jan;231(1):50–61. doi:10.1002/jcp.25067.
11. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*. 2012 Sep;33(27):6320–44. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.048.
12. Yang J, Yamato M, Shimizu T, Sekine H, Ohashi K, Kanzaki M, et al. Reconstruction of functional tissues with cell sheet engineering. *Biomaterials*. 2007 Dec;28(34):5033–43. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.052.
13. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E et al. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*. 2004 Sep;351(12):1187–96. doi:10.1056/NEJMoa040455.
14. Hasegawa M, Yamato M, Kikuchi A, Okano T, Ishikawa I. Human periodontal ligament cell sheets can regenerate periodontal ligament tissue in an athymic rat model. *Tissue Eng*. 2005 Mar-Apr;11(3–4):469–78. doi:10.1089/ten.2005.11.469.
15. Iwata T, Yamato M, Tsuchioka H, Takagi R, Mukobata S, Washio K, et al. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*. 2009 May;30(14):2716–23. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.032.
16. Hu J, Cao Y, Xie Y, Wang H, Fan Z, Wang J, et al. Periodontal regeneration in swine after cell injection and cell sheet transplantation of human dental pulp stem cells following good manufacturing practice. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Sep;7(1):1–11. doi: http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0362-8.
17. Magalhães FD, Sarra G, Carvalho GL, Pedroni ACF, Marques MM, Chambrone L, et al. Dental tissue-derived stem cell sheet biotechnology for periodontal tissue regeneration: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2021 Sep;129:105182. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105182.

18. Larsson L, Decker AM, Nibali L, Pilipchuk SP, Berglundh T, Giannobile W V. Regenerative Medicine for Periodontal and Peri-implant Diseases. *J Dent Res*. 2016 Mar;95(3):255–66. doi:10.1177/0022034515618887.
19. Raveau S, Jordana F. Tissue engineering and three-dimensional printing in periodontal regeneration: A literature review. *J Clin Med*. 2020 Dec;9(12):4008. doi:10.3390/jcm9124008.
20. NIH Stem Cell Information [homepage]. In Stem Cell Information [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2016. Citado 1 Fev 2021. Disponível em:<https://stemcells.nih.gov/info/basics>.
21. Queiroz A, Pelissari C, Trierveiler M, Albuquerque-Souza E, Gasparoni LM, de França BN, et al. Therapeutic potential of periodontal ligament stem cells. *World J Stem Cells*. 2021 Jun;13(6):605–18. doi:10.4252/wjsc.v13.i6.605.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7. doi: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>
23. Wada N, Gronthos S, Bartold PM. Immunomodulatory effects of stem cells. *Periodontol 2000*. 2013 Oct;63(1):198–216. doi:10.1111/prd.12024.
24. Hu L, Liu Y, Wang S. Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis*. 2018 Jul;24(5):696–705. doi:10.1111/odi.12703.
25. Avinash K, Malaippan S, Dooraiswamy JN. Methods of isolation and characterization of stem cells from different regions of oral cavity using markers: A systematic review. *Int J Stem Cells*. 2017 May;10(1):12–20. doi:10.15283/ijsc1710.
26. Tassi SA, Sergio NZ, Misawa MYO, Villar CC. Efficacy of stem cells on periodontal regeneration: Systematic review of pre-clinical studies. *J Periodontal Res*. 2017 Oct;52(5):793–812. doi:10.1111/jre.12455.
27. Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés MÁ. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *J Clin Exp Dent*. 2019 Apr;11(4):e373–81. doi:10.4317/jced.55574.

28. Shamseer L, Moher D, Clarke M, et al. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015:elaboration and explanation. *BMJ* 2015 Jan;7647. doi:10.1136/bmj.g7647.
29. Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ et al, editors. *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions*. Chichester:JohnWiley&Sons;2019.
30. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014 Mar;14(1):43. doi:10.1186/1471-2288-14-43.
31. Panduwawala CP, Zhan X, Dissanayaka WL, Samaranayake LP, Jin L, Zhang C. In vivo periodontal tissue regeneration by periodontal ligament stem cells and endothelial cells in three-dimensional cell sheet constructs. *J Periodontal Res*. 2017 Jun;52(3):408–18. doi:10.1111/jre.12405.
32. Wang ZS, Feng ZH, Wu GF, Bai SZ, Dong Y, Chen FM, et al. The use of platelet-rich fibrin combined with periodontal ligament and jaw bone mesenchymal stem cell sheets for periodontal tissue engineering. *Sci Rep*. 2016 Jun;6:28126. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28126>
33. Yu Y, Bi CS, Wu RX, Yin Y, Zhang XY, Lan PH, et al. Effects of short-term inflammatory and/or hypoxic pretreatments on periodontal ligament stem cells: in vitro and in vivo studies. *Cell Tissue Res*. 2016 Nov;366(2):311–28. doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-016-2437-3>.
34. Liu J, Wang L, Liu W, Li Q, Jin Z, Jin Y. Dental follicle cells rescue the regenerative capacity of periodontal ligament stem cells in an inflammatory microenvironment. *PLoS One*. 2014 Oct;9(10):e108752. doi:10.1371/journal.pone.0108752.
35. Guo W, He Y, Tang X, Chen G, Shi H, Gong K, et al. Scaffold-free cell pellet transplantations can be applied to periodontal regeneration. *Cell Transplant*. 2014 Feb;23(2):181–94. doi:10.3727/096368912X662426.
36. Farag A, Hashimi SM, Vaquette C, Bartold PM, Hutmacher DW, Ivanovski S. The effect of decellularized tissue engineered constructs on periodontal regeneration. *J Clin Periodontol*. 2018 May;45(5):586–96. doi:10.1111/jcpe.12886.

37. Flores MG, Yashiro R, Washio K, Yamato M, Okano T, Ishikawa I. Periodontal ligament cell sheet promotes periodontal regeneration in athymic rats. *J Clin Periodontol.* 2008;35(12):1066–72.
38. Jiang Y, Liu JM, Huang JP, Lu KX, Sun WL, Tan JY, Li BX, Chen LL WY. Regeneration potential of decellularized periodontal ligament cell sheets combined with 15-Deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J 2 nanoparticles in a rat periodontal defect. *Biomed Mater.* 2021;
39. 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 Periodontal Res.* 2005;40(3):245–51.
40. Dan H, Vaquette C, Fisher AG, Hamlet SM, Xiao Y, Hutmacher DW, et al. The influence of cellular source on periodontal regeneration using calcium phosphate coated polycaprolactone scaffold supported cell sheets. *Biomaterials.* 2014 Jan;35(1):113–22.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.074>.
41. Ding G, Liu Y, Wang W, Wei F, Liu D, Fan Z, et al. Allogeneic periodontal ligament stem cell therapy for periodontitis in swine. *Stem Cells.* 2010 Oct;28(10):1829–38. doi:10.1002/stem.512.
42. Raju R, Oshima M, Inoue M, Morita T, Huijiao Y, Waskitho A, et al. Three-dimensional periodontal tissue regeneration using a bone-ligament complex cell sheet. *Sci Rep.* 2020 Feb;10(1):1656. doi:10.1038/s41598-020-58222-0.
43. Guo S, Kang J, Ji B, Guo W, Ding Y, Wu Y, et al. Periodontal-derived mesenchymal cell sheets promote periodontal regeneration in inflammatory microenvironment. *Tissue Eng - Part A.* 2017 Jul;23(13–14):585–96.
doi:10.1089/tem.TEA.2016.0334.
44. Liang Y, Wen L, Shang F, Wu J, Sui K, Ding Y. Endothelial progenitors enhanced the osteogenic capacities of mesenchymal stem cells in vitro and in a rat alveolar bone defect model. *Arch Oral Biol.* 2016 Aug;68:123–30.
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.04.007>
45. Sun J, Dong Z, Zhang Y, He X, Fei D, Jin F, et al. Osthole improves function of periodontitis periodontal ligament stem cells via epigenetic modification in cell sheets engineering. *Sci Rep.* 2017 Jul;7(1):5254.
doi:<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-05762-7>

46. Takewaki M, Kajiya M, Takeda K, Sasaki S, Motoike S, Komatsu N, et al. MSC/ECM cellular complexes induce periodontal tissue regeneration. *J Dent Res*. 2017 Aug;96(9):984–91. doi:10.1177/0022034517708770.
47. Takizawa S, Yamamoto T, Honjo KI, Sato Y, Nakamura K, Yamamoto K, et al. Transplantation of dental pulp-derived cell sheets cultured on human amniotic membrane induced to differentiate into bone. *Oral Dis*. 2019 Jul;25(5):1352–62. doi:10.1111/odi.13096.
48. Tsumanuma Y, Iwata T, Kinoshita A, Washio K, Yoshida T, Yamada A, et al. Allogeneic transplantation of periodontal ligament-derived multipotent mesenchymal stromal cell sheets in canine critical-size supra-alveolar periodontal defect model. *Biores Open Access*. 2016 Jan;5(1):22–36. doi:10.1089/biores.2015.0043.
49. Tsumanuma Y, Iwata T, Washio K, Yoshida T, Yamada A, Takagi R, et al. Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Sep;32(25):5819–25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.071>.
50. Vaquette C, Saifzadeh S, Farag A, Hutmacher DW, Ivanovski S. Periodontal tissue engineering with a multiphasic construct and cell sheets. *J Dent Res*. 2019 Jun;98(6):673–81. doi: <https://doi.org/10.1177/0022034519837967>.
51. Yang H, Li J, Hu Y, Sun J, Guo W, Li H, et al. Treated dentin matrix particles combined with dental follicle cell sheet stimulate periodontal regeneration. *Dent Mater*. 2019 Sep;35(9):1238–53. doi:10.1016/j.dental.2019.05.016.
52. Zhu B, Liu W, Liu Y, Zhao X, Zhang H, Luo Z, et al. Jawbone microenvironment promotes periodontium regeneration by regulating the function of periodontal ligament stem cells. *Sci Rep*. 2017 Jan;7:40088. doi:<http://dx.doi.org/10.1038/srep40088>
53. Tatsuhiro F, Seiko T, Yusuke T, Reiko TT, Kazuhito S. Dental pulp stem cell-derived, scaffold-free constructs for bone regeneration. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan;19(7):1846. doi:10.3390/ijms19071846.
54. Zhang H, Liu S, Zhu B, Xu Q, Ding Y, Jin Y. Composite cell sheet for periodontal regeneration: crosstalk between different types of MSCs in cell sheet facilitates complex periodontal-like tissue regeneration. *Stem Cell Res*

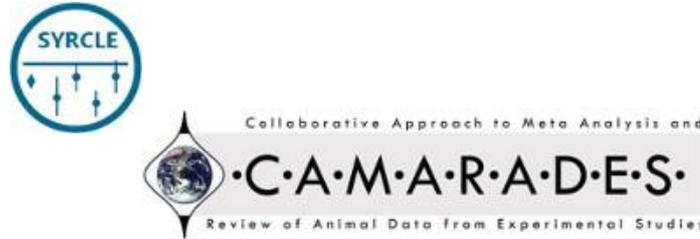
- Ther. 2016 Nov;7(1):168. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-016-0417-x>.
55. Wikesjö UME, Sorensen RG, Kinoshita A, Li XJ, Wozney JM. Periodontal repair in dogs: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-12 (rhBMP-12) on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment: A pilot study. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):662–70. doi:10.1111/j.1600-051X.2004.00540.X
 56. Kondo M, Kameishi S, Grainger DW, Okano T. Novel therapies using cell sheets engineered from allogeneic mesenchymal stem/stromal cells. *Emerg Top Life Sci*. 2021 Dec;4(6):677–89. doi:10.1042/ETLS20200151.
 57. De Sá Silva F, Ramos RN, De Almeida DC, Bassi EJ, Gonzales RP, Miyagi SPH, et al. Mesenchymal stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) induce immune modulatory profile in monocyte-derived dendritic cells. *PLoS One*. 2014 May;9(5):1–13. doi:10.1371/journal.pone.0098050.
 58. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*. 2005 Sep;80(6):836–42. doi:10.1097/01.tp.0000173794.72151.88.
 59. Wada N, Menicanin D, Shi S, Bartold PM, Gronthos S. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol*. 2009 Jun;219(3):667–76. doi:10.1002/jcp.21710.
 60. Yang Z, Jin F, Zhang X, Ma D, Han C, Huo N, et al. Tissue engineering of cementum/periodontal-ligament complex using a novel three-dimensional pellet cultivation system for Human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2009 Dec;15(4):571–81. doi:10.1089/tem.tec.2008.0561.
 61. Magalhães FD, Sarra G, Carvalho GL, Pedroni ACF, Marques MM, Chambrone L, et al. Dental tissue-derived stem cell sheet biotechnology for periodontal tissue regeneration: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2021 Sep;129:105182. doi:10.1016/j.archoralbio.2021.105182.
 62. Marchesan J, Girnary MS, Jing L, Miao MZ, Zhang S, Sun L, Morelli T, Schoenfisch MH, Inohara N, Offenbacher S JY. An experimental murine model to study periodontitis. *Nat Protoc*. 2018 Oct;13(10):2247–67. doi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6773250/>.

63. Li D, Feng Y, Tang H, Huang L, Tong Z, Hu C, et al. A simplified and effective method for generation of experimental murine periodontitis model. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020 May;8:444. doi:10.3389/fbioe.2020.00444.
64. Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile W V. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res.* 2009 Dec;88(12):1065–76. doi:10.1177/0022034509349748.

ANEXO A - Protocolo preenchido no site do PROSPERO

PROSPERO
International prospective register of systematic reviews

NHS
 National Institute for
 Health Research



Animal review

1. * Review title.

Give the working title of the review. This must be in English. The title should have the interventions or exposures being reviewed and the associated health or social problems.

Potential of mesenchymal stem cell sheets on periodontal regeneration: a systematic review

2. Original language title.

For reviews in languages other than English, this field should be used to enter the title in the language of the review. This will be displayed together with the English language title.

3. * Anticipated or actual start date.

Give the date when the systematic review commenced, or is expected to be completed 01/07/2020

4. * Anticipated completion date.

Give the date by which the review is expected to be completed. 30/09/2020

5. * Stage of review at time of this submission.

Indicate the stage of progress of the review by ticking the relevant Started and Completed boxes. Additional information may be added in the free text box provided.

Please note: Reviews that have progressed beyond the point of completing data extraction at the time of initial registration are not eligible for inclusion in PROSPERO. Should evidence of incorrect status and/or completion date being supplied at the time of submission come to light, the content of the PROSPERO record will be removed leaving only the title and named contact details and a statement that inaccuracies in the stage of the review date had been identified. This field should be updated when any amendments are made to a published record and on completion and publication of the review.

The review has not yet started: No

Review stage	Started	Completed
Preliminary searches	Yes	Yes
Piloting of the study selection process	Yes	Yes
Formal screening of search results against eligibility criteria	Yes	Yes
Data extraction	No	No
Risk of bias (quality) assessment	No	No
Data analysis	No	No

Provide any other relevant information about the stage of the review here (e.g. Funded proposal, protocol not yet finalised).

Protocol finalised

Protocol finalised

6. * Named contact.

The named contact acts as the guarantor for the accuracy of the information presented in the register record. Marinella Holzhausen Caldeira

Email salutation (e.g. "Dr Smith" or "Joanne") for correspondence:

Dr Holzhausen

7. * Named contact email.

Enter the electronic mail address of the
named contact. marinella@usp.br

8. * Named contact address.

Enter the full postal address for the named contact. Av. Prof. Lineu Prestes, 2227,
São Paulo, SP, Brazil

9. Named contact phone number

Enter the telephone number for the named contact, including
international dialling code. (55 11) 3091-7833

10. * Organisational affiliation of the review.

Full title of the organisational affiliations for this review and website address if
available. This field may be completed as 'none' if the review is not affiliated to
any organisation.

University of São Paulo

Organisation web address:

<http://www.fo.usp.br/>

11. * Review team members and their organisational affiliations.

Give the personal details and the organisational affiliations of each member of the review team.
Affiliation refers to groups or organisations to which review team members belong. **NOTE: email
and country are now mandatory fields for each person.**

Mr Aldrin Huaman Mendoza. University of São Paulo
Mr Danilo Balzarini. University
of São Paulo
Professor Emanuel Silva Rovai. University of São Paulo
Professor Marinella Holzhausen Caldeira. University of São Paulo

12. * Funding sources/sponsors.

Give details of the individuals, organisations, groups or other legal entities who
take responsibility for initiating, managing, sponsoring and/or financing the review.
Any unique identification numbers assigned to the review by the individuals or
bodies listed should be included.

No funding sources/sponsors.

Grant number(s)

13. * Conflicts of interest.

List any conditions that could lead to actual or perceived undue influence on judgements concerning the main topic investigated in the review.

None

14. Collaborators.

Give the name, affiliation and role of any individuals or organisations who are working on the review but who are not listed as review team members.

15. * Review question.

Give details of the question to be addressed by the review, clearly and precisely.

In in vivo animal models, are mesenchymal stem cell sheets effective on periodontal regeneration, in comparison with control?

Context and rationale

Provide a brief description of the context and rationale of the review, including information on the relevance of your review for human health (max 250 words).

Periodontal regeneration is defined as the formation of a new cementum, alveolar bone and a functional periodontal ligament on a previously compromised root surface. Although there is evidence showing that periodontal regeneration can be achieved using the conventional techniques, all types of regenerative, all types of regenerative treatment have shown limited success and predictability, especially in challenging clinical situations

Recent studies on the treatment of periodontal disease have focused their efforts on tissue engineering, especially cell sheets, which is a method of growing cells with specific stimuli and without any subculture, until the cell layer separates from the culture. Cell sheet technique can also be used in mesenchymal stem cells (MSC), to obtain additional benefits such as keeping the extracellular matrix intact after self-detachment, being directly and easily transplanted into host tissues

without using scaffolds or transporting biomaterials. Additionally, these sheets can be grafted into the recipient tissues without suturing. The evidence has shown high-quality regeneration of damaged tissues without fibrous scar formation, minimal morbidity of the donor site compared to autografts and a low risk of autoimmune rejection and disease transmission.

To our knowledge, there are no systematic reviews (SR) that assessed the additional benefits of MSC sheets on periodontal regeneration in order to understand the quality of these studies. Thus, the aim of this SR is to evaluate the effects of use of MSC sheets in periodontal defects of animal models, compared to control and/or sham surgeries, on periodontal regeneration.

16. * Searches.

Give details of the sources to be searched, and any restrictions (e.g. language or publication period). The full search strategy is not required, but may be supplied as a link or attachment.

The MEDLINE, EMBASE, Web of Science and LILACS databases will be searched up to July 2020. Medical subject headings (MeSH) terms and keywords will be combined with Boolean operators and will be used to search the databases. No restrictions will be applied to our search.

17. URL to search strategy.

Give a link to the search strategy or an example of a search strategy for a specific database if available (including the keywords that will be used in the search strategies).

https://www.crd.york.ac.uk/PROSPEROFILES/200810_STRATEGY_20200724.pdf

Alternatively, upload your search strategy to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

Do not make this file publicly available until the review is complete

18. * Human disease modelled.

Give a short description of the disease, condition or healthcare domain being modelled. Periodontal defects in animals

19. * Animals/population.

Give summary criteria for the animals being studied by the review, e.g. species, sex, details of disease model. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

All animal models with periodontal defects, animals without a disease.

Exclusion criteria:

Not animal models, animal models with other bone defects (not periodontal defects), animals with ectopic transplantation of stem cell sheets, animals with a disease.

20. * Intervention(s), exposure(s).

Give full and clear descriptions of the nature of the interventions or the exposures to be reviewed (e.g. dosage, timing, frequency). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Stem cell sheets tested for regeneration of periodontal defects.

Exclusion criteria:

Stem cell sheets tested for other bone defects, only stem cells, cell pellets, cell aggregates, cell suspension injection in defects.

21. * Comparator(s)/control.

Where relevant, give details of the type(s) of control interventions against which the experimental condition(s) will be compared (e.g. another intervention or a non-exposed control group). Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Another intervention for periodontal regeneration, a non-exposed control group, sham-treated animals, animals undergoing no treatment at all, baseline measurements.

Exclusion criteria:

Another intervention but not for periodontal regeneration.

22. * Study designs to be included.

Give details of the study designs eligible for inclusion in the review. If there are no restrictions on the types of study design eligible for inclusion, or certain study types are excluded, this should be stated. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Pre-clinical controlled animal model studies with a separate control group.

Exclusion criteria:

Not an animal study, clinical studies, case reports, in vitro studies, studies without a separate control group

23. Other selection criteria or limitations applied.

Give details of any other inclusion and exclusion criteria, e.g. publication types (reviews, conference abstracts), publication date, or language restrictions.

reviews excluded

24. * Outcome measure(s).

Give detail of the outcome measures to be considered for inclusion in the review. Please include details of both inclusion and exclusion criteria.

Inclusion criteria:

Periodontal regeneration outcomes assessed with histological evaluation, micro-computed tomography and/or alizarin red.

Exclusion criteria:

Outcomes that do not assess periodontal regeneration.

25. N/A.

This question does not apply to systematic reviews of animal studies for human health submissions.

26. * Study selection and data extraction.

Procedure for study selection

Give the procedure for selecting studies for the review, including the screening phases (title and/or title-abstract and/or full-text), the number of researchers involved, and how discrepancies will be resolved.

Two reviewers (AHM and DB) assessed independently the titles and abstracts to determine their initial potential inclusion. Then, full manuscript were examined to decide whether the studies met the inclusion criteria. Disagreements were solved by discussion with a third reviewer (ESR). Studies selected that met inclusion criteria underwent a validity assessment and data extraction. Excluded studies and the reasons for their exclusion were recorded.

Prioritise the exclusion criteria

Multiple exclusion criteria may apply to an abstract/paper, which can cause discrepancies between reviewers in the reason for exclusion recorded. To avoid this, it is helpful to prioritize the exclusion criteria (e.g. 1) not an animal study; 2) not a myocardial infarction model, etc.) and record the highest ranking applicable criterion as the reason for exclusion. Please sort the exclusion criteria defined in questions 19 to 24. If applicable, do so for each screening phase.

- 1) Outcomes that do not assess periodontal regeneration;
 - 2) not animal models;
 - 3) animal models with other bone defects;
 - 4) animals with ectopic transplantation of stem cell sheets;
 - 5) animals with a disease;
 - 6) stem cell sheets tested for other bone defects (not periodontal defects);
 - 7) only stem cells, cell pellets, cell aggregates, cell suspension injection in defects;
 - 8) another intervention but not for periodontal regeneration;
 - 9) not an animal study
- Clinical studies;
case reports;
in vitro studies;
- 10) studies without a separate control group and reviews.

Methods for data extraction

Describe methods for data extraction, including the number of reviewers performing data extraction, extraction of data from text and/or graphs, whether and how authors of eligible studies will be contacted to provide missing or additional data, etc.

Data will be extracted independently by two reviewers (AHM and DB), with disagreements resolved by discussion with a third reviewer (ESR). The authors of the selected publications will be contacted for clarification of data or to provide missing data if necessary. Data extraction will be from text and table.

Data to be extracted: study design

Specify the data to be extracted related to characteristics of the study design, e.g. controlled versus cross-over, number of experimental groups, etc.

number of experimental groups, number of control groups, number of animals per groups

Data to be extracted: animal model

Specify the data to be extracted related to characteristics of the animal model, e.g. species, sex of the animals, etc.

animal model, number of defects, number of animals, species, sex of animals.

Data to be extracted: intervention of interest

Specify the data to be extracted related to characteristics of the intervention of interest, e.g. dose, timing, etc. MSC origin, state of cell differentiation, number of cells transplanted, number of cell sheets, defect type, defect location.

Data to be extracted: primary outcome(s)

Define the primary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

Periodontal regeneration in defects (animal models): regeneration of cementum, periodontal ligament and alveolar bone, in percentage and / or millimeters.

Data to be extracted: secondary outcome(s)

Define the secondary outcome measure(s). For each outcome measure, specify in which format data will be extracted, including the eligible units of measurement, and data type (continuous/dichotomous). A description of any other manipulation or transformation of the extracted data that is planned may be included.

None

Data to be extracted: other

Specify any other data or study characteristics to be extracted, e.g. bibliographical details, such as author, year and language.

Bibliographical details, journal, DOI, authors, year of publication, source of funding, conflicts of interest, ethical statement, citation.

27. * Risk of bias and/or quality assessment.

State whether and how risk of bias and/or study quality will be assessed. Assessment tools specific for pre-clinical animal studies include **SYRCLE's risk of bias tool** and the **CAMARADES checklist** for study quality

No risk of bias and/or quality assessment planned No

By use of SYRCLE's risk of bias tool No

By use of SYRCLE's risk of bias tool adapted as follows:

No

By use of the CAMARADES checklist for study quality No

By use of the CAMARADES checklist for study quality, adapted as follows:

No

Other criteria, namely Yes

the Cochrane Collaboration's Tool for Assessing Risk of Bias

Method for risk of bias and/or quality assessment

Give the procedure for the risk of bias and/or quality assessment, including the number of reviewers involved, their contribution, and how discrepancies will be resolved.

Two independent and calibrated reviewers (AHM and DB) will evaluate the risk of bias according to the Cochrane Collaboration's Tool for Assessing Risk of Bias.

Disagreements between examiners will be resolved by a third adjudicator (ESR).

Based on these domains; selection bias, performance bias, detection bias, attrition bias and reporting bias, overall risk of bias was categorized as follows: (1) low risk of bias if all criteria were met; (2) unclear risk of bias if one or more criteria were partly met; or (3) high risk of bias if one or more criteria were not met.

28. * Strategy for data synthesis.

Planned approach

For each outcome measure, specify whether a quantitative or narrative synthesis is planned and how this decision will be made.

We are planning a narrative synthesis gathering in particular qualitative comparison of outcomes in periodontal regeneration.

We will provide a narrative synthesis of the findings from the included studies, structured around the type of intervention (stem cells sheets grafting used to fill periodontal defects), target population characteristics (animal models), type of outcome (periodontal regeneration) and intervention content. We will provide summaries of stem cell sheets effects for each study by calculating standardised mean differences, according to the outcome.

If a meta-analysis is planned, please specify the following:

Effect measure

For each outcome measure, specify the effect measure to be used (e.g. mean difference, odds ratio etc.). A meta-analysis is not planned.

Effect models

For each outcome measure, specify the statistical model of analysis (e.g. random-effects or fixed-effect model).

A meta-analysis is not planned.

Heterogeneity

Specify the statistical methods to assess heterogeneity (e.g. I^2 , Q). For further guidance please refer to the [introduction](#) and [practical guide](#) to pre-clinical meta-analysis.

A meta-analysis is not planned.

Other

Specify other details of the meta-analysis methodology (e.g. correction for multiple testing, correction for multiple use of control group).

A meta-analysis is not planned.

29. * Analysis of subgroups or subsets.

Subgroup analyses

Give any planned exploration of subgroups or subsets within the review. 'None planned' is a valid response if no subgroup analyses are planned.

None planned

Sensitivity

For each outcome measure, specify any sensitivity analyses you propose to perform. quantity of regeneration

Publication bias

Specify whether an assessment of publication bias is planned. If applicable, specify the method for assessment of publication bias.

No

* Review type.

Type of review

Animal model review No

Experimental animal exposure review No

Pre-clinical animal intervention review Yes

30. Language.

Select each country individually to add it to the list below, use the bin icon to remove any added in error. English

There is an English language summary.

31. * Country.

Select the country in which the review is being carried out from the drop down list. For multi-national collaborations select all the countries involved.

Brazil

32. Other registration details.

List other places where the systematic review protocol is registered. The name of the organisation and any unique identification number assigned to the review by that organisation should be included.

33. Reference and/or URL for published protocol.

Give the citation and link for the published protocol, if there is one. Give the link to the published protocol.

Alternatively, upload your published protocol to CRD in pdf format. Please note that by doing so you are consenting to the file being made publicly accessible.

No I do not make this file publicly available until the review is complete

Please note that the information required in the PROSPERO registration form must be completed in full even if access to a protocol is given.

Dissemination plans.

Give brief details of plans for communicating essential messages from the review to the appropriate audiences.

Do you intend to publish the review on completion?

Yes

34. * Keywords.

Give words or phrases that best describe the review. Separate keywords with a semicolon or new line. Periodontal regeneration; stem cells; periodontitis; regenerative medicine; tissue engineering; systematic reviews.

35. Details of any existing review of the same topic by the same authors.

Give details of earlier versions of the systematic review if an update of an existing review is being registered, including full bibliographic reference if possible.

36. * Current review status.

Review status should be updated when the review is completed and when it is published. Please provide anticipated publication date

Review_Ongoing

37. Any additional information.

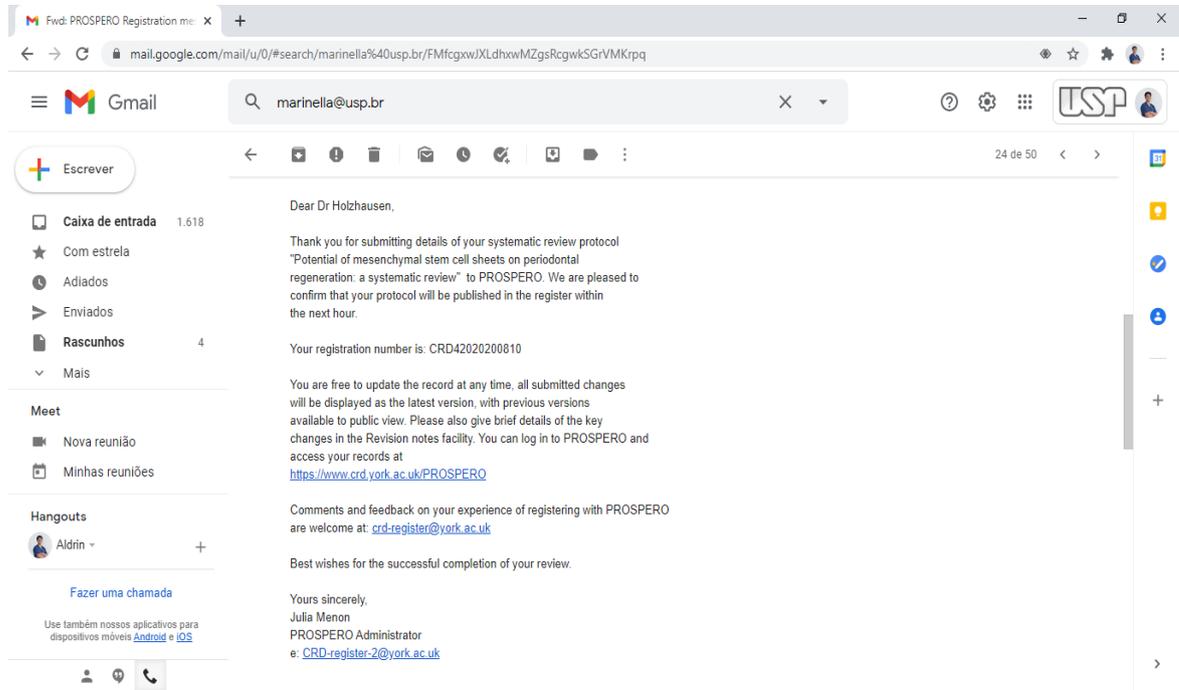
Provide any further information the review team consider relevant to the registration of the review.

38. Details of final report/publication(s) or preprints if available.

This field should be left empty until details of the completed review are available OR you have a link to a preprint. Give the full citation for the preprint or final report or publication of the systematic review.

Give the link to the published review.

ANEXO B - E-mail do PROSPERO (*International prospective register of systematic reviews*) aceitando o delineamento do protocolo da revisão sistemática e enviando o número de registro CRD42020200810



The screenshot shows a Gmail interface on a desktop browser. The browser's address bar displays the URL: mail.google.com/mail/u/0/#search/marinella%40usp.br/FMfbcgwxjXLdhwMZgsRcgwkSGrVMKrpq. The Gmail search bar contains the email address 'marinella@usp.br'. The left sidebar shows the 'Escrever' button and a list of folders: 'Caixa de entrada' (1,618), 'Com estrela', 'Adiados', 'Enviados', 'Rascunhos' (4), and 'Mais'. Below these are sections for 'Meet' (Nova reunião, Minhas reuniões) and 'Hangouts' (Aldrín). The main email content is as follows:

Dear Dr Holzhausen,

Thank you for submitting details of your systematic review protocol "Potential of mesenchymal stem cell sheets on periodontal regeneration: a systematic review" to PROSPERO. We are pleased to confirm that your protocol will be published in the register within the next hour.

Your registration number is: CRD42020200810

You are free to update the record at any time, all submitted changes will be displayed as the latest version, with previous versions available to public view. Please also give brief details of the key changes in the Revision notes facility. You can log in to PROSPERO and access your records at <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>

Comments and feedback on your experience of registering with PROSPERO are welcome at: crd-register@york.ac.uk

Best wishes for the successful completion of your review.

Yours sincerely,
Julia Menon
PROSPERO Administrator
e: CRD-register-2@york.ac.uk