

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCO-MAXILO-FACIAIS**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM USO DE  
 $\alpha$ -FOSFATO TRICÁLCICO E CÉLULAS TRONCO**

**JOSÉ LUIZ BERNARDON PRETTO**

**PORTO ALEGRE – RS  
2017**

**JOSÉ LUIZ BERNARDON PRETTO**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM USO DE  
 $\alpha$ -FOSFATO TRICÁLCICO E CÉLULAS TRONCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título da tese de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica, Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais.

Orientadora Profa. Dra. Deise Ponzoni

**PORTO ALEGRE – RS  
2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Bernardon Pretto, José Luiz  
AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM USO  
DE ALFA-FOSFATO TRICÁLCICO E CÉLULAS TRONCO / José  
Luiz Bernardon Pretto. -- 2017.  
76 f.  
Orientadora: Deise Ponzoni.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2017.

1. Células tronco. 2. Engenharia tecidual. 3.  
Reparo ósseo. 4. Biomaterial. 5. Células endoteliais.  
I. Ponzoni, Deise, orient. II. Título.

**JOSÉ LUIZ BERNARDON PRETTO**

**AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM USO DE  $\alpha$ -  
FOSFATO TRICÁLCICO E CÉLULAS TRONCO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para a obtenção do título da tese de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica, Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Deise Ponzoni (UFRGS)

---

Prof. Dr. Fabrício Mezzomo Collares (UFRGS)

---

Profa. Dra. Nance Beyer Nardi (ULBRA)

---

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber (PUCRS)

## RESUMO

PRETTO, JLB. Avaliação do reparo ósseo em fêmur de rato com uso de  $\alpha$ -fosfato tricálcico e células tronco. 2017, 73 f. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Odontológica - Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

O avanço da ciência regenerativa está se comprometendo com a busca de novas opções terapêuticas no combate as diversas doenças e disfunções orgânicas. Nessas avançadas linhas de pesquisas, as células-tronco são um símbolo dessa evolução. A variedade da aplicação deste novo e experimental método de tratamento está sendo utilizado, pela bioengenharia, para reparar tecidos e órgãos lesados. Defeitos ósseos extensos ocorrem após diversos tipos de injúrias ao esqueleto facial, como traumas faciais, ressecções por lesões agressivas e malformações congênitas. Essas sequelas são tratadas, preferencialmente, através da reconstrução utilizando enxertos ósseos de origem autógena. Entretanto, às desvantagens proporcionadas pela obtenção do tecido ósseo autógeno, lançaram um dos maiores desafios, da bioengenharia que é a busca pelo aprimoramento dos substitutos ósseos. Nesse caminho do aprimoramento dos biomateriais a adição de células-tronco mesenquimais representam a possibilidade da criação de um sinergismo, entre as células e o arcabouço, para otimizar a osteogênese. Nessa linha, esse estudo propõe-se a avaliar o reparo ósseo em estudo experimental, em modelo animal, através do tratamento de defeito ósseos criados em fêmures de ratos. A amostra dessa pesquisa foi composta de 96 ratos albinos da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), isogênicos. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o tipo de tratamento (Grupo I:  $\alpha$  – TCP + ADSCs; Grupo II:  $\alpha$  – TCP + ADSCs/ENDO; Grupo III:  $\alpha$  – TCP; Grupo IV). A cultura de células tronco tiveram como tecido de origem o tecido adiposo da região abdominal e as células endoteliais foram coletadas da medula óssea. A peças foram avaliadas em 03 períodos de tempo diferentes (07, 14 e 21 dias). A histomorfometria avaliou a área de neoformação óssea dos defeitos bem como a imunohistoquímica com marcação para a proteína VEGF avaliou a eficácia da adição das células endoteliais. Os resultados demonstraram, através dos testes estatísticos que houve uma diferença estatisticamente significativa, no reparo ósseo, favorecendo os tratamentos dos defeitos que utilizaram a terapia celular e a vascularização foi também otimizada no grupo que foi tratado com a adição das células endoteliais. Dessa forma conclui-se que nesse modelo de estudo a utilização das ADSCs foram capazes de otimizar o reparo ósseo.

**Palavras-chaves:** Engenharia tecidual. Células tronco. Regeneração óssea.

## ABSTRACT

PRETTO, JLB. **Evaluation of bone defects repair using stem cell combined with alpha-tricalcium phosphate as scaffold: *in vivo* study.** 2017, 73 f. Tese (Doutorado em Odontologia - Área de Concentração em Clínica Odontológica - Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-faciais – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

The regenerative medicine has been searching for a new therapeutic options to manage diseases and also organic dysfunctions. The advanced research fields, has enrolled the stem cells to achieve the upgrade in the new treatment objectives. The bioengineering is application of this new and experimental, treatment method to repair damaged tissues and organs using the stem cells, includes the possibility to accelerating and improving the bone repair process. The autogenous bone graft has been considered the gold standart graft material to reconstruction the bone defects, fundamentally because of the osteogenic potential. However, the harvest disadvantages autogenous bone tissue leads to the search for bone substitutes improvement. In this field a promising alternative has been proposed by tissue engineering. The totipotent cells, also called mesenchymal stem cells, which has the cellular plasticity ability, is associated with biomaterials, creating a synergy, between these cells and the scaffold, to optimize the osteogenesis. The tissue engineering application to tissue repair has been extensively researched with the aim of proposing more reliable and more efficient clinical methods. Although the effects of the use of adult stem cells are well known in bone marrow transplants, in some areas, such as bone repair, there is still lack of scientific data. This research was conducted, in animal model, to assessment bone repair in created femoral bone defects treated with mesenchymal stem cells. 96 animals (*Rattus norvegicus albinus* - *Spontaneously Hypertensive Rats*) were randomly divided into four groups (Group I:  $\alpha$  - TCP + ADSCs, Group II:  $\alpha$  - TCP + ADSCs/Endo, and Group III:  $\alpha$  - TCP; (07, 14 and 21 days). The histological sections were stained in H&E and the histomorphometry was used to evaluated the new bone formation area in the defects and also the immunohistochemical expression of VEGF was analysed. Our results suggest that the combination of ADSCs and the scaffold was able to enhance the bone repair in this study model.

**Key Words:** Tissue engineering. Stem cells. Bone regeneration

*A formação de um Profissional percorre longos e difíceis caminhos para que tenhamos o encontro com a excelência. Não apenas devemos conquistar o aprimoramento técnico e científico, mas também exercer o respeito pelas pessoas. O lado humanístico do Profissional é sem dúvida uma das suas principais características, e por isso dedico parte desse meu aprendizado aos meus pais **Luiz Antonio Pretto (in memoriam)** e **Loiva Bernardon Pretto** que acima de tudo ensinaram-me a respeitar e valorizar a individualidade de cada pessoa sem transgredi-la.*

*Também dedico essa Tese a minha esposa **Mauren Depra Pretto** que esteve ao meu lado me apoiando e me incentivando nesse longo caminho e ao meu filho **Enrico Depra Pretto** que completou a nossa família. Amo vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a toda minha família pelo estímulo e apoio durante esse período da elaboração dessa tese. Certamente cada um de vocês foi importante nessa trajetória e a partir de agora poderemos conviver mais para que eu possa retribuir o carinho que depositaram em mim.

A minha orientadora Profa. Dra. Deise Ponzoni pelo exemplo de caráter, profissionalismo, orientação e conselhos pertinentes para a elaboração desse trabalho. Agradeço a compreensão, a confiança e pelos momentos vivenciamos ao longo desses anos. Muito obrigado Profa. Deise.

A Profa. Dra. Edela Puricelli pela oportunidade do convívio e ensinamentos. Certamente és um exemplo de pessoa e profissional, levo comigo o seu afinho e dedicação à docência e a constante busca pela qualificação profissional. Agradeço pela oportunidade de fortalecer as minhas bases do conhecimento.

A Profa. Dra. Nance Beyer Nardi agradeço impensadamente a colaboração, colocando ao nosso dispor todo o seu conhecimento e a sua estrutura laboratorial para que pudéssemos executar essa pesquisa. Certamente o seu conhecimento sobre esse tema não pode ser medido e é inversamente proporcional a sua humildade. Fica aqui registrado todo o meu respeito e admiração pelo seu trabalho.

A Profa. Dra. Fernanda Visioli mesmo não estando envolvida diretamente na execução desse projeto teve sua parcela importante e fundamental de colaboração. Meus sinceros agradecimentos por colocar a disposição a sua sabedoria e a sua invejável paciência.

A Profa. Dra. Adriana Corsetti que foi parceira nesse projeto e juntamente com os seus alunos de Iniciação Científica puderam colaborar de sobremaneira para o desenvolvimento e finalização dessa Tese. Meu muito obrigado.

Aos meus colegas de trabalho na Unochapecó indistintamente quero exautalos pela compreensão e suporte durante meus períodos de ausência.

Agradeço a todos os Professores do Programa de Pós Graduação de Odontologia da UFRGS que contribuíram para o meu doutoramento. De uma forma ou de outra foram capazes de me direcionar na busca pela excelência na formação acadêmica. A Instituição Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a Faculdade



de Odontologia por proporcionar uma formação de alto nível e oferecer ao aluno toda a estrutura necessária para o bom desenvolvimento dos projetos acadêmicos.

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Loureiro dos Santos pela gentileza de fornecer a essa pesquisa o biomaterial, viabilizando esse projeto.

A equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que é muito bem capitaneada pela Enfa. Marta Justina Giotti Cioato, agradeço pela dedicação e presteza para conosco durante a fase experimental.

Agradeço a Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre Acadêmica (FIPE/HCPA) por ter suportado financeiramente esse projeto.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Multilinhagens celulares a partir da célula tronco mesenquimal .....	14
Figura 2 – Avaliação da neovascularização .....	54
Figura 3 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 07 dias de reparo. ....	55
Figura 4 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 14 dias de reparo. ....	55
Figura 5 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 21 dias de reparo. ....	56
Figura 6 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 07 dias de reparo. ....	56
Figura 7 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 14 dias de reparo. ....	57
Figura 8 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 21 dias de reparo. ....	57

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
2.1 CÉLULAS TRONCO.....	11
2.1.1 Plasticidade.....	11
2.1.2 Efeito parácrino e autócrino.....	12
2.1.3 Tipos Celulares.....	13
2.1.4 Células-tronco mesenquimais .....	13
2.1.5 Células-tronco mesenquimais – fonte tecido adiposo .....	15
2.2 BIOMATERIAL .....	16
2.3 ENGENHARIA TECIDUAL .....	18
2.4 CÉLULAS ENDOTELIAIS .....	18
2.5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO ÓSSEO .....	20
2.6 ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E ENDOTELIAIS NO REPARO ÓSSEO .....	23
<b>3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4 ARTIGOS .....</b>	<b>25</b>
4.1 ARTIGO 01.....	25
4.2 ARTIGO 02.....	41
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>75</b>
<b>CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA .....</b>	<b>75</b>

## **1 APRESENTAÇÃO**

Essa tese está composta por uma introdução sobre o tema principal que é a engenharia tecidual com a utilização de células tronco no reparo ósseo e a sua sequencia é composta por dois artigos científicos.

O primeiro deles é um artigo que trata sobre uma revisão narrativa da literatura a respeito da atuação das células tronco, oriundas do órgão dental, no reparo ósseo com o objetivo de informar e fornecer uma visão geral, do tema em questão, a comunidade odontológica.

O segundo é um trabalho de pesquisa em modelo animal onde testou-se o tratamento com células tronco dos defeitos ósseos criados como o objetivo de observar o comportamento da engenharia tecidual no modelo animal e metodologia apresentadas no artigo.

Ao final serão apresentadas as considerações finais sobre esse tema.

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 CÉLULAS TRONCO**

Todas as células descendem da fertilização de um óvulo. A partir de então, forma-se uma massa circular de células, conhecida como blastocisto, que contém células pluripotentes ou células tronco-embrionárias que irão formar todas as linhagens celulares. Existem duas populações de células; aquelas que são pós-mitóticas e responsabilizam-se pela manutenção da atividade fisiológica, e as células-tronco que agem tanto no desenvolvimento de um órgão ou tecido como no reparo, do mesmo, após uma determinada lesão estrutural. As células-tronco estão presentes, desde muito cedo, e em grande quantidade no desenvolvimento embriológico. Na medida em que ocorre a transição, para um organismo adulto, essas células vão dando lugar as pós-mitóticas que estarão em maior número no final desse processo (TOHILL; TERENCE, 2004; ALISON et al., 2002).

#### **2.1.1 Plasticidade**

O termo plasticidade, das células-tronco, é frequentemente utilizado para descrever o potencial dessas células transformarem-se em tecidos ou em linhagens celulares (LOEFFLER; ROEDER, 2002).

Experimentos utilizando células coletadas da medula óssea têm demonstrado a capacidade de plasticidade, ou seja, o potencial de transformação dessas células em estruturas altamente especializadas como células do sistema nervoso central (CHANG et al., 2014; FENG et al., 2014; MEZEY et al. 2000), células musculares (OSTROVIDOV et al., 2015) e células cardíacas (ALESTALO et al., 2013; ORLIC et al., 2001).

### 2.1.2 Efeito parácrino e autócrino

O fundamento original da terapia regenerativa, utilizando as células tronco, foi baseado na recuperação funcional, como uma consequência da diferenciação dessas células. Atualmente torna-se claro que outros mecanismos de ação atuam nesse processo. A localização das células tronco é determinada pelo local de implantação, pelo microambiente criado pelas células vizinhas e pelas biomoléculas sintetizadas por elas. (SCADDEN, 2006).

A atividade das células tronco contribui para o estabelecimento do meio através da secreção de citocinas, fatores de crescimento e moléculas da matriz extracelular, dentre outras proteínas e fatores. Esse fenômeno denomina-se ação autócrina, pois atua sobre as próprias células. Entretanto, quando essas células estimulam as células vizinhas, esse processo biológico define-se como ação parácrina. Nessa linha de raciocínio, uma clara compreensão da produção biomolecular das células-tronco e progenitoras pode estabelecer um novo discernimento da regulação dos fenótipos celulares. Esclarecendo assim a definição da participação funcional das células tronco no processo de reparo tecidual e também, indicando a fonte apropriada de coleta para cada situação específica de reparo e regeneração tecidual (BARANIAK; McDEVITT, 2010).

O benefício funcional observado após a transferência das células tronco em modelos animais, com alterações cardiológicas, pode estar relacionado com a secreção de fatores solúveis que, agem através do efeito parácrino, protegendo o coração, atenuando a remodelação ventricular patológica, induzindo a neovascularização e promovendo a regeneração (GNECCHI et al. 2005). A ação das células-tronco adultas no reparo cardíaco deve-se a regeneração dos cardiomiócitos, a neovascularização e a ação parácrina (GNECCHI et al. 2008). A concentração de proteínas teciduais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), entre outros, estão significativamente aumentados no tratamento de lesões cardíacas com células tronco mesenquimais (YOON et al. 2005).

Os mediadores parácrinos são liberados promovendo diferentes efeitos dependendo do ambiente estabelecido após a injúria. Adicionalmente, esses fatores podem estabelecer ações autócrinas na biologia das próprias células tronco. Nesse

contexto, as hipóteses autócrinas e parácrinas ampliam o tradicional conceito e colocam esses fatores liberados pelas células tronco como moduladores da biologia dessas células e do reparo (GNECCHI et al. 2008).

### **2.1.3 Tipos Celulares**

Conceitualmente existem dois tipos de células-tronco potencialmente utilizáveis: as embrionárias e as células-tronco autógenas que também são conhecidas como células tronco adultas ou ainda como células tronco pós-natal. As embrionárias são originárias do blastocisto. Contrariamente, as adultas são encontradas em tecidos pós-natal, podendo incluir tecido fetal, do cordão umbilical, células sanguíneas e tecido ósseo (ZUK, 2010; ZUK et al., 2001).

### **2.1.4 Células-tronco mesenquimais**

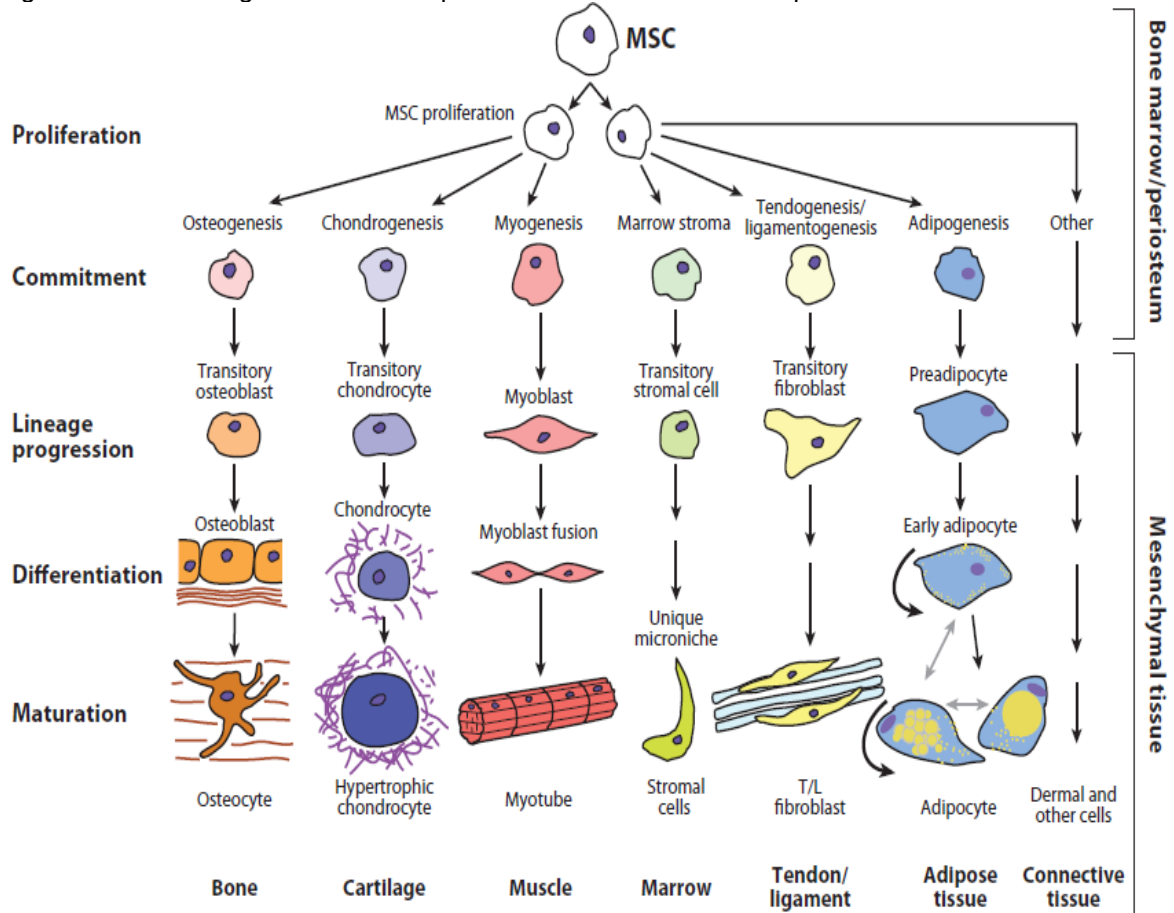
O termo células-tronco mesenquimais (CTMs) é rotineiramente aplicado para preparações celulares obtidas a partir da medula óssea ou outros tecidos que são positivos para algumas proteínas de membrana como CD105, CD90, CD73 e negativos para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR e capazes de diferenciar-se em pelo menos osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob específicas condições de diferenciação *in vitro* (DOMINICI, et al., 2006; WAGNER, et al., 2005).

Tecidos pós nascimento possuem reservas específicas de células tronco que contribuem para a manutenção e regeneração dos mesmos, dentre eles podemos citar células-tronco epiteliais da epiderme, células tronco neurais encontradas no sistema nervoso central e células satélites no músculo. A medula óssea adulta apresenta diferentes tipos de células tronco, como por exemplo, as hematopoiéticas e as mesenquimais (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Células-tronco mesenquimais humanas adultas, são células multipotentes, que podem ser isoladas, devido a sua capacidade de adesão ao substrato, a partir de uma variedade de tecidos incluindo medula óssea, músculo, tecido adiposo e

derme (GARCÍA-CASTRO, et al., 2008; CAPLAN, 2007; CAPLAN, 2005). Dependendo da estimulação e em que condições a cultura é empregada, essas células podem, expandir-se facilmente (GARCÍA-CASTRO, et al., 2008), e formar tecido ósseo, cartilaginoso, tecido adiposo e outros tecidos conjuntivos (CAPLAN, 2007; CAPLAN, 2005). (Figura 01)

Figura 1 – Multilinhagens celulares a partir da célula tronco mesenquimal



Fonte: CAPLAN, 2009.

Embora convencionalmente a literatura apresente a medula óssea como principal fonte para se isolar as CTMs, existem comprovações científicas que essas células estão dispostas em todo o organismo e sugere-se que as mesmas residam em associação com os vasos sanguíneos (COVAS, et al., 2008; DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

Algumas características como o potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e a habilidade de se multiplicar *ex vivo*, enquanto mantém sua propriedade de diferenciação, transformam essas células, devido ao seu potencial terapêutico, em um alvo bastante interessante para a utilização na medicina



regenerativa e engenharia tecidual. A viabilidade da utilização das CTMs como a base da terapia celular tem sido reportada na literatura (LIU; ZHUGE; VELASQUEZ, 2009).

### **2.1.5 Células-tronco mesenquimais – fonte tecido adiposo**

A medula óssea é considerada a principal fonte das células-tronco mesenquimais. Entretanto, a literatura científica têm indicado outros tecidos como possíveis doadores, nos quais a sua obtenção apresenta menor morbidade e a possibilidade da coleta de um volume maior do que a fonte em questão (ZUK, et al., 2002; ZUK, 2010).

Teoricamente a utilização das células-tronco mesenquimais adiposas, na engenharia óssea tecidual, comparadas com as de origem da medula óssea, apresentam vantagens como a menor invasão tecidual para sua obtenção, habilidade de se obter um volume maior de células-tronco (ZUK, et al., 2001; ZUK, 2010; FRASER, et al., 2006), alta taxa de proliferação e possibilidade de auto-uso (ZUK, et al., 2001; ZUK, 2010). Pode-se ainda, relatar que a frequência da fosfatase alcalina no tecido adiposo digestivo é 500 vezes maior do que a encontrada na medula óssea (FRASER, et al., 2006).

Com a descoberta das células-tronco, pluripotentes, derivadas do tecido adiposo, a engenharia tecidual pode oferecer uma alternativa viável devido a sua capacidade de rápida proliferação e diferenciação em múltiplas linhagens (CAPLAN, 2000; ZANETTI, et al., 2012; LIU, et al., 2013). São obtidas sem a morbidade da coleta da medula óssea e tem sido estimuladas a partir da expressão gênica e por proteínas marcadoras associadas com osteoblastos, condrócitos, adipócitos, endotélio e miócitos (ZUK, et al., 2002; FOLLMAR, et al., 2007).

Viero et al. (2012) para melhor entender o local onde residem as CTMs, analisaram a expressão gênica relacionada com a pluripotencialidade de diferenciação de culturas de origem mesodérmica (tecido adiposo) e endodérmica (pulmão), mantidas em diferentes condições. Os resultados desse estudo demonstraram que as CTMs, oriundas do tecido adiposo, apresentaram um alto potencial de diferenciação em direção à linhagem osteogênica. Sugerindo então,

que esses achados contribuem na indicação da melhor fonte para obtenção das células, que serão utilizadas em ensaios clínicos envolvendo a terapia celular ou a engenharia tecidual.

## 2.2 BIOMATERIAL

Existem diversos materiais disponíveis para a reconstrução de defeitos ósseos. Podemos dividi-los em: autógenos (provenientes do próprio indivíduo), alógenos (obtidos de indivíduos da mesma espécie), xenógenos (provenientes de indivíduos de espécies diferentes) e aloplásticos (materiais sintéticos ou naturais).

Os materiais sintéticos utilizados incluem os cimentos de fosfato de cálcio sintéticos, polímeros para substituição de tecidos duros (HTR) e biovidros cerâmicos. Ainda buscando as propriedades adequadas, esta classe tem revolucionado os campos das pesquisas e tratamentos, pois além de evitar um segundo sítio operatório, apresenta várias opções estruturais, diversos tamanhos, textura, grau de porosidade (macro ou microporoso), grau de cristalinidade (cristalino ou amorfo) e solubilidade (absorvíveis ou não absorvíveis) (GRANJEIRO et al.; 2004; BLANCH, 2004; CALASANS-MAIA et al., 2008).

Os cimentos de fosfato de cálcio representam uma alternativa clínica para a utilização de biocerâmicas tradicionais pois podem ser facilmente manipulados e moldados ao defeito, proporcionando uma íntima adaptação (BROWN; CHOW, 1986). Esses materiais tem atraído grande interesse desde o início do seu desenvolvimento em meados do anos 80, devido a sua similaridade química com a porção mineral do tecido ósseo e sua boa osteocondutividade (LEGEROS; COHAYE; SHULMAN, 1982). Apresentam ainda, uma série de vantagens de utilização sendo a mais destacada a sua biocompatibilidade e bioatividade, que permitem a osteocondução dos tecidos e o endurecimento "*in situ*". A principal desvantagem destes cimentos é sua baixa resistência mecânica, que no melhor dos casos consegue igualar-se à do osso trabecular, o que limita a sua utilização em regiões que recebem altas cargas (SANTOS, 2003).

Uma das mais importantes formulações está baseada no  $\alpha$  – fosfato tricálcico, a qual *in situ* transforma-se em um cálcio deficiente de hidroxiapatita

(Ca<sub>9</sub>(H-PO<sub>4</sub>)(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>(OH); CDHA) quando hidratado. Conhecendo o excelente poder de biodegradação desse material, os pesquisadores estão concentrando esforços no sentido de reforçar as propriedades mecânicas dos cimentos de fosfato de cálcio. Essa otimização é obtida a partir da adição de fibras e aditivos de reforço, que conduzem para a formação de vários compósitos proporcionando aumento da resistência (DOROZHKIN, 2009).

O  $\alpha$ -TCP apresenta uma favorável biodegradação, biocompatibilidade e osteocondutividade. A taxa de absorção desse material é mais elevada quando comparada com o  $\beta$ -TCP (LI; WENG; TAM, 2007; YAMADA; SHIOTA; YAMASHITA; KA-SUGAI, 2007). Os substratos degradados, como por exemplo, o Ca<sup>2+</sup> e o PO<sup>3-</sup> são rapidamente absorvidos e substituídos. Sendo esses requeridos no processo de diferenciação osteoblástica e na mineralização da matriz óssea (KO et al., 2013), pode-se provavelmente associa-los com a promoção e a diferenciação osteogênica das BMSCs quando o  $\alpha$ -TCP é utilizado como arcabouço (LIU et al., 2015).

O efeito desse biomaterial na diferenciação das células tronco originárias da medula óssea (BMSCs) foi avaliado e os resultados sugerem que esse material, provavelmente, é capaz de promover a diferenciação osteogênica através da regulação da expressão gênica de ALP (fosfatase alcalina), COL-1 (colagenase tipo 1), Runx2 (fator de transcrição 2 relacionado ao Runt) e SP7. O nível da ALP conservou-se alto, indicando o efeito osteogênico indutivo desse material no estágio inicial da diferenciação celular das BMSCs. Então, esse material pode não somente facilitar a diferenciação osteoblástica como também acelerar a mineralização da matriz extracelular. Ainda nesse mesmo estudos, os pesquisado sugerem que o cálcio produzido pela degradação dos poros desse biomaterial, provavelmente em contato com as BMSCs, ativaram a via de sinalização mediada pelas proteínó-quinases ativadas por mitógeo (MAPKs), através da ativação dos receptores de cálcio na superfície da membrana, reforçando a diferenciação e alcançando o excelente efeito osteoindutor (LIU et al., 2015).

Como ressaltado anteriormente as propriedades mecânicas e biológicas do  $\alpha$ -TCP vem sendo otimizadas pelos pesquisadores. Recentemente uma manobra química visou fornecer a esse material um acréscimo nos níveis de infiltração celular e crescimento ósseo, otimizando a osteocondução bem como a taxa de reabsorção

desse biomaterial ( NINO; SANTOS, 2016).

### 2.3 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e da ciência biológica com o intuito de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções teciduais. (STYLIOS; WAN; GIANNOUDIS, 2007)

O objetivo final da engenharia tecidual e da medicina regenerativa é restaurar a função tecidual, ou promover a cicatrização dos defeitos teciduais, em situações onde esses foram degenerados ou estão acometidos por determinadas doenças. Esse resultado pode ser alcançado através da utilização de arcabouços inundados com células progenitoras exógenas, pela ativação das células tronco residentes ou através da indução de células endógenas a diferenciação, para que essas adquiram as propriedades de células-tronco ou progenitoras (SCHINDELER; KOLIND; LITTLE, 2013).

O campo da engenharia tecidual tem observado avanços significativos que vão em direção a formação de tecido ou de partes de órgãos, como por exemplo tecido cardíaco, vasos sanguíneos, traqueia cardíaca valvar, dentre outros (AKHYARI et al. 2008; DELAERE et al. 2010; HAMILTON et al. 2014), que podem ser funcionalmente integrados, após a sua implantação, ao organismo substituindo assim, o órgão ou tecido defeituoso ou doente com sucesso (ZHANG; ZHANG, 2015).

### 2.4 CÉLULAS ENDOTELIAIS

O tratamento de defeitos ósseos tem sido realizado, tanto em humanos como em modelos animais, através de arcabouços biologicamente impregnados com células tronco. Entretanto, dependendo da extensão do defeito, o reparo ósseo poderá ser prejudicado pela deficiência de vasos sanguíneos que deverão nutrir integralmente o enxerto. A vascularização precoce dessa região, ou do próprio

arcabouço, é necessária para o desenvolvimento das células osteogênicas que promoverão o reparo ósseo. Sendo assim, a otimização do reparo é dependente de uma adequada vascularização no sítio do defeito (SEEBACH, et al. 2012; ABSHAGEN, et al. 2009; YOUNG, et al. 2008).

Uma das formas de alcançar a tão almejada otimização da vascularização inicial é através da aplicação de células progenitoras endoteliais. Essas células representam uma pequena população que tem a capacidade de se proliferar, migrar e diferenciarem-se em células da linhagem vascular (LUTTUN, et al. 2002).

Estudos clínicos têm demonstrado que esse tipo celular está envolvido em regiões que estão em processo de neovascularização. Além disso, se mostra capaz de apresentar alta atividade neovascular e angiogênica, *in vivo*, após trauma tecidual e isquemias. Atuando então, como uma importante peça no processo do reparo vascular (JEON, et al. 2007).

A associação de células-tronco mesenquimais e endoteliais constitui uma potente possibilidade de tipo celulares para otimizar o reparo ósseo. Pois, essas células apresentam um extenso potencial de proliferação e são capazes de se diferenciarem em células regenerativas, favorecendo a vascularização inicial e acelerando o reparo ósseo em defeitos ósseos *in vivo* (KIM; PARK; IM, 2014; SEEBACH, et al. 2012; SEEBACH, et al. 2010) e *in vitro* essa associação demonstrou o aumento da expressão de marcadores angiogênicos e a influência positiva sobre a osteogênese (BÖHRNSEN; SCHLIEPHAKE, 2016).

O transplante de células endoteliais progenitoras pode influenciar a vascularização em duas diferentes vias. A primeira indica para uma significativa contribuição da neoformação dos vasos intra-ósseos através da diferenciação das células endoteliais (CROSBY et al., 2000). A segunda via pode ser indicada pela liberação de moléculas quimiotáticas que atraem as células endoteliais progenitoras residentes. Essas células são mobilizadas a partir da medula óssea por fatores de crescimento como VEGF e citocinas (YAMAGUCHI et al., 2003). As células precursoras endoteliais têm a habilidade de conduzir a diferenciação de fatores e desenvolver a vascularização (SIMCOCK et al., 2009).

A capacidade dessas células de participarem do processo de reparo normal, bem como induzirem a regeneração tecidual, ainda precisam de maiores comprovações. Para tal, serão necessários mais estudos confiáveis para mostrar a

habilidade de células endoteliais transplantadas e endógenas na contribuição do reparo ósseo, bem como na remodelação das fraturas e tratamento dos defeitos críticos (MATSUMOTO, et al., 2008).

## 2.5 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NO REPARO ÓSSEO

As células tronco mesenquimais apresentam um potencial terapêutico evidente para o reparo de defeitos ósseos, fato esse evidenciado por inúmeros estudos. Um deles realizado *in vitro* mostrou a capacidade angiogênica e osteogênica das células mesenquimais coletadas da medula óssea humana e aplicadas em um arcabouço tri-dimensional, sugerindo ser uma excelente via para a otimização do reparo ósseo (MURPHY; FANG; LEACH, 2014).

Em um modelo experimental, Bohnenblust et al. (2009), através de defeitos ósseos criados em calotas cranianas de ratos, avaliaram a otimização da remodelação óssea, através da associação de células-tronco adiposas, diferenciadas em osteogênicas, com enxerto alógeno. Os resultados indicaram que essas células podem aumentar a eficiência do reparo ósseo quando associadas ao arcabouço em questão.

Corroborando com os achados anteriores, porém, com uma metodologia diferente, Schubert et al. (2011), compararam a influência das células-tronco, oriundas da medula óssea e do tecido adiposo, não diferenciadas e em estágios de diferenciação osteogênica na melhora do padrão dos enxertos homólogos. Através do processo de marcadores imunohistoquímicos, avaliação microestrutural e histomorfométrica, concluíram que as células osteogênicas diferenciadas, oriundas do tecido adiposo, são as melhores candidatas para aprimorar a angiogênese e a osteogênese dos aloenxertos.

Após a implantação do enxerto no sítio receptor, esse irá obter uma alta taxa de sobrevivência, caso exista uma rede de vasos e capilares sanguíneos capazes de nutri-lo integralmente. Com a preocupação de tornar viável, que arcabouços inundados com células-tronco sejam utilizados e promovam uma alta taxa de sobrevivência, Declercq et al. (2013), pesquisaram a possibilidade de construir blocos teciduais a partir de células tronco mesenquimais adiposas, associadas a

micro-carreadores. Essa técnica conhecida como *bottom-up approach* foi comparada a técnica convencional que é denominada de *top-down approach*. Nessa última, um arcabouço é inundado com células-tronco. Através das avaliações de imunohistoquímica, da capacidade de diferenciação e expressão gênica os autores observaram os seguintes aspectos: índice de células encontradas na superfície, distribuição, colonização e diferenciação osteogênica em ambas as técnicas e células de origens diferentes. Concluíram que a técnica *bottom-up* proporciona a possibilidade da construção de enxerto ósseo, através de micro-carreadores inundados de células-tronco com uniforme distribuição e alta concentração celular em toda a estrutura. Ao contrário dos arcabouços utilizados na técnica convencional que nunca são completamente colonizados. A respeito da comparação, entre o potencial osteogênico e condrogênico, das células oriundas do tecido adiposo e do tecido ósseo, os dados revelaram que ambas as origens apresentam potenciais semelhantes.

Resultados estatisticamente significantes também foram encontrados por Agacayak et al. (2012), quando avaliaram os efeitos das células-tronco mesenquimais em defeitos ósseos críticos. O modelo experimental utilizado foram ratos, divididos aleatoriamente em 05 grupos. Avaliaram cinco cavidades preenchidas com composições diferentes. A associação de fosfato cerâmico de cálcio bi-fásico, células mesenquimais e PRP (plasma rico em plaquetas) apresentou o melhor desempenho nas avaliações imunohistoquímicas, radiográficas e de densidade óssea.

Os inúmeros trabalhos, a respeito de CTMs, demonstram o interesse da comunidade científica em desvendar o real benefício do auxílio dessas células no tratamento dos defeitos ósseos. Está se evoluindo profundamente para a criação de uma forma segura de utilização dessa terapia. Porém, ainda existe a necessidade de se ampliar as investigações (ZUK, et al., 2001; FRASER, et al., 2006; BOHNENBLUST, et al., 2009; ZUK, 2010; ZANETTI, et al., 2012; LIU, et al., 2013).

Seebach et al. (2010), testaram a associação de células endoteliais progenitoras e células-tronco mesenquimais, com a utilização de um arcabouço sintético no reparo de defeitos ósseos críticos em ratos. Os achados deste estudo apontam para uma combinação poderosa dessas células no que diz respeito à otimização do reparo ósseo. As avaliações laboratoriais mostraram existir um bom e

precoce suporte na vascularização bem como a aceleração do reparo ósseo *in vivo* em defeitos ósseos críticos.

Aloise et al. (2015) publicaram um estudo que avaliou o efeito da utilização de células tronco mesenquimais, coletadas da medula óssea no reparo ósseo. Para tal utilizaram a comparação entre três distintos tratamentos dos defeitos ósseos, criados bilateralmente, no osso parietal de coelhos. Um grupo teste foi tratado utilizando um xenoenxerto como arcabouço para a inundação com células-tronco. Já no grupo denominado como controle positivo foi preenchida a cavidade com osso autógeno e o por último no controle negativo o defeito foi tratado apenas com xenoenxerto. Após 08 semanas os animais foram mortos e as peças foram avaliadas histologicamente. Como resultado os autores apresentaram que os defeitos tratados com enxerto autógeno e a associação entre o xenoenxerto e as células-tronco obtiveram resultados semelhantes na reconstrução e quando comparados com grupo controle negativo foram superiores em todas as avaliações.

Outras fontes alternativas de células-tronco vêm sendo testadas, além da medula óssea, pois essa apresenta uma certa morbidade pós coleta que pode ser minimizada com a comprovação da eficiência dos sítios doadores alternativos. Nesse caminho, Todeschi et al. (2015), publicaram um estudo com a utilização do cordão umbilical como doador de CTMs para otimizar o reparo ósseo. Essas células foram implantadas em um arcabouço (*scaffold*) e instaladas na região subcutânea e em defeitos ósseos na calvária de ratos. As propriedades angiogênicas dessas células e a influência sobre o reparo foram testadas. Nos implantes subcutâneos os autores observaram um acréscimo significativo na neoformação vascular. No que diz respeito ao reparo ósseo observado nos defeitos, os autores relatam um aumento significativo na formação óssea. As células-tronco provenientes do cordão umbilical podem estimular a angiogênese e o reparo ósseo de forma semelhante às CMTs originárias da medula óssea.



## 2.6 ASSOCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E ENDOTELIAIS NO REPARO ÓSSEO

O reparo ósseo vertical foi testado em calvárias de ratos através da associação de CTMs diferenciadas em células osteogênicas, células endoteliais e um biomaterial em dois estudos. Essa combinação foi depositada sobre a cortical, que recebeu perfurações para ativação do sítio, e uma barreira rígida (cúpula) de ouro recobriu essa área, simulando assim, a técnica de regeneração ósseo guiada. Os resultados demonstraram que houve uma estimulação da neovascularização, especialmente na fase inicial da formação óssea (ZIGDON-GILADI, et al., 2015), bem como o reparo ósseo foi otimizado e a densidade mineral aumentada (ZIGDON-GILADI, et al., 2015; ZIGDON-GILADI, et al., 2014).

Em uma revisão sistemática com meta-análise publicada recentemente, os autores através de seus critérios de elegibilidade selecionaram 12 estudos. Nestes avaliaram através da meta-análise os resultados da associação das CTMs com as endoteliais na neovascularização, nas doenças cardiovasculares, no reparo ósseo e nas doenças cerebrovasculares. Os resultados revelaram que essa associação melhorou a concentração de fosfatase alcalina e volume ósseo em tecidos ósseos injuriados (SUN, et al., 2016).

### **3 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS**

Este estudo propõe-se a avaliar o processo de reparo ósseo em modelo de cavidade em fêmur de rato, baseado na aplicação de células tronco de origem adiposa e células endoteliais, associadas a um biomaterial sintético, o alfa-fosfato tricálcico. Dessa forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) analisar quantitativamente a formação óssea, nos grupos testados, em uma determinada área de reparo através de um processo, de análise computacional, denominada de histomorfometria;
- b) avaliar o potencial de revascularização, através da adição das células endoteliais, na gênese do tecido ósseo a partir da quantificação da proteína VEGF através de imunohistoquímica.

## 4 ARTIGOS

### 4.1 ARTIGO 01

#### **Células Tronco de Origem Dentária e Reparo Ósseo: Uma Revisão Stem Cells of Dental Origin and Bone Repair: A Review**

José Luiz Bernardon Pretto\*

Deise Ponzoni\*\*

\*Mestre em CTBMF, Doutorando do Programa de Pós Graduação da UFRGS, Professor Adjunto do Curso de Odontologia da Unochapecó – Chapecó- Santa Catarina.

\*\*Doutora em CTBMF, Professora Associada do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Odontologia da UFRGS – Porto Alegre – Rio Grande do Sul.

José Luiz Bernardon Pretto – Unochapecó – Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Curso de Odontologia - Rua Senador Atílio Fontana, 591-E, Bairro Efapi, 89809-000, Chapecó, Santa Catarina. E-mail: [jl.pretto@hotmail.com](mailto:jl.pretto@hotmail.com)

## RESUMO

As células tronco mesenquimais de origem dentária foram isoladas, caracterizadas e atualmente têm sido utilizadas pelo seu potencial de diferenciação, em múltiplas linhagens celulares, nos vários campos que buscam desenvolver a engenharia tecidual. A medicina regenerativa, com a utilização dessas células invade a ortopedia, a neurologia e também a odontologia regenerativa, promovendo a oportunidade de regenerar funções orgânicas vitais para o ser humano. A chave para o sucesso dessa terapia é o poder que essas células possuem de auto renovação e por apresentarem características de células progenitoras. Nesses últimos anos, as células tronco dentais têm sido amplamente investigadas, no campo da engenharia tecidual, para a regeneração neuronal, óssea, cartilaginosa, dentre outras. Essas células, comprovadamente, apresentam potencial de diferenciarem-se em células osteogênicas progenitoras, fato esse, sinaliza que futuramente poderão ser utilizadas na engenharia tecidual óssea, com aplicação clínica. As fontes dessas células incluem a polpa dentária, o ligamento periodontal e os dentes decíduos. Nesse artigo, baseado em evidências científicas atuais, descreve-se uma visão geral do potencial de transformação e diferenciação celular das células tronco de origem dentária em células osteogênicas progenitoras e a sua influência no reparo ósseo.

**Palavras chaves:** Células tronco, Engenharia tecidual, Dentes

## ABSTRACT

The mesenchymal stem cells of dental origin (DMSCs) were isolated and characterized and now it has been selected by their differentiation potential into multiple cell lineages in many fields that have interest to developed of the tissue engineering. These cells have been applied regenerative in the regenerative medicine toward orthopedic, neurology and also in the regenerative dentistry, promoting the tissue and vital organs repair. The therapy success issue is determinate by the cells self-renew and the ability to differentiate into specialized cells. In the last years the mesenchymal stem cells, including dental stem cells, have been extensively studied, at the field of tissue engineering, to achieve the neuronal, bone, cartilage and dental repair. There is substantial evidence suggesting that dental stem cells are competent to become a osteogenic progenitor cells, showing that these cells, in the future, will be a safe cell therapy for some clinical applications. The sources of oral stem cells include the dental pulp, the periodontal ligament and the deciduous teeth. This paper presents, under scientific evidences, an overview of the DMSCs osteogenic potential differentiation of toward bone formation.

**Key words:** Stem cells, Tissue Engineering, Tooth

## Introdução

Os procedimentos reconstrutivos representam um grande desafio para os profissionais de saúde. Nesse contexto, é importante salientar que a reconstrução dos tecidos duros e moles da região bucomaxilofacial é determinante para o restabelecimento da função e estética<sup>1</sup>. Na reconstrução do esqueleto facial, o padrão ouro continua sendo o enxerto ósseo autógeno<sup>2</sup>. Apesar desse tipo de enxerto ósseo minimizar o risco de rejeição e possuir propriedades osteogênicas e osteoindutivas, essa escolha apresenta algumas limitações em relação ao volume de tecido disponível e a morbidade pós-operatória, uma vez que implica em acesso a um segundo sítio operatório. Esses fatores incentivam o desenvolvimento da engenharia óssea tecidual<sup>3</sup>.

A engenharia tecidual é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e da ciência biológica com o intuito de desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter e melhorar as funções teciduais. As técnicas utilizam células progenitoras, como as células tronco mesenquimais, associadas a arcabouços biológicos, ou sintéticos, para promover o crescimento e a diferenciação celular no complexo ciclo do reparo tecidual<sup>4,5</sup>.

Esse artigo revisa os conceitos e aplicação de células tronco mesenquimais, originárias da polpa dentária humana, na engenharia tecidual.

## Células Tronco

Potten e Loeffler (1990) definiram célula tronco como uma célula indiferenciada com capacidade de proliferação, auto-renovação, produção de uma extensa linhagem de células diferenciadas, regeneração tecidual e flexibilização para desenvolver todas essas características<sup>6</sup>. A definição proposta é essencialmente funcional, havendo necessidade de um entendimento mais aprofundado sobre o funcionamento biológico, heterogenicidade, plasticidade e interação com os tecidos<sup>7</sup>. Conceitualmente existem dois tipos de células tronco potencialmente utilizáveis: as embrionárias e as células tronco adultas, que também são conhecidas como células tronco adultas ou ainda como células tronco pós-natal.

As embrionárias são originárias do blastocisto. Contrariamente a essas, as adultas são encontradas em tecidos pós-natais, podendo incluir tecido fetal, cordão umbilical e células sanguíneas<sup>8,9</sup>. Esses tecidos possuem reservas específicas de células tronco que contribuem para a manutenção e regeneração dos mesmos, dentre eles podemos citar células tronco epiteliais da epiderme, células tronco neurais encontradas no sistema nervoso central, células satélites musculares e a medula óssea adulta que apresenta diferentes tipos de células tronco, como por exemplo, as hematopoiéticas e as mesenquimais<sup>10</sup>.

Tabela 1 – Plasticidade das células tronco

Tipo		Fonte	Exemplos de Células Produzidas
Embrionárias		Blastocisto	Todas as células
Adultas	Neural	Cérebro	Neurônios Sanguíneas
	Mesenquimal	Tec. Adiposo e Medula óssea	Osteócitos Mioblastos
	Hematopoiética	Medula óssea	Sanguíneas Endoteliais
	Tecidos bucais	Dente decíduo Ligamento perio	Odontogênica Osteogênica

Fonte: Autores

### Células tronco mesenquimais adultas

Por muitos anos, suspeitou-se da existência de células com potencial de formação óssea localizadas na medula óssea pós-natal. Friedenstein (1970) foi o primeiro a desenvolver métodos de cultura *in vitro* para isolamento e testagem do potencial de diferenciação dessas células<sup>11</sup>. As mesmas foram denominadas de células fibroblásticas da medula óssea. Mais tarde a nomenclatura foi alterada para células mesenquimais progenitoras, passando por estroma celular da medula óssea, células tronco mesenquimais (CTMs) ou células tronco do esqueleto<sup>12,13</sup>. Tecidos pós-natais possuem reservas específicas de células tronco que contribuem para a manutenção e regeneração dos mesmos, dentre eles podemos citar células tronco epiteliais da epiderme, células tronco neurais encontradas no sistema nervoso central e células satélites no tecido muscular. A medula óssea adulta apresenta

diferentes tipos de células tronco, como por exemplo, as hematopoiéticas e as mesenquimais<sup>14</sup>.

Células tronco mesenquimais humanas adultas, são células multipotentes, que podem ser isoladas, devido a sua capacidade de adesão ao substrato, a partir de uma variedade de tecidos incluindo medula óssea, músculo, tecido adiposo e derme<sup>14-16</sup>. Embora convencionalmente a literatura apresente a medula óssea como principal fonte para se isolar as CTMs, existem comprovações científicas que essas células estão dispostas em todo o organismo e sugere-se que as mesmas residam em associação com os vasos sanguíneos<sup>17,10</sup>. Os tecidos da cavidade bucal também são fontes de CTMs<sup>18</sup>.

O potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares e a habilidade de se multiplicar *ex vivo*, enquanto mantém sua propriedade de diferenciação, transformam essas células, em um alvo bastante interessante para a sua utilização na engenharia tecidual e terapia celular<sup>19</sup>.

### **CTMs adultas oriundas dos tecidos bucais**

As CTMs dos tecidos bucais podem ser classificadas conforme sua origem em células tronco da polpa dentária (oriundas dos dentes decíduos esfoliados) e células tronco da papila apical; bem como as não odontogênicas, como células presentes no ligamento periodontal, células tronco mesenquimais gengivais, da mucosa oral, da medula óssea (obtidas dos ossos do esqueleto facial), derivadas do periósteo e das glândulas salivares<sup>20,21</sup>. Essas células contemplam os critérios mínimos estipulados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) em 2006<sup>22</sup>: habilidade de rapidamente se aderir a superfícies plásticas da cultura, potencial de diferenciação em três linhagens (osteogênica, adipogênica, e condrogênica) em apropriadas condições indutivas, expressão dos marcadores comuns das CTMs, como o CD105, CD73 e CD90 em conjunto com a ausência de expressão do CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 e HLA-DR. Adicionalmente, as CTMs dentárias são caracterizadas pela significativa heterogeneidade da sua população<sup>18</sup>. Dentre as importantes vantagens dessas células tronco, quando comparadas com outras fontes, como a medula óssea e o



tecido adiposo, pode-se citar o seu alto poder de proliferação, facilidade de expandir-se *ex vivo* e o isolamento fácil através de um procedimento clínico, como por exemplo a exodontia de terceiro molares retidos ou pré-molares com indicação ortodôntica<sup>23-25</sup>.

As publicações científicas promovem evidências *in vitro* do potencial de diferenciação dessas células em múltiplas linhagens celulares como osteogênica, odontogênica, adipogênica, condrogênica, angiogênica<sup>18,24,25</sup> e neurogênica<sup>26,27</sup>. Estudos *in vivo* também têm suportado o potencial da promoção da reconstituição funcional do complexo dentina-polpa, bem como de outros tecidos como o tecido ósseo e o neural, dentre outros<sup>28-37</sup>.

### **CTMs adultas oriundas da polpa dentária e formação de tecido ósseo**

Estudos *in vitro* demonstraram que as CTMs oriundas da polpa dentária podem ser diferenciadas em células precursoras do osteoblasto, que expressam CD44, RUNX-2 (gene essencial para a diferenciação osteoblástica) e subsequentemente em osteócito/osteoblasto. A formação de tecido ósseo fibroso e posterior presença de tecido ósseo lamelar foram observadas em culturas, após cinquenta dias<sup>38</sup>.

A capacidade das células tronco da polpa dentária atuarem na regeneração óssea tem sido demonstrada em modelos animais<sup>41,42</sup>, incluindo o reparo de defeitos ósseos críticos em calota e rebordos alveolares em coelhos<sup>43</sup>, bem como a otimização da osseointegração de implantes inseridos em mandíbulas caninas<sup>44</sup>. Células tronco da polpa dentária suína, associadas a tricálcio fosfato (arcabouço), foram implantados em defeitos ósseos criados na região da sínfise desse modelo animal. Os resultados desse estudo evidenciaram a capacidade dessas células favorecerem o reparo ósseo<sup>45</sup>.

Recentemente Yasui e colaboradores avaliaram tanto *in vitro* como *in vivo* a cultura celular de origem do tecido pulpar coletado de terceiros molares retidos que foram extraídos. Essa cultura foi analisada *in vitro* através de marcadores celulares e expressão gênica. Os resultados demonstraram que essas células expressaram marcadores celulares de CTMs, revelando um potencial de diferenciação em

múltiplas linhagens celulares. O potencial de proliferação a longo prazo foi avaliado *in vivo* através de defeitos ósseos criados em calotas de ratos. A formação óssea foi otimizada nos defeitos ósseos tratados com as células tronco de origem pulpar humana (CPDhs), sugerindo que essa terapia pode representar uma excelente estratégia para o reparo ósseo<sup>41</sup>.

Com relação a testes clínicos em humanos, a literatura apresenta um estudo em defeitos ósseos criados a partir da extração de terceiros molares inferiores inclusos. Esses alvéolos foram tratados com cultura celular de origem da polpa dentária, impregnada em arcabouço de colágeno. Os defeitos que foram tratados com as células tronco repararam mais rapidamente do que o grupo controle em questão<sup>37</sup>.

Nos últimos anos inúmeros estudos têm testado a habilidade da adesão dessas células em arcabouços para otimizar o reparo ósseo. Petridis e colaboradores em 2015 avaliaram o efeito osteogênico do complexo de células da polpa dentária humana e em um arcabouço de hidrogel. Esse arcabouço, inundado pelo complexo, foi implantado em defeitos na calvaria de ratos. A análise histomorfométrica demonstrou diferença estatisticamente significativa na formação óssea em favor do grupo tratado com as células tronco, sugerindo a otimização do reparo ósseo<sup>46</sup>. O efeito da adição das CPDhs em diversos arcabouços foi avaliada por Kuo e colaboradores em 2015. Após 08 semanas, os autores observaram que os defeitos preenchidos com células tronco apresentaram maior neoformação, contribuindo para o reparo ósseo desses defeitos<sup>47</sup>.

Casos clínicos têm sido publicados com a utilização de CTMs na regeneração de tecido ósseo buco-maxilo-facial em casos de levantamento de seio maxilar, nas reconstruções de fissuras palatinas, no aumento do rebordo alveolar, no tratamento de fraturas mandibulares, em casos de osteoradionecrose e em pequenos defeitos ósseos. Padiál-Molina e colaboradores em 2015 e Jakobsen e colaboradores em 2013 realizaram uma revisão sistemática que incluiu relato de caso clínico, série de casos e estudos clínicos randomizados controlados. A principal fonte de CTMs utilizada foi a medula óssea seguida do tecido adiposo. Poucos estudos clínicos utilizando as células tronco de origem dentária tem sido divulgado até então<sup>48,49</sup>. Dois artigos publicados, com metodologias semelhantes, utilizaram CPDhs associadas à esponja de colágeno, nos alvéolos de terceiros molares inferiores

extraídos, com o objetivo de observar o reparo ósseo. Os resultados, em ambos estudos, demonstraram um excelente reparo ósseo vertical, decorridos três meses após as cirurgias e a completa regeneração do tecido periodontal na região distal dos segundos molares. Ainda após três anos, avaliaram a qualidade óssea e observaram uma área com osso compacto, como resultado final do processo de reparo<sup>37,50</sup>.

Como reportado anteriormente, não só as células tronco oriundas da polpa dentária podem ser utilizadas como fonte para a pesquisa no campo da engenharia tecidual. Similaridades e diferenças, no que diz respeito ao potencial de diferenciação osteo/odontogênica, têm sido publicadas para as células tronco obtidas de dentes decíduos esfoliados (SHED) quando comparadas com as oriundas da polpa dentária. Essas células foram capazes de formar um meio osteoindutor, em ratos imunocomprometidos, induzindo o recrutamento de células osteogênicas para o reparo de defeitos ósseo críticos criados na calota craniana desse modelo animal<sup>51</sup>. Recentemente esse potencial foi demonstrado tanto para as CPDHs quanto para as SHED, quando essas culturas foram combinadas com plasma rico em plaquetas (PRP). Essa associação foi capaz de reparar tecido ósseo vascularizado ao redor de implantes em dois modelos animais diferentes<sup>52</sup>. Outro estudo recente demonstrou que SHED criopreservadas, no período de cinco anos, continuaram mantendo a capacidade proliferativa e indutiva osteogênica, sem apresentar reação imunológica em defeitos ósseos de 9 mm em mandíbulas de beagles<sup>53</sup> e aceleraram o reparo em distrações osteogênicas em coelhos<sup>54</sup>.

Além da característica de diferenciar-se em células da linhagem osteogênica, cabe ressaltar, que uma habilidade marcante das células tronco mesenquimais dentárias é o potencial de diferenciação odontogênica. Essa última, relacionasse com a aplicação dessas culturas celulares na engenharia tecidual dentária. Publicações científicas têm demonstrado que as CTMs dentárias, incluindo as de origem da polpa dentária e dos dentes decíduos humanos esfoliados, possuem a capacidade de diferenciarem-se, *in vitro*, na linhagem odontoblástica e promover a regeneração do complexo dentina/polpa<sup>31,39,40</sup>.

Apesar dos resultados promissores no campo da engenharia tecidual publicados com a utilização das CTMs dental para a regeneração de vários tecidos e não só o tecido ósseo, poucos estudos clínicos controlados para provar o conceito

(*proof of concept*) em fase I, II, III e IV foram ou estão sendo conduzidos. Em uma busca eletrônica na base de dados do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América (<https://clinicaltrials.gov/>), onde se registra os ensaios clínicos realizados ao redor do mundo, utilizando as palavras chaves *mesenchymal stem cell* e *dental pulp stem cell* obteve-se respectivamente 686 estudos clínicos (12 desses estudos foram excluídos)<sup>55</sup> e 13 estudos em atividade. Entretanto dentro desses 13 últimos apenas um deles está relacionado com o reparo ósseo<sup>56</sup>.

### **Regulamentação e aplicação clínica**

A utilização das CTMs de origem dentária para aplicação clínica em larga escala não é regulamentada na grande maioria dos países, incluindo o Brasil. Essa situação é determinada, dentre outras dificuldades, na necessidade de contemplar a expansão e aplicação de CTMs livres de substâncias xenógenas (*xeno-free mesenchymal stem cells*), obedecendo as condições de boas práticas de fabricação (BPF) estabelecidas pelo *Good manufacturing practices* (GMP)<sup>20</sup>. Essa regulamentação determina que qualquer meio de produção, incluindo medicamentos, hemocentros e novas terapias celulares, devam estar em conformidade com os órgãos reguladores internacionais e nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

No Brasil a única terapia celular reconhecida formalmente pelo Conselho Federal de Medicina é o transplante de células-tronco obtidas da medula óssea, do sangue periférico e do sangue de cordão umbilical e placentário. Esta terapia é denominada de transplante de células-tronco hematopoéticas, ou popularmente conhecida como transplante de medula, empregada para o tratamento de doenças hematológicas ou terapias de reconstituição da medula óssea após o tratamento de doenças oncológicas. Até o momento, não existem outros tipos de terapias celulares com uso reconhecido no Brasil, pois ainda são considerados experimentais. Assim, quaisquer procedimentos realizados no país devem ser restritos a protocolos de pesquisas clínicas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) coordenador ou pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep) e as pesquisas clínicas

deverão seguir rigorosamente a Resolução CNS/MS 466 de 12 de dezembro de 2012<sup>57</sup>. O Conselho Federal de Odontologia em sua Resolução nº 157/2015, de 08 de junho de 2015, proíbe o uso de terapias avançadas, o que inclui a utilização de células tronco na prática clínica odontológica<sup>58</sup>.

### **Considerações finais**

A utilização das células tronco de origem dentária, apesar das limitações e das inexpressivas pesquisas clínicas, no campo da engenharia tecidual, no que diz respeito aos testes *in vitro* e *in vivo*, levaram ao entendimento das suas propriedades biológicas e dos seus benefícios nas condições laboratorialmente estabelecidas. A literatura demonstra que o resultado da associação dessas células com uma vasta quantidade de arcabouços é sinérgica e capaz de não só otimizar o reparo ósseo, como atuar positivamente em outras áreas como a neurologia, a ortopedia e a regeneração dentária. Entretanto, um ponto crítico e extremamente desafiador é como transformar um protocolo de engenharia tecidual, que atualmente é financeiramente dispendioso e que consome um tempo longo de execução laboratorial, em uma prática clínica que possa estar a disposição do paciente, sendo esse o beneficiário final dessa terapia.

Nesse contexto, para que a utilização das CTMs dentárias possam ser uma opção real de tratamento é mandatório que os ensaios clínicos randomizados sejam executados e os seus resultados possam suportar a indicação dessa nova e promissora terapia celular. Esse processo permitirá que se tenha um entendimento completo dos riscos e benefícios do uso dessa medicina regenerativa como um importante ponto no progresso e no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de diversas patologias.

## Referências

1. Fiorellini JP, Nevins ML. Localized ridge augmentation/preservation. A systematic review. **Ann Periodontol**, 2003; 8:321-327.
2. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. **Expert Rev Med Devices**, 2006; 3:49-57.
3. Murphy KC, Hughbanks ML, Binder BY, Vissers CB, Leach JK. Engineered Fibrin Gels for Parallel Stimulation of Mesenchymal Stem Cell Proangiogenic and Osteogenic Potential. **Ann Biomed Eng**, 2015; 43(8): 2010-21.
4. Stylios G, Wan T, Giannoudis P. Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. **Injury**, 2007; 38(1): S63–74.
5. Schindeler A, Kolind M, Little DG. Cellular transitions and tissue engineering. **Cell Reprogram**, 2013; 15(2):101-6.
6. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt. **Development**, 1990; 110(4):1001-20.
7. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. **Cell**, 2008; 132(4): 598–611.
8. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. **Mol Biol Cell**, 2010; 21(11):1783-7.
9. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 2001; 7(2):211-28.
10. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J Cell Sci**, 2006; 119(11):2204–13.
11. Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in the bone marrow. **Bone Min Res**, 1990; 7: 243-72.
12. Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem Suppl**, 2002; 38:7–12.
13. Kassen M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2004; 95(5):209-14.

14. García-Castro J, Trigueros C, Madrenas J, Pérez-Simóm JA, Rodrigues R, Menendez P. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. **J Cell Mol Med**, 2008; 12(6B):2552-65.
15. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol**, 2007; 213(2):341–347.
16. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Eng**, 2005; 11(7-8):198–211.
17. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146 + perivascular cells and fibroblasts. **Exp Hematol**, 2008; 36(5):642–54.
18. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. **J Dent Res**, 2009; 88(9):792–806.
19. Liu ZJ, Zhuge Y, Velazquez OC. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **J Cell Biochem**, 2009; 106(6):984–91.
20. Bakopoulou A, About, I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. **Stem Cells Int**, 2016:01-20.
21. Horwitz M, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: e International Society for Cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, 2005; 7(5):393-95.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular erapy position statement. **Cytotherapy** 2006; 8(4):315–17.
23. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, JI K, When LY, et al., Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. **Arch Oral Biol**, 2012; 57(9):1231–40.
24. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry—part I: stem cell sources. **J Prosthodont Res**, 2012; 56(3):151–65.
25. Abdullah MF, Abdullah SF, Omar NS, Mahmood Z, Fasliah Mohd Noor SN, Kannan TP et al. Proliferation rate of stem cells derived from human dental pulp and identification of differentially expressed genes. **Cell Biol Int**, 2014; 38(5):582–90.
26. Isobe Y, Koyama N, Nakao K, Osawa K, Ikeno M et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovial fluid, adult dental pulp, and exfoliated deciduous tooth pulp. **Int J of Oral and Maxillofac Surg**, 2016; 45(1):124–31.

27. Feng X, Xing J, Feng G, Sang A, Shen B et al. Age-dependent impaired neurogenic differentiation capacity of dental stem cell is associated with wnt/B-catenin signaling. **Cell Mol Neurobiol**, 2013; 33(8):1023-31.
28. Sanen K, Martens W, Georgiou M, Ameloot M, Lambrichts I, Phillips J. Engineered neural tissue with Schwann cell differentiated human dental pulp stem cells: potential for peripheral nerve repair? **J Tissue Eng Regen Med**, 2017 [Epub ahead of print]
29. Zhang J, Lian M, Cao P, Bao G, Xu G, Sun Y et al. Effects of Nerve Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Promote Human Dental Pulp Stem Cells to Neural Differentiation. **Neurochem Res**, 2016 Dec 22. [Epub ahead of print]
30. Li Y, He L, Pan S, Zhang L, Zhang W, Yi H et al. Three-dimensional simulated microgravity culture improves the proliferation and odontogenic differentiation of dental pulp stem cell in PLGA scaffolds implanted in mice. **Mol Med Rep**, 2017; 15(2):873-78.
31. Kim S, Shin SJ, Song Y, Kim E. In vivo experiments with dental pulp stem cells for pulp-dentin complex regeneration. **Mediators Inflamm**, 2015; Article ID 409347 2015:6 pages.
32. Fawzy El-Sayed KM, Jakusz K, Jochens A, Dorfer C, Schwendicke F. Stem cell transplantation for pulpal regeneration: a systematic review. **Tissue Eng Part B Rev**, 2015; 21(5):451-60.
33. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2013;54(12):7544–7556.
34. Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. **Pharmacol Ther**, 2014; 143(2):181-96.
35. Wang J, Wang X, Sun Z, Wang X, Yang H, Shi S et al. Stem cells from human-exfoliated deciduous teeth can differentiate into dopaminergic neuron-like cells. **Stem Cells Dev**, 2010; 19(9): 1375–83.
36. Heng BC, Lim LW, Wu W, Zhang C. An overview of protocols for the neural induction of dental and oral stem cells *in vitro*. **Tissue Eng Part B Rev**, 2016; 22(3): 220–50.
37. d’Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. **Eur Cell Mater**, 2009; 18:75–83.



38. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). **J Bone Miner Res**, 2005; 20(8):1394-402.
39. Morad G, Kheiri L, Khojasteh A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature. **Arch Oral Biol**, 2013. 58(12):1818–27.
40. Ramamoorthi M, Bakkar M, Jordan J, Tran SD. Osteogenic potential of dental mesenchymal stem cells in preclinical studies: a systematic review using modified ARRIVE and CONSORT guidelines. **Stem Cells International**, 2015; 2015 article 378368, 28 pages.
41. Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K et al. Purified human dental pulp stem cells promote osteogenic regeneration. **J Dent Res**, 2015; 95(2):206-42.
42. Maraldi T, Riccio M, Pisciotta A, Zavatti M, Carnevale G et al. Human amniotic fluid-derived and dental pulp-derived stem cells seeded into collagen scaffold repair critical-size bone defects promoting vascularization. **Stem Cell Res Ther**, 2013; 4(3):53.
43. Liu HC, E LL, Wang DS, Su F, Wu X et al. Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano- hydroxyapatite/collagen/ poly(l-lactide). **Tissue Eng Part A**, 2011; 17(19-20):2417-33.
44. Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of e effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants**, 2011; 26(5):947–54.
45. Zheng Y, Liu Y, Zhang CM, Zhang HY, Li WH et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, 2009; 88(3):249–54.
46. Petridis X, Diamanti E, Trigas GCh, Kalyvas D, Kitraki E et al. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. **J Craniomaxillofac Surg**, 2015; 43(4):483–90.
47. Kuo TF, Lee SY, Wu HD, Poma M, Wu YW et al. An in vivo swine study for xenografts of calcium sulfate-based bone grafts with human dental pulp stem cells (hDPSCs). **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 2015; 50:19–23.
48. Padial-Molina M, O'Valle F, Lanis A et al. Clinical application of mesenchymal stem cells and novel supportive therapies for oral bone regeneration. **BioMed Res Int**, 2015; 2015 article ID 341327:01-16.
49. Jakobsen C, Sorensen JA, Kassem M, Thygesen TH. Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: a systematic review of the literature. **Journal of Oral Rehabilitation**, 2013; 40(9):693-706.

50. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V. Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. **Stem Cells Translational Medicine**, 2013; 2(4):316–24.
51. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K et al. SHED repair critical- size calvarial defects in mice. **Oral Dis**, 2008; 14(5):428–34.
52. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Sugito T, Yoshimi R, Nagasaka T et al. A feasibility of useful cell-based therapy by bone regeneration with deciduous tooth stem cells, dental pulp stem cells, or bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for clinical study using tissue engineering technology. **Tissue Eng Part A**, 16(6):1891– 900.
53. Behnia A, Haghghat A, Talebi A, Nourbakhsh N, Heidari F. Transplantation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth for bone regeneration in the dog mandibular defect. **World J Stem Cells**, 2014; 26(4):505–10.
54. Alkaisi A, Ismail AR, Mutum SS, Ahmad ZA, Masudi S, Abd Razak NH. Transplantation of human dental pulp stem cells: enhance bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis. **J Oral Maxillofac Surg**, 2013; 71(10):1758.e1-13.
55. Clinical Trials – US National Institute of Health, disponível em URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=mesenchymal+stem+cell&pg=12>. Acessado em 19 jan. 2017.
56. Clinical Trials disponível - US National Institute of Health, disponível em URL: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=dental+pulp+stem+cell&Search=Search>. Acessado em 19 jan. 2017.
57. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Células-Tronco, Terapias Celulares e Banco de Células - O que é preciso saber. 2016. Disponível em URL: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/2818851/Cartilha+de+CélulasTronco,+Terapias+Celulares+e+Bancos+de+Células/ce08c0aa-7946-40cb-95e8-e2e383bedf06>.
58. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO-157/2015 de 08 de junho de 2015, Terapias avançadas, em especial o uso de células-tronco. Disponível em URL: <http://cfo.org.br/legislacao/ato-normativo/?id=1926>.

## 4.2 ARTIGO 02

### **Avaliação do reparo ósseo em fêmur de rato com o uso de $\alpha$ -fosfato tricálcico associado a células tronco e células endoteliais**

### **Evaluation of bone rat defects repair using alpha-tricalcium phosphate combined with adipose-derived stem cells and endothelial cells.**

José Luiz Bernardon Pretto<sup>1</sup>

Adriana Corsetti<sup>2</sup>

Nance Beyer Nardi<sup>3</sup>

Luís Alberto dos Santos<sup>4</sup>

Deise Ponzoni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Comunitária da Região de Chapecó Faculdade de Odontologia– Chapecó, SC, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontotologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontotologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Luterana do Brasil, Laboratório de Células Tronco e Engenharia de Tecidos, Canoas, RS, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia e Materiais, Porto Alegre, RS, Brasil.

José Luiz Bernardon Pretto – Unochapecó – Universidade Comunitária da Região de Chapecó – Curso de Odontologia - Rua Senador Atílio Fontana, 591-E, Bairro Efapi, 89809-000, Chapecó, Santa Catarina. E-mail: jl.pretto@hotmail.com

## RESUMO

Os defeitos ósseos apresentam comumente o trauma facial, a reabsorção alveolar fisiológica e condições patológicas como etiologias. A reconstrução desses defeitos sempre representou um desafio mesmo que as técnicas cirúrgicas e os substitutos ósseos estejam em constante evolução. Com o objetivo de otimizar o reparo ósseo e melhorar os resultados clínicos, a engenharia óssea tecidual vem se tornando uma importante alternativa. Neste estudo foi avaliado o reparo ósseo através de defeitos criados em fêmures de 96 ratos, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR (*spontaneously hypertensive rats*). Esses animais foram divididos em 04 grupos diferentes dependendo do tratamento que cada defeito recebeu (Grupo I:  $\alpha$  – TCP + ADSCs (Células tronco oriundas do tecido adiposo); Grupo II:  $\alpha$  – TCP + ADSCs/Endo (células endoteliais); Grupo III:  $\alpha$  – TCP; Grupo IV: sem tratamento) e os períodos de avaliação respeitaram 07 dias, 14 e 21 dias. O reparo ósseo foi avaliado através da histomorfometria bem como foi quantificada a expressão de VEGF. Os resultados demonstram que os grupos que receberam o tratamento celular obtiveram um aumento na área reparada. E no grupo que recebeu o aditivo das células endoteliais a expressão da proteína VEGF foi maior. Baseado nesses achados é possível sugerir que a engenharia tecidual, no modelo estudo, foi capaz de otimizar o reparo ósseo e surge como uma alternativa para o tratamento de defeitos ósseos.

**Palavras Chaves:** engenharia tecidual, células tronco, regeneração óssea.

## ABSTRACT

The bone defects are most commonly caused by facial trauma, alveolar ridge resorption, pathological conditions and the bone reconstruction remains a challenge to surgeons, even though several methods have developed the surgical techniques and the biomaterial structure to improve the outcomes. The bone tissue engineering appears an alternative and has been a remarkable research issue focusing on bone regeneration improvement. This research assessment the bone repair in defects drilled in the femurs of ninety-six adult SHR rat. The animals were divided in four groups depending on the defect treatment. On the Group I the scaffold ( $\alpha$  – TCP) was seeded with MSC from adipose tissue (ADSCs), the Group II the defect was filled with scaffold seeded with ADSCs and endothelial cells, the group III was used plain scaffold and the group IV the defect was untreated. The bone repair was evaluated in 07, 14 and 21 days by histomorphometry and immunohistochemistry. Based on these findings, is possible to concluded that the tissue engineering was able to improve the bone repair and appears as a new alternative to bone defects reconstruction.

**Key Words:** Tissue engineering, stem cells, bone repair

## 1 Introdução

Os defeitos ósseos são reconstruídos, principalmente, com enxerto ósseo autógeno sendo esse o padrão ouro para as reconstruções. Entretanto, o volume ósseo a ser obtido a partir de uma área doadora permanece limitado e algumas condições sistêmicas contraindicam essa prática<sup>2,10</sup>.

Com o intuito de evitar as desvantagens da obtenção do enxerto autógeno como a sintomatologia dolorosa e a morbidade pós-operatória do sítio doador, a utilização de aloenxertos e dos biomateriais têm se tornado uma alternativa<sup>3</sup>. Os cimentos de fosfato de cálcio (CPCs) representam uma opção clínica para o reparo ósseo pois podem ser facilmente manipulados e moldados, proporcionando uma íntima adaptação ao defeito. A similaridade química com a porção mineral do tecido ósseo, a osteocondutividade, a bioatividade e a biocompatibilidade<sup>22</sup> são

características favoráveis desse material. Os pesquisadores atualmente estão concentrando esforços no sentido de reforçar as propriedades mecânicas dos CPCs bem como anular a limitação na osteoindução através da engenharia tecidual. A engenharia tecidual associa células tronco mesenquimais a um arcabouço proporcionando, dessa forma, características biológicas mais favoráveis ao processo do reparo ósseo<sup>2</sup>.

A medula óssea é considerada a principal fonte das células tronco mesenquimais (CTMs). Entretanto, as publicações têm indicado outros tecidos doadores como por exemplo a utilização das células-tronco mesenquimais adiposas (ADSCs). Esse meio de obtenção quando comparado com as células de origem da medula óssea, apresenta vantagens como a menor invasão tecidual para sua coleta, obtenção de um volume maior e alta taxa de proliferação<sup>35,36</sup>.

A engenharia tecidual é um dos mais promissores tratamentos para a regeneração tecidual pois a célula/matriz que se desenvolveu *in vitro* é subsequentemente introduzida no tecido danificado ou defeituoso, para regenerá-lo, caso seja exercida a influência de fatores de crescimento específico<sup>5</sup>. Modelos experimentais *in vivo* têm demonstrado a capacidade das ADSCs, associadas a arcabouços, atuarem na otimização do reparo ósseo<sup>1,6,12,17,33,36</sup>.

Além da preocupação da escolha de um material que apresente características biologicamente favoráveis para a reconstrução de defeitos ósseos, a neovascularização também é um fator primordial para o reparo. Pois, o suprimento vascular inicial é determinante para o crescimento de células osteogênicas reparadoras bem como para o suporte nutricional do enxerto<sup>7</sup>. Uma das formas de alcançar a tão almejada otimização da vascularização inicial é através da aplicação de células endoteliais (CEs). Essas células representam uma pequena população que tem a capacidade de se proliferar, migrar e diferenciarem-se em células da linhagem vascular e são capazes de apresentar alta atividade neovascular e angiogênica<sup>14</sup>. A associação de CTMs e células endoteliais constitui uma potente possibilidade para a otimização do reparo ósseo. Pois essas células apresentam um extenso potencial de proliferação e são capazes de diferenciarem-se em células regenerativas, favorecendo a vascularização inicial e acelerando o reparo ósseo em defeitos ósseos *in vivo*<sup>13,25,26,28,29</sup>.

No contexto de testar o potencial da engenharia tecidual, este estudo avaliou o processo de reparo ósseo em defeitos criados em fêmures de ratos, baseado na aplicação de células tronco de origem adiposa e endotelial associados a um *scaffold* de alfa-fosfato tricálcico. Foram realizadas avaliações através da histomorfometria e da quantificação da expressão da proteína VEGF por imunohistoquímica.

## 2 Materiais e métodos

Essa pesquisa experimental foi registrada sob n° 160059 e aprovada na Comissão de Ética no Uso de Animais do Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEUA/HCPA), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei n° 11.794, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

### 2.1 Descrição da amostra

A amostra dessa pesquisa foi composta por 96 ratos albinos, fêmeas, da espécie *Rattus norvegicus albinus*, linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), isogênicos, com dois meses de idade e peso médio de 250 g. Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (de 24 animais) de acordo com o tipo de tratamento (Tabela 1). Os tempos experimentais foram de 07, 14 e 21 dias pós-operatórios. Dois animais isogênicos, da mesma espécie, do sexo masculino, com mesma idade e peso, foram utilizados para isolamento e cultivo das células tronco.

O cálculo de tamanho da amostra foi realizado no programa G\*Power 3.1.9.2, para detectar diferença significativa, conforme médias e desvios padrão do percentual de formação óssea publicado por Niemeyer (2010). O resultado mostrou a necessidade de 8 animais por grupo e por tempo, considerando 80% de poder e 5% de significância.

Tabela 1 – Delineamento experimental

Grupos	n	Scaffold	ADSC	ADSC+ENDO	07 dd	14 dd	21 dd
Grupo I	24	$\alpha$ – TCP	+	-	08	08	08
Grupo II	24	$\alpha$ – TCP	-	+	08	08	08
Grupo III	24	$\alpha$ – TCP	-	-	08	08	08
Grupo IV	24	-	-	-	08	08	08

**Fonte:** autores – ADSC (Células tronco derivadas do tecido adiposo) – ADSC + ENDO (Células tronco derivadas do tecido adiposo associadas a Células endoteliais).



## 2.2 Isolamento e cultivo celular

Foram utilizadas células do tecido adiposo e células endoteliais de ratos isogênicos (02 animais foram exclusivamente utilizados para isso e a coleta foi realizada após a eutanásia), da mesma linhagem dos animais receptores das células. O tecido adiposo, coletado da região abdominal, foi lavado com solução salina estéril para remover os restos celulares e hemácias, fracionado em PBS (phosphate buffered saline). A fração estromal foi isolada por digestão com colagenase tipo I (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) na concentração de 1mg/g de tecido adiposo por 30-40 minutos, a 37°C e com agitações periódicas. Após realizou-se a neutralização da colagenase com meio Dulbecco's modified Eagle's (DMEM) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal (FCS, Cultiab, SO, Brasil). Seguindo o processo o material foi centrifugado por 10 minutos a 400 x g. As células compondo a fração estromal do tecido adiposo foram lavadas com HBSS (Hank's balanced salt solution) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) e centrifugadas por 05 minutos a 350x g. Para o cultivo, as células foram ressuspensas em DMEM com 10 nM de HEPES livre de ácido (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas em cultura, conforme metodologia estabelecida anteriormente<sup>21</sup>. Três dias após as células que não se aderiram foram removidas, e a cultura foi mantida e expandida a cada 03 ou 04 dias após a tripsinização (0,25% de tripsina e 0,01% de EDTA em HBSS). Ao menos 03 culturas foram analisadas e as células entre 4 e 7 passagens foram utilizadas para o experimento. A morfologia das culturas foi analisada, por exame periódico em microscópio invertido com contraste de fase (Axiovert 25 – Carls Zeiss - Alemanha). As ADSC foram analisadas pela morfologia, pelo imunofenótipo, pela proliferação e pelo potencial de diferenciação. Todos os experimentos foram reproduzidos três vezes. Fotomicrografias foram realizadas utilizando uma câmera digital (AxioCam MRc – Carls Zeiss - Alemanha), utilizando o software AxioVision 3.1 (Carls Zeiss). A citometria de fluxo foi utilizada para determinar o imunofenótipo celular. As células sofreram tripsinização, lavadas e incubadas por 30 minutos a 4° C com isotiocianato de fluoresceína (FITC) associado com anticorpos específicos para rato CD29, CD44 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), CD11b e CD45 (Caltag, Burlingame, CA, USA). O citômetro FACSCalibur equipado com Laser de

Argônio com 488 nm (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) foi utilizado para a citometria de fluxo associado ao software Cell Quest<sup>23,34</sup>.

As células endoteliais foram obtidas do tecido muscular cardíaco. Para essa coleta os dois animais previamente sofreram eutanásia e uma toracotomia, acessando e removendo o tecido muscular cardíaco fragmentado em pequenas partes e incluídas em 300 U/ml de colagenase e armazenadas em 37°C por 50 minutos. Após essa fase transferiu-se a fração celular, plaqueando em baixa e alta densidade e aguardando a aderência celular por duas horas. O sobrenadante foi retirado e colocado em garrafa de 25 cm<sup>2</sup> ou placa de poços, ambos com gelatina. As células endoteliais foram marcadas em microscópio e retiradas. Essas células foram depositadas em cultura com meio específico para a indução do crescimento de células endoteliais (fator de crescimento endotelial vascular) por 10 dias.

### **2.3 Biomaterial**

O biomaterial utilizado neste estudo foi o cimento de alfa-fosfato tricálcico<sup>29</sup>. Este produto foi sintetizado através da composição de cimento de fosfato de cálcio baseada no alfa-fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), com a adição de um agente espumante (lauril sulfonato de sódio, 0,5% em massa) ao líquido de presa (solução aquosa de 2,5% de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , acelerador de presa), que permite a introdução de porosidade ao cimento. O cimento de fosfato de cálcio possui presa em virtude da transformação, quando da adição de líquido, do alfa-fosfato tricálcico em hidroxiapatita deficiente em cálcio (CDHA), similar à hidroxiapatita biológica. Esse substituto ósseo foi obtido no Departamento de Materiais da Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e acondicionado em embalagens de polietileno e esterilizadas em peróxido de hidrogênio segundo protocolo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **2.4 Procedimento cirúrgico**

Para a realização dos defeitos ósseos cirúrgicos, os animais receberam na indução anestésica os fármacos, via injeção intraperitoneal, Cloridrato de Xilazina a

2% (Xilazin® - Syntec, São Paulo, Brasil) 5mg/kg, e Cloridrato de Cetamina a 10%, (Ketamina Agener 10%®, São Paulo, Brasil) para indução anestésica. A manutenção da anestesia geral realizada através da inalação com isoflurano na concentração de 1-2% (Vetflurano®, Virbac, Brasil).

Após a anestesia foi realizada a tricotomia na região do membro posterior direito. Seguiu-se a antissepsia com Iodopovidona a 9%. Para acesso ao fêmur direito foi realizada uma incisão linear, sobre a pele de aproximadamente 2 cm. Realizada a divulsão do tecido muscular e descolamento periostal, o fêmur foi exposto. Afastadores foram posicionados permitindo a realização de um defeito ósseo na diáfise femural. Para ostectomia foi utilizada uma broca tipo trefina de 3,1 mm de diâmetro sob irrigação constante com solução salina estéril conforme protocolo já descrito anteriormente<sup>6</sup>.

No grupo I foi implantado o biomaterial associado com ADSC (0,10 g de biomaterial embebido com 15µl de meio de cultura contendo  $3 \times 10^5$  células). No grupo II, a cavidade foi preenchida com o biomaterial pré-incubado com ADSC+ENDO (0,10 g de biomaterial embebido com 20µl de meio de cultura contendo  $5 \times 10^5$  células). No grupo III o defeito foi tratado apenas com alfa-fosfato tricálcico (0,10 g de biomaterial) e no grupo IV o defeito não foi tratado. Nos grupos onde a terapia celular foi empregada, o biomaterial foi previamente incubado a 37°C por 02 horas.

Concluído o procedimento cirúrgico foi realizada a sutura dos tecidos dos planos profundos e da pele com poliglactina 910 4x0 (Vicryl®, Ethicon, Brasil).

A analgesia, no pós-operatório imediato foi realizada com morfina 2,5mg/kg subcutânea e após 04 horas uma nova dose dessa medicação foi administrada. O protocolo de analgesia foi mantido por mais três dias, utilizando o Cloridrato de Tramadol 10mg/kg, intraperitoneal, a cada 12 horas.

## **2.5 Coleta das peças**

A morte dos animais foi realizada pelo método químico de sobredose anestésica com isoflurano (6-9%) vaporizado em oxigênio 100% em fluxo de 0,5 l/min., por via inalatória, até 10 minutos após a verificação de parada

cardiorrespiratória. Para a coleta das amostras, os animais correspondentes a cada grupo foram mortos seguindo o cronograma de 07, 14 e 21 dias pós-operatórios. Após a morte dos animais, foi realizada a necropsia com a remoção dos fêmures operados. As peças que foram imediatamente armazenadas em recipientes plásticos fixadas e conservadas em formalina neutra tamponada a 10%.

## **2.6 Preparo histológico, imunohistoquímico e análise histomorfométrica**

Os espécimes foram descalcificados em solução de ácido nítrico a 5% (10ml) durante 7 dias e desidratados, em concentrações sucessivas de álcool (de 80% até 100%). Na sequência, o material foi seccionado longitudinalmente e incluídos em parafina. Procedeu-se, então, os cortes em micrótomo (Micrótomo Leica 2155, Nussloch, Alemanha), no sentido longitudinal do longo eixo do fêmur, com espessura de 4  $\mu\text{m}$ . Os preparos histológicos foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Com relação ao processo imunohistoquímico os cortes foram posicionados em lâminas previamente silanizadas. Para proceder a técnica, as lâminas foram aquecidas em estufa a 80°C por 30 minutos, desparafinizadas em xilol, reidratadas em álcool etílico e posteriormente em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria por 20 minutos a 95°C no tampão citrato pH 6,0. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 5% em metanol por 20 minutos. O bloqueio de proteínas foi realizado com leite desnatado em pó diluído a 5% em PBS por 20 minutos. Os cortes foram posteriormente incubados, overnight em geladeira de 2 a 8°C, com o anticorpo primário VEGF, mouse, Abcam (ab1316) na diluição 1:500. Após a incubação foi aplicado o anticorpo secundário m-IgGk BP-HRP (Cruz Marker): sc-516102-CM HRP CONJUGATED, na diluição 1:200 e incubado a 1h e 30 minutos e a visualização da reação foi obtida com Liquid Dab (Dako, K3468), conforme recomendações do fabricante. Após a visualização, as lâminas foram contra-coradas em hematoxilina de Harris por 10 segundos, e diferenciadas em água amoniacal 2% por 30 segundos os cortes desidratados em álcool absoluto e colocados em xilol para a montagem das lâminas em resina do tipo Entellan.

As imagens foram capturadas com uma câmera digital (Q-Color 5, Olympus, New York, USA) acoplada a um microscópio óptico (Lambda LQT2, ATTO

Instruments Co., Hong Kong, China) em aumento de 100x, utilizando o software Qcapture (Univesity of Texas, San Antonio, USA). Essas imagens foram avaliadas e a quantificação de tecido ósseo neoformado bem como a quantificação da expressão de VEGF foram realizadas por meio do software Image J (U.S. National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA).

A área de tecido ósseo neoformado foi medida através da demarcação da área total do defeito. A área medida foi delimitada lateralmente pelos limites verticais da ostectomia, inferiormente pela cortical do fêmur e superiormente 2 mm além da cortical superior. A área de neoformação foi selecionada excluindo os espaços vasculares e o biomaterial. Os valores foram obtidos em mm<sup>2</sup>. Foi então, estabelecida uma comparação da área total *versus* a área reparada e essa relação foi expressa, finalmente, em percentual. A quantificação da expressão de VEGF foi realizada através de uma imagem capturada do centro do defeito. Os valores obtidos estão demonstrados em pixels. A histomorfometria foi realizada em ordem aleatória e os observadores eram cegados em relação aos espécimes.

## **2.7 Análise estatística**

Os dados obtidos da avaliação do reparo ósseo através da histomorfometria foram avaliados pelo teste Kolmogorov-Smirnov e a distribuição mostrou-se normal, então as diferenças extra grupos foram analisadas pela análise de variância (ANOVA). Já para a avaliação da neovascularização foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Ambos utilizaram o software SPSS versão 24.0. O valor do p <0.05 foi estabelecido para considerar estatisticamente significante os resultados.

### 3 Resultados

As análises de histomorfometria aferiram a área total de neoformação óssea, dos defeitos criados, sendo expressas em percentual, nos períodos de tempo de 07, 14 e 21 dias. Conforme os dados apresentados na tabela 2 onde uma comparação entre os grupos e períodos foi realizada pode-se observar que os resultados apresentaram uma diferença estatisticamente significativa quando um  $p < 0.05$  foi considerado. Dessa forma, o Grupo I ( $\alpha$  – TCP + ADSC) apresentou uma neoformação óssea percentualmente mais ampla que o Grupo III ( $\alpha$  – TCP) no período de 07 e 14 dias. No período de 21 dias esse grupo que recebeu o tratamento celular, foi superior aos Grupos III e o Grupo IV (Sem tratamento). Já o Grupo II ( $\alpha$  – TCP + ADSC + ENDO) no período de 14 dias produziu um percentual maior de reparo do que o Grupo III e no período de 21 dias foi superior aos Grupos III e IV. Na tabela 3 os resultados das médias estão descritos e esses dados demonstram que a média do reparo ósseo é sempre maior nos grupos que foram tratados com a terapia celular e em especial no grupo que recebeu a adição das células endoteliais, embora estatisticamente não houve diferença.

A histomorfometria para a avaliação da neovascularização, através da quantificação da expressão da proteína VEGF pode revelar que a maior quantidade de pixels apresentada na imagem pertenceu ao grupo II que recebeu o tratamento com a associação das ADSCs e as CEs. Isso representa uma maior detecção de VEGF e conseqüentemente a neovascularização foi mais acentuada. Estatisticamente esse grupo ( $\alpha$  – TCP+ADSCs+CEs) destacou-se dos grupo III ( $\alpha$  – TCP), IV (sem tratamento) em todos os períodos e do grupo I ( $\alpha$  – TCP+ADSCs) apenas no período de 14 dias é que houve uma diferença estatisticamente significativa. Entretanto as médias apresentadas sempre forma maiores no grupo que recebeu co-cultura de ADSCs e CEs. As figuras 5, 6, e 7 demonstram a marcação provocada na detecção da proteína VEGF e pode-se observar que no grupo da associação das ADSCs e as CEs a expressão dessa proteína é superior aos demais grupos.

Uma visão geral histológica pode dizer que o período inicial de observação (07 dias) apresenta um infiltrado inflamatório intenso, fibroplasia e a presença de espaços vazios relativos aos grânulos do biomaterial com pouco ou nenhum tecido

ósseo neoformado. Nos grupos I e II que receberam o tratamento celular pode-se observar um reparo mais organizado mas ainda com pouco tecido ósseo neoformado. Na medida que o reparo vai evoluindo para 14 e 21 dias uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado, vai se apresentando e a quantidade de biomaterial vai reduzindo. Sendo que sempre os grupos que receberam as ADSCs e a co-cultura (ADSCs e CEs) apresentam um reparo mais organizado e avançado conforme as figuras 2, 3 e 4 podem apresentar.

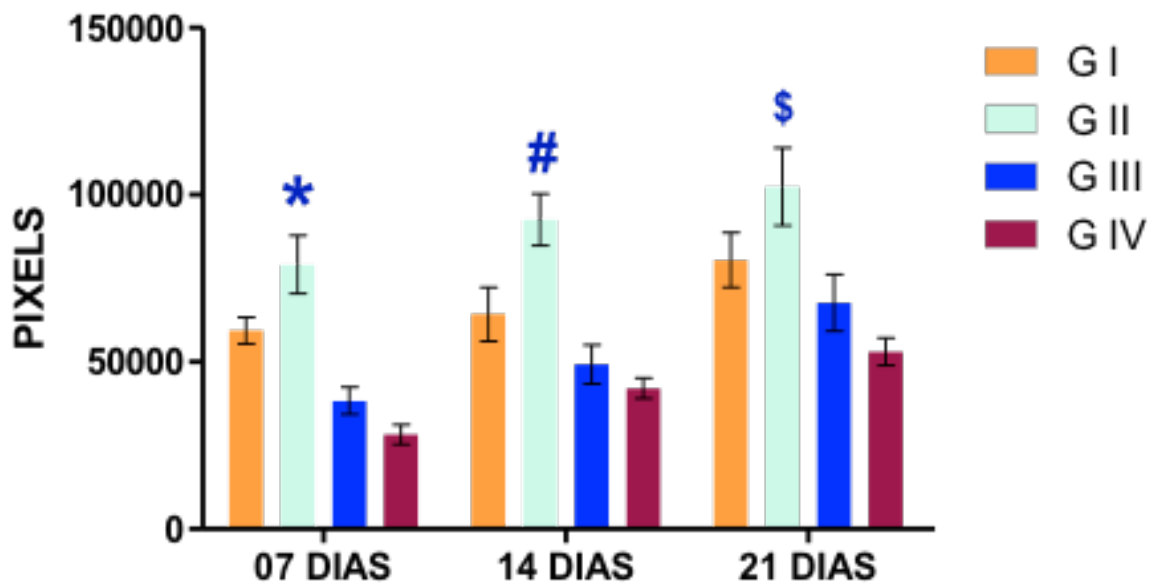
Tabela 2 – Tamanho da área de reparo em percentual, comparação entre os grupos nos períodos observacionais de 07, 14 e 21 dias. Análise de variância (ANOVA)  $p < 0,05$ .

Tempo	Grupos	Comparações	Diferença média	Sig. <sup>b</sup>	95% Intervalo de Confiança para Diferença <sup>b</sup>	
					Limite inferior	Limite superior
07 DIAS	GI	GII	-,040	1,000	-2,651	2,571
		GIII	4,384*	,002	2,435	6,333
		GIV	1,950	,167	-,899	4,799
	GII	GI	,040	1,000	-2,571	2,651
		GIII	4,424*	,016	1,196	7,652
		GIV	1,990	,514	-2,754	6,734
	GIII	GI	-4,384*	,002	-6,333	-2,435
		GII	-4,424*	,016	-7,652	-1,196
		GIV	-2,434	,118	-5,599	,731
	GIV	GI	-1,950	,167	-4,799	,899
		GII	-1,990	,514	-6,734	2,754
		GIII	2,434	,118	-,731	5,599
14 DIAS	GI	GII	-,734	,996	-7,117	5,649
		GIII	4,476*	,046	,096	8,856
		GIV	3,862	,248	-2,673	10,397
	GII	GI	-,734	,996	-5,649	7,117
		GIII	5,210*	,002	3,011	7,409
		GIV	4,596*	,017	1,222	7,970
	GIII	GI	-4,476*	,046	-8,856	-,096
		GII	-5,210*	,002	-7,409	-3,011
		GIV	-,614	,971	-4,116	2,888
	GIV	GI	-3,862	,248	-10,397	2,673
		GII	-4,596*	,017	-7,970	-1,222
		GIII	,614	,971	-2,888	4,116
21 DIAS	GI	GII	-,354	1,000	-6,109	5,401
		GIII	9,514*	,003	5,143	13,885
		GIV	8,952*	,006	3,958	13,946
	GII	GI	,354	1,000	-5,401	6,109
		GIII	9,868*	,006	4,356	15,380
		GIV	9,306*	,001	6,293	12,319
	GIII	GI	-9,514*	,003	-13,885	-5,143
		GII	-9,868*	,006	-15,380	-4,356
		GIV	-,562	,973	-3,817	2,693
	GIV	GI	-8,952*	,006	-13,946	-3,958
		GII	-9,306*	,001	-12,319	-6,293
		GIII	,562	,973	-2,693	3,81

Tabela 3 – Tamanho da área de reparo em percentual, média geral e desvio padrão nos períodos observacionais de 07, 14 e 21 dias. Análise de variância (ANOVA)  $p < 0,05$ .

	GI	GII	GIII	GIV
07 dias	8,9 ( $\pm 0,7$ )%	8,9 ( $\pm 1,3$ )%	4,5 ( $\pm 0,7$ )%	6,9 ( $\pm 0,2$ )%
14 dias	12,6 ( $\pm 2,1$ )%	13,2 ( $\pm 1,3$ )%	8,0 ( $\pm 1,3$ )%	8,9 ( $\pm 0,9$ )%
21 dias	18,9 ( $\pm 1,5$ )%	19,3 ( $\pm 2,1$ )%	9,4 ( $\pm 2,1$ )%	9,9 ( $\pm 1,1$ )%

Figura 2 – Avaliação da neovascularização



Análise histomorfométrica foi utilizada após a imunohistoquímica com VEGF. Comparação quantitativa em relação a expressão de VEGF entre os tratamentos nos períodos de avaliação. G I (Biomaterial + CTM), G II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), G III (Biomaterial), G IV (Sem tratamento). Teste estatístico: Kruskal-Wallis,  $p < 0,05$ . \*#\$ - representam que esse grupo teve a maior quantidade de expressão de VEGF detectada e foi estatisticamente significativa nas comparações.



Figura 3 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 07 dias de reparo.

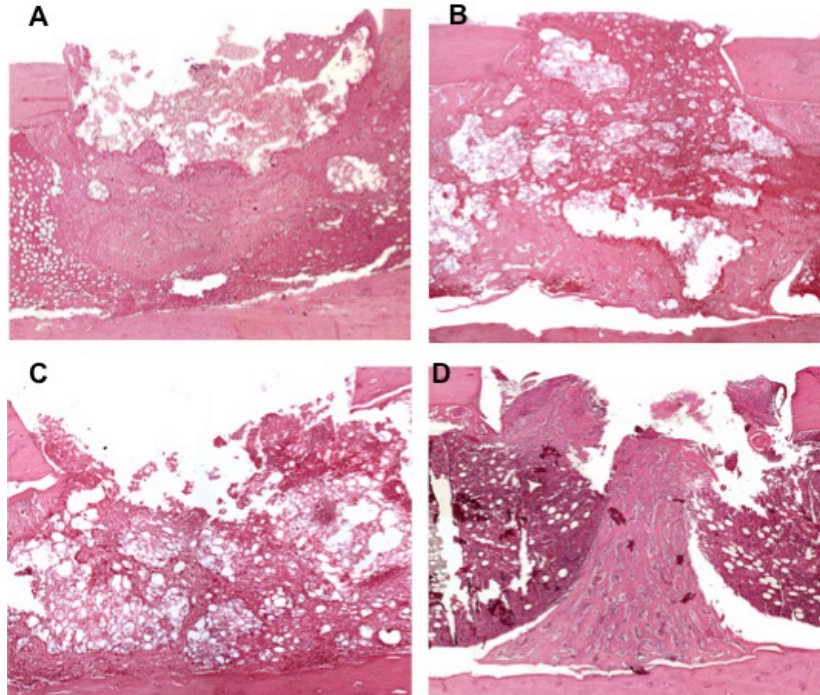


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento). Observa-se um reparo ósseo mais organizado e uma quantidade maior de tecido ósseo no Grupo I e II.

Figura 4 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 14 dias de reparo.

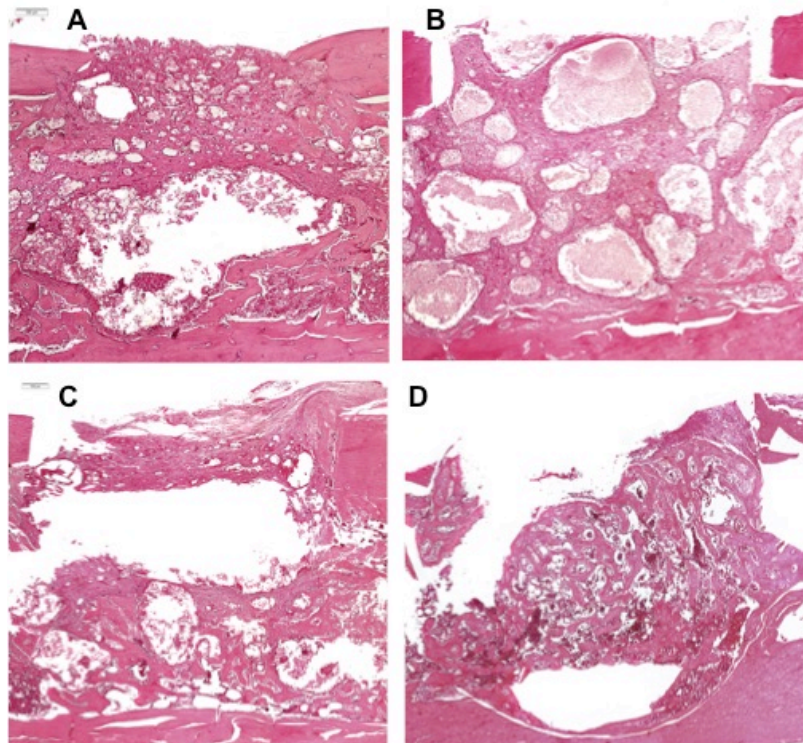


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento). Novamente se observa-se um quantidade maior de tecido ósseo neoformado nos grupos I e II.

Figura 5 – Cortes transversais histológicos corados em H&E, com aumento de 100x. Período de 21 dias de reparo.

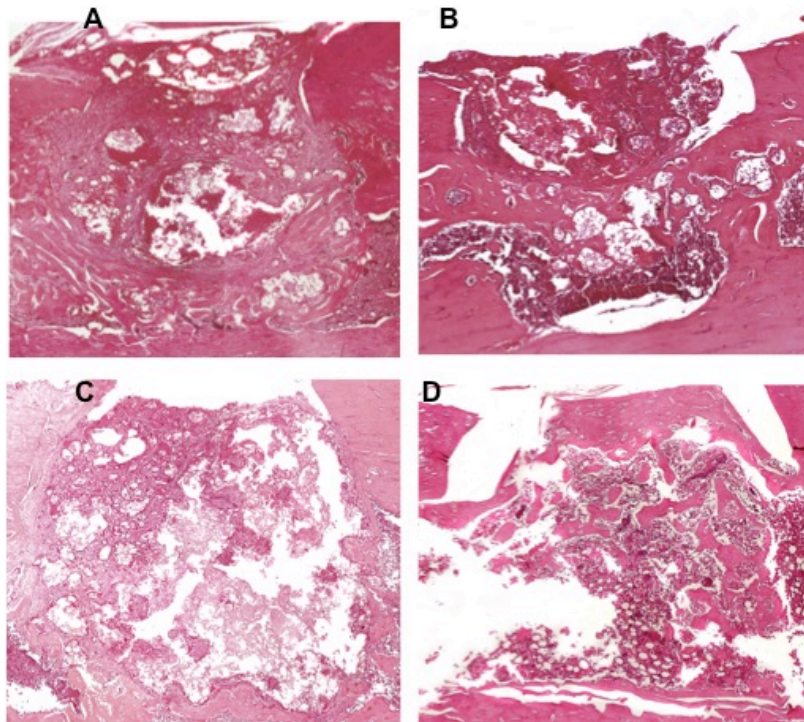


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento). Observa-se um quantidade maior de tecido ósseo neoformado nos grupos I e II.

Figura 6 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 07 dias de reparo.

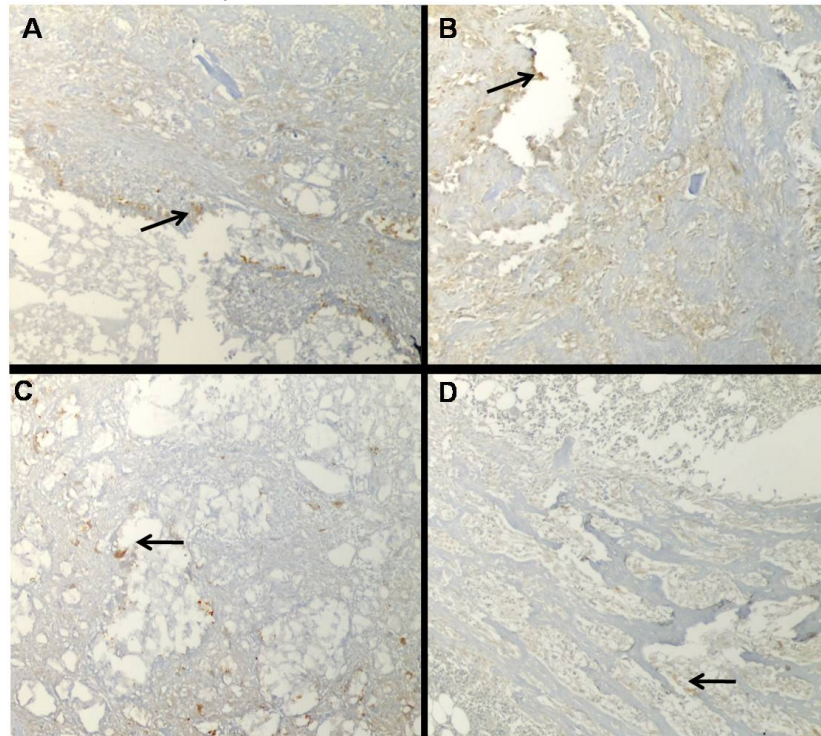


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento).

Figura 7 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 14 dias de reparo.

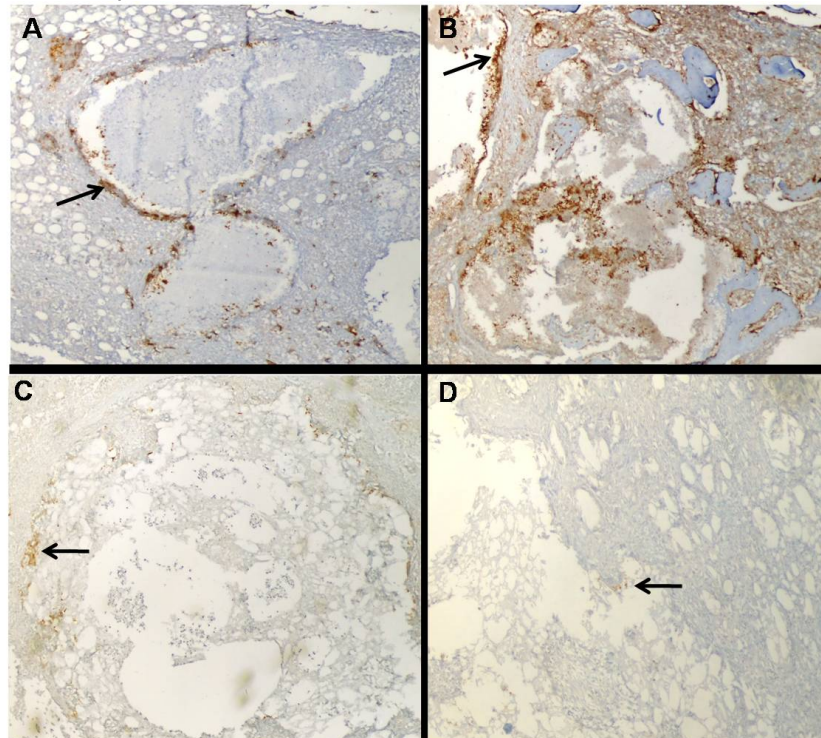


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento).

Figura 8 – Expressão imunohistoquímica da proteína VEGF. Note nas setas a marcação positiva. Período de 21 dias de reparo.

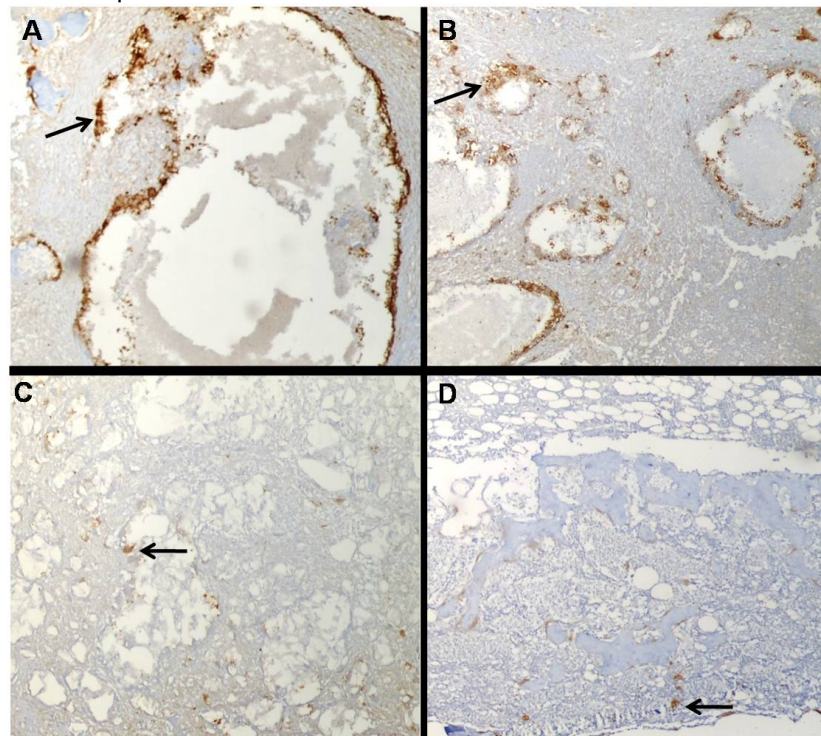


Imagem A - Grupo I (Biomaterial + CTM), Imagem B – Grupo II (Biomaterial + CTM + Cels. Endoteliais), Imagem C – Grupo III (Biomaterial), Imagem D (Sem tratamento).

## 4 Discussão

Os modelos animais têm sido amplamente utilizados em estudos que objetivam a avaliação do reparo ósseo e não existe um consenso sobre o modelo mais adequado. O rato selecionado nesse estudo é amplamente utilizado como modelo animal em inúmeras pesquisas<sup>1,6,19,25,26</sup> que envolvem a engenharia tecidual. Fato esse justificado pelo apropriado microambiente, pois não apenas a presença de células osteogênicas, mas também de osteoclastos e condições favoráveis para a remodelação óssea são encontradas nesses animais. Esse modelo animal representava cerca de 90% dos mamíferos utilizados, nas pesquisas biomédicas, devido às suas excelentes propriedades como animal de laboratório, no que diz respeito ao seu tamanho físico, rápido ciclo regenerativo, fácil manutenção e relativo baixo custo. Além disso, ainda, a similaridade dos genes com o genoma humano é reportado<sup>20</sup>. O modelo animal utilizado por esse estudo apresentou uma limitação que foi a espessura do fêmur que interferiu diretamente na possibilidade da realização de um defeito ósseo mais amplo. A variação da estrutura óssea disponível para sustentar a integridade do fêmur após o defeito ósseo criado foi uma preocupação ao longo do estudo, entretanto apenas dois animais da amostra total apresentaram uma fratura completa do fêmur e então foram excluídos do estudo.

Dentre os inúmeros biomateriais, os substitutos ósseos formados a partir de fosfato de cálcio, incluindo o  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) e  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) são escolhidos como arcabouços na engenharia tecidual<sup>18</sup>. O  $\alpha$ -TCP apresenta uma favorável biodegradação, biocompatibilidade e osteocondutividade. A taxa de absorção desse material é mais elevada quando comparada com o  $\beta$ -TCP<sup>16,32</sup>. Os substratos degradados, como por exemplo, o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{PO}_4^{3-}$  são rapidamente absorvidos e substituídos. Sendo esses requeridos no processo de diferenciação osteoblástica e na mineralização da matriz óssea<sup>15</sup>, pode-se provavelmente associá-los com a promoção e a diferenciação osteogênica das células tronco originárias da medula óssea (BMSCs)<sup>19</sup>. Por essas razões, o  $\alpha$ -TCP foi escolhido como biomaterial desse estudo e o utilizado foi modificado por Vásquez e Santos (2016) aumentando estruturalmente o diâmetro da porosidade. Essa manobra química buscou fornecer um acréscimo nos níveis de infiltração celular, aderência e crescimento ósseo, otimizando a osteocondução bem como a taxa de reabsorção.

O período de sobrevivência das CTMs quando transplantadas giram em torno de 1 a 2 semanas<sup>11</sup> e a partir dessa afirmação, o presente estudo decidiu determinar os três períodos de avaliação em 07, 14 e 21 dias, com o objetivo de avaliar a ação das ADSCs em sua plenitude biológica nos defeitos tratados com a engenharia celular.

A engenharia tecidual é caracterizada pela associação de um arcabouço com células tronco para que esse sinergismo possa ser benéfico ao reparo tecidual. O biomaterial serviu como arcabouço mimetizando o ambiente natural da matriz extracelular. A efetividade desse material foi aumentada com a incorporação de células com capacidade osteogênica<sup>8</sup> como as ADSCs. As ADSCs são obtidas com menor morbidade e apresentam a possibilidade da coleta de um volume maior do que as BMSCs<sup>5,19,33</sup>. Pelas vantagens descritas na literatura em obter as células tronco oriundas do tecido adiposo, esse estudo utilizou essa fonte coletando a gordura da região abdominal do modelo animal. Embora o tecido adiposo apresente as vantagens acima demonstradas, a comparação do efeito entre as células derivadas da medula óssea e do tecido adiposo, no reparo ósseo, ainda revelam resultados contraditórios, com exceção de um estudo recentemente publicado que refere a medula óssea como a melhor fonte para a engenharia óssea tecidual<sup>9</sup>. Pode-se afirmar que as células utilizadas nesse estudo são capazes de se diferenciar em adipócitos e osteoblastos além de apresentarem características morfológicas fibroblásticas e a imunofenotipagem típica das células tronco mesenquimais<sup>6</sup>.

Além das CTMs adicionadas aos biomateriais, a co-cultura com células endoteliais vem sendo pesquisadas. Essa adição celular busca o pronto restabelecimento do suporte sanguíneo na região ou seja, a vascularização precoce. Especificamente no defeito ósseo, esse é um fator fundamental para o processo osteogênico que culminará com o reparo ósseo. Justamente para favorecer esse processo biológico inicial, a associação das células endoteliais (CEs) com as ADSCs foi adotada como um método de tratamento do defeito nesse estudo. O transplante de CEs, apesar de ainda não estar bem elucidado, pode influenciar a vascularização em duas diferentes vias. A primeira indica para a significativa contribuição da neoformação dos vasos intraósseos através da diferenciação das células endoteliais<sup>7</sup> e fatores de diferenciação, desenvolvendo assim a vascularização<sup>27</sup>. A

segunda via pode ser indicada pela liberação de moléculas quimiotáticas que atraem as células endoteliais progenitoras residentes. Essas células são mobilizadas a partir da medula óssea por fatores de crescimento como VEGF e citocinas<sup>31</sup>.

Esse estudo realizou quatro diferentes tipos de tratamentos nos defeitos ósseos. No grupo I as ADSCs aderidas ao arcabouço foram inseridas no defeito e o segundo tratamento celular incluiu a associação das ADSCs com as CEs, a fim de observar se a engenharia tecidual, nesse modelo, poderia apresentar uma influência benéfica sobre o reparo ósseo. Para a avaliação utilizou-se a histomorfometria. Essa técnica apresenta algumas limitações como a necessidade de obtenção de uma amostra tecidual e não pode ser utilizada *in vivo* quando um modelo animal é utilizado. Esses fatores não retiram da histomorfometria a sua eficácia e é um método amplamente utilizado, em estudos experimentais, em defeitos ósseos criados em animais e tratados com células tronco.<sup>1,6,9,17,25,26</sup>

Os dois tratamentos celulares (grupo I ( $\alpha$  – TCP + ADSCs) e II ( $\alpha$  – TCP + ADSC + CEs)) foram capazes de representar um aumento da área óssea neoformada quando comparados com os outros grupos que não receberam a terapia com as células tronco e ou com as células endoteliais. Esses resultados levam a afirmar que a engenharia tecidual é capaz de otimizar o reparo ósseo conforme apontam outros estudos previamente publicados<sup>1,6,17,33,36</sup>. Os achados desse estudo podem ser creditados a capacidade das ADSCs serem excelentes fontes de células para engenharia óssea tecidual pois apresentam características de auto-replicação e de diferenciação osteogênica<sup>17</sup>.

A adição das células endoteliais influenciaram positivamente no aumento da expressão de VEGF reforçando os resultados previamente publicados<sup>4,26</sup>. E esse achado pode ser creditado a secreção de citocinas como o VEGF realizada pelas CEs<sup>26</sup>. No que diz respeito ao percentual da área reparada, observa-se que, mesmo não sendo estatisticamente significativa, o grupo que utilizou a associação das ADSCs e das CEs foi capaz de produzir a melhor média percentual de reparo nos períodos de 07 e 21 dias. Reforçando os resultados apresentados, em uma revisão sistemática com meta análise, os autores concluíram que, apesar da heterogeneidade dos estudos envolvidos ser alta, pode-se concluir o que o reparo ósseo é otimizado com a combinação de CTMs e CEs<sup>28</sup>.

Esses achados confirmam que a associação do alfa-fosfato tricálcico e células tronco originadas do tecido adiposo são capazes de estimular a neoformação óssea favorecendo assim, o reparo de defeitos ósseos e que o arcabouço utilizado promoveu efetivamente a adesão celular. Mesmo que os resultados da adição das células endoteliais, nesse modelo, não tenham sido observados de maneira direta no aumento da área reparada, pode-se afirmar que a vascularização do defeito foi beneficiada. A terapia celular utilizando as CTMs vem demonstrando ser segura, efetiva e excelentes resultados em diferentes áreas tem sido alcançados. Entretanto alguns desafios precisam ser ainda superados para que essa alternativa terapêutica possa ser introduzida clinicamente.

## **5 Conclusão**

Embora futuras investigações sejam necessárias para consolidar a engenharia tecidual como uma alternativa viável para o tratamento dos defeitos ósseos, os resultados desse estudo demonstraram o potencial terapêutico das ADSCs e das ECs, nesse modelo experimental, para reparar o defeito ósseo criado, aumentando a área óssea neoformada. O biomaterial utilizado por esse estudo, o alfa-fosfato tricálcico apresenta-se como uma alternativa, biologicamente aceita, de arcabouço para o emprego da engenharia tecidual.



## 6 Referências

1. Al-Rasheed A, Al-Ahmari F, Ramalingam S, Aldahmash A, Nooh N, Wang C, et al. Efficacy of Mesenchymal Stem Cells as Adjunct to Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats: An In Vivo Microcomputed Tomographic and Histologic Analysis. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2016; 36(suppl):s23–s37.
2. Askari A, Farjam M, Zohalinezhad ME. Early reports of bone repair techniques and bone xenograft in Persian traditional medicine. **J Integr Med**, 2015;13(3):140–1.
3. Barba-Recreo P, Del Castillo Pardo de Vera JL, Georgiev-Hristov T, Ruiz Bravo-Burguillos E, Abarrategi A, Burgueño M, et al. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. **J Craniomaxillofac Surg**, 2015; 43(7): 1161-68.
4. Böhrnsen F, Schliephake H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. **Int J Oral Sci**, 2016; 8: 223–30.
5. Caplan AI. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. **Tissue Eng**, 2000; 6(1): 1-8.
6. Corsetti A, Bahuschewkyj C, Ponzoni D, Langie R, Santos LA, Camassola M, et al. Repair of bone defects using adipose-derived stem cells combined with alpha-tricalcium phosphate and gelatin sponge scaffolds in a rat model. **J Appl Oral Sci**, 2017; 25(1): 10-19.
7. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. **Circ Res**, 2000; 87(9): 728-30.
8. Davies JE, Matta R, Mendes VC, Perri de Carvalho PS. Development, characterization and clinical use of a biodegradable composite scaffold for bone engineering in oro-maxillo-facial surgery. **Organogenesis**, 2010; 6: 161-6.
9. Freitas GP, Lopes HB, Almeida ALG, Abuna RPF, Gimenes R, Souza LEB, et al. Potential of osteoblastic cells derived from bone marrow and adipose tissue associated with a polymer/ceramic composite to repair bone tissue. *Calcif Tissue Int*, 2017: 1-9.
10. Gu Y, Chen L, Yang HL, Luo ZP, Tang TS. Evaluation of an injectable silk broin enhanced calcium phosphate cement loaded with human recombinant bone morphogenetic protein-2 in ovine lumbar interbody fusion. **J Biomed Mater Res A**, 2011; 97: 177-85.

11. Ide C, Nakai Y, Nakano N, Seo T, Yamada Y, Endo K, et al. Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in rat. **Brain Res**, 2010; 1332: 32-47.
12. Im, G. Stem Cells for reutilization in bone regeneration. **J. Cell. Biochem**, 2015; 116: 487–93.
13. Jakobsen C, Sørensen JA, Kassem M, Thygesen. Mesenchymal stem cells in oral reconstructive surgery: a systematic review of the literature. **J Oral Rehabil**, 2013; 40(9): 693–706.
14. Jeon O, Song SJ, Bhang SH, Choi CY, Kim MJ, Kim BS. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. **J Biomed Sci**, 2007; 14(3): 323-30.
15. Ko CL, Chen WC, Chen JC, Wang YH, Shih CJ, Tyan YC, et al. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphate cement with different ratios of platelet-rich plasma as identifiers. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, 2013; 33: 3537-44.
16. Li Y, Weng W, Tam KC. Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of alpha-tricalcium phosphate and beta-tricalcium phosphate. **Acta Biomater**, 2007; 3: 251-4.
17. Liu G, Zhang Y, Liu B, Sun J, Li W, Cui L. Bone regeneration in a canine cranial model using allogenic adipose derived stem cells and coral scaffold. **Biomaterials**, 2013; 34(11): 2655-64.
18. Liu J, Zhao L, Ni L, Qiao C, Li D, Sun H, et al. The effect of synthetic  $\alpha$ -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. **Am J Transl Res**, 2015; 7(9): 1588-601.
19. Luo E, Hu J, Bao C, Li Y, Tu Q, Murray D, et al. Sustained release of adiponectin improves osteogenesis around hydroxyapatite implants by suppressing osteoclast activity in ovariectomized rabbits. **Acta Biomater**, 2012; 8: 734-43.
20. Maher BA. Test tubes with tails. **The Scientist**, v. 16, p. 16-22, 2002.
21. Meirelles LDAS, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. **Br. J. Haematol**, 2003; 123(4): 702-11.
22. Morejón-Alonso L, Ferreira OJ, Carrodegua RG, Dos Santos LA. Bioactive composite bone cement based on  $\alpha$ -tricalcium phosphate/tricalcium silicate. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 2012; 100(1): 94-102.
23. Nardi NB, Camassola M. Isolation and culture of rodent bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells. **Methods Mol. Biol**, 2011; 698: 151-60.

24. Niemeyer P, Szalay K, Luginbühl R, Südkamp N, Kasten P. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta Biomater**, 2010; 6: 900–08.
25. Seebach C, Henrich D, Kähling C, Wilhelm K, Tami AE, Alini M, et al. Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto b-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. **Tissue Eng Part A**, 2010; 16(6): 1961-70.
26. Seebach C, Henrich D, Wilhelm K, Barker JH, Marzi I. Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. **Cell Transplant**, 2012; 21(8): 1667-77.
27. Simcock JW, Penington AJ, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM. Endothelial precursor cells home to a vascularized tissue engineering chamber by application of the angiogenic chemokine CXCL12. **Tissue Eng Part A**, 2009; 15(3): 655-64.
28. Sun K, Zhou Z, Ju X, Zhou Y, Lan J, Chen D, et al. Combined transplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for tissue engineering: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Res Ther**, 2016; 7(1): 151.
29. Tepper OM, Capla JM, Galiano RD, Ceradini DJ, Callaghan MJ, Kleinman ME, et al. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. **Blood**, 2005; 105(3): 1068–77.
30. Vásquez Niño AF, Dos Santos LAL. Preparation of an injectable macroporous  $\alpha$ -TCP cement. **Materials Research**, 2016; 19(4): 908-13.
31. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, et al. Stromal cell derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. **Circulation**, 2003; 107(9): 1322-8.
32. Yamada M, Shiota M, Yamashita Y and Kasugai S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha and beta-tricalcium phosphate in block grafts. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 2007; 82: 139-48.
33. Zanetti AS, Sabliov C, Gimble JM, Hayes DJ. Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, 2012; 101b(1): 187-99.
34. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, 2001; 7(2): 211-28.
35. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, 2002; 13(12): 4279-95.

36. Zuk PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. **Mol Biol Cell**, 2010; 21(11): 1783-87.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As reconstruções de defeitos ósseos representam um desafio na odontologia contemporânea devido aos complexos eventos biológicos envolvidos no processo de reparo. O enxerto de origem autógena segue sendo o padrão ouro para a reconstrução óssea. Contudo, os enxertos ósseos alógeno, o heterógeno e os biomateriais podem ser uma opção. As diversas opções de reconstrução com enxertos ósseos também agregam desvantagens, como por exemplo a necessidade de um segundo sítio doador e a reação de imunogenicidade.

O estudo experimental laboratorial apresentado pode concluir que nesse modelo estudado a engenharia tecidual foi favorável no que diz respeito ao aumento da área reparada nos defeitos ósseos realizados. Estatisticamente não se pode inferir que a adição das células endoteliais tiveram a capacidade de acelerar o reparo, mas o grupo que recebeu esse tratamento apresentou uma maior detecção imunohistoquímica da proteína de sinalização vascular VEGF. E como a neovascularização é um ponto crítico no sucesso dos enxertos a adição dessas células ao sítio receptor parece ser um estímulo a angiogênese e conseqüentemente a osteogênese.

Atualmente a reconstrução dos defeitos ósseos utilizando os substitutos ósseos apresentam um limitado sucesso e a escolha do biomaterial adequado é fundamental para que a engenharia tecidual desempenhe o seu papel. Dessa forma o desenvolvimento de arcabouços que apresentem a melhor biocompatibilidade possível, controle de bioresorbabilidade, bioatividade, que criem uma adequada ligação com o sítio receptor e ainda possam promover um alto índice de adesão celular vem sendo pesquisado. Novas estratégias vem sendo pesquisadas como a combinação de compósitos e o desenvolvimento de nanomateriais visando melhorar as propriedades mecânicas, a interação celular e a aplicabilidade dos biomateriais na engenharia tecidual.

Nesse contexto, a engenharia tecidual tem se apresentado como uma nova terapia para o reparo ósseo utilizando a associação de enxerto com capacidade osteocondutora e células tronco autógenas. Recentemente os estudos têm demonstrado técnicas e métodos inovadores para a engenharia óssea tecidual e com resultados extremamente promissores. No entanto, o tempo laboratorial

consumido, o custo elevado e a falta de estudos clínicos que possam desenvolver protocolos clínicos reprodutíveis e com resultados confiáveis são barreiras que precisam ser ultrapassadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSHAGEN, K. et al. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone. **Journal of Biomedical Material Research**. Part A, Hoboken, v. 91, n. 2, p. 557-566, nov. 2009.

AGACAYAK, S. et al. Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Roma, v. 16, p. 679-86, 2012.

AKHYARI, P.; KAMIYA, H.; HAVERICH, A.; KARCK, M.; LICHTEN-BERG, A. Myocardial tissue engineering: The extracellular matrix. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, n. 34, p. 229-41. 2008.

ALESTALO, K.; LEHTONEN, S.; YANNOPOULOS, F.; MAKELA, T.; MAKELA, J.; YLITALO, K., et al. Activity of mesenchymal stem cells in a nonperfused cardiac explant model. **Tissue Eng Part A**, n. 19, p. 1122-31, 2013.

ALISON, M. et al. An introduction to stem cells. **Journal of Pathology**, Londres, v. 197, n. 4, p. 419-23, 2002.

ALOISE, A.C. et al. Repair of Critical-Size Bone Defects Using Bone Marrow Stem Cells or Autogenous Bone With or Without Collagen Membrane: A Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. **The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, Lombard, n. 30, p. 208-15, 2015.

BARANIAK, P.R.; McDEVITT, T.C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. **Regenerative. Medicine**, London, n. 5, v. 1, p. 121-43, jan. 2010.

BLANCH, E. Development of hydroxyapatite-based biomaterials scaffolds for hard tissue regeneration. **European cell and materials**, v.7, n.1, p. 46, 2004.

BOHNENBLUST, M. et al. An Experimental Design to Study Adipocyte Stem Cells for Reconstruction of Calvarial Defects. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 20, n. 2, p. 340-46, march 2009.

BÖHRNSEN, F.; SCHLIEPHAKE, H. Supportive angiogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells in monolayer and co-cultures. **Int J Oral Sci**, v. 8, n.4, p. 223-30. 16 dec. 2016

BROWN, W.E.; CHOW, L.C. A new calcium phosphate water-setting cement. In: BROWN, W.E. **Cements Research Progress**. Westerville, OH: American Ceramic Society, p. 352–379, 1986.

CALASANS-MAIA, M. D. et al. Effect of hydroxyapatite and zinc-containing hydroxyapatite on osseous repair of critical size defect in the rat calvaria, **Key Engineering Materials**, v. 361, n. 3, p.1273-1276, 2008.

CAPLAN, A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **Journal of Cellular Physiology**, New York, n. 213, v. 2, p. 341-7, nov. 2007.

CAPLAN, A.I. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. **Tissue Engineering**, New York, n. 11, v. 7-8, p. 198-1211, jul-aug. 2005.

CAPLAN, A.I. Tissue engineering designs for the future: new logics, old molecules. **Tissue Engineering**, New York, v. 6, n. 1, 2000.

CHANG, C.C. et al. Neurogenic differentiation of dental pulp stem cells to neuron-like cells in dopaminergic and motor neuronal inductive media. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 113, n. 12, p. 956-65. 2014.

COVAS, D.T. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146 + perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, Copenhagen, v. 36, n. 5, p. 642-54, may 2008.

CROSBY, J.R. et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. **Circulation Research**, Dallas, v. 87, n. 9, p.728-30, 2000.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B, Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science. Supplement**, London, v. 119, n. 11, p. 2204-13, jun. 2006.

DECLERCQ, H.A. et al. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in dynamic 3D-environments. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 34, n. 4, p. 1004-17, jan. 2013.

DELAERE, P.; VRANCKX, J.; VERLEDEN, G.; DE LEYN, P.; VAN RAEM-DONCK, D. Leuven Tracheal Transplant Group. Tra- cheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. **New England Journal of Medicine**, n. 362, 138-45. 2010.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Oxford, n. 8, v. 4, p. 315-7, 2006.

DOROZHUKIN, S. Calcium orthophosphate cements and concretes. **Materials**, v.2, p. 221-291, 2009.

DOS SANTOS, L.A. et al. Fiber-enriched double-setting calcium phosphate bone Cement. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65, n. 2, 244-50, 2003.



FENG, X., et al. 3D porous chitosan scaffolds suit survival and neural differentiation of dental pulp stem cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 34, n. 6, p. 859-70, 2014.

FOLLMAR, K.E. et al. Combined bone allograft and adipose-derived cell autograft in a rabbit model. **Annals of Plastic Surgery**, Boston, n. 58, v. 5, p. 561-5, may, 2007.

FRASER, J.K. et al. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. **Trends Biotechnology**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p.150-4, april 2006.

GARCÍA-CASTRO, J. et al. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 12, n. 6B, p. 2552-65, dec. 2008.

GNECCHI, M. et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. **Natural Medicine**, New York, n. 11, v. 4, p. 367-8, april. 2005.

GNECCHI, M. et al. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, Baltimore, n., 103, v. 11, p. 1204-19, nov. 2008.

HAMILTON, N.; BULLOCK, A.J.; MACNEIL, S.; JANES, S. M.; BIR-CHALL, M. Tissue engineering airway mucosa: A systematic review. **Laryngoscope**, n.124, 961-8. 2014.

GRANJEIRO, J. M. et al. Aplicação da Engenharia de Tecidos na Odontologia. In: PONTUAL, M. A. B.; MAGINI, R. S. **Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento – das pesquisas científicas à clínica odontológica**. São Paulo: Editora Santos, p.73-95, 2004.

JEON, O. et al. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. **Journal of Biomedical Science**, London, v. 14, n. 3, p. 323-330, may, 2007.

KO, C.L. et al. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphate cement with different ratios of platelet- rich plasma as identifiers. **Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 33, p. 3537-44, 2013.

LEGEROS, R.Z.; COHAYEB, A.; SHULMAN, A. Apatitic calcium phosphates: Possible dental restorative materials. **J Dent Res.**, v.61, p.343, 1982.

LI, Y., WENG, W, TAM, K.C. Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of alpha-tricalcium phosphate and beta-tricalcium phosphate. **Acta Biomaterials**, v. 3, p. 251-54, 2007.

LIU, J. et al. The effect of synthetic  $\alpha$ -tricalcium phosphate on osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells. **American Journal of Translational Research**, v. 7, n. 9, p. 588-601, 2015.

LIU, G. et al. Bone regeneration in a canine cranial model using allogenic adipose derived stem cells and coral scaffold. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 34, n. 11, p. 2655-64, apr. 2013.

LIU, Z.J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O.C. Trafficking and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 106, n. 6, p. 984-91, apr. 2009.

LOEFFLER, M.; ROEDER, I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models – a conceptual approach. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 171, n. 1, p. 8-26, 2002.

LUTTUN, A. et al. Vascular progenitors: from biology to treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, New York, v. 12, n. 2, p. 88-96, feb. 2002.

MATSUMOTO, T. et al. Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v. 215, n. 1, p. 234-42, apr. 2008.

MEZEY, E. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, New York, v. 290, n. 5497, p. 1779-82, dec. 2000.

MURPHY KC, HUGHBANKS ML, BINDER BY, LEACH JK. Engineered Fibrin Gels for Parallel Stimulation of Mesenchymal Stem Cell Proangiogenic and Osteogenic Potential. **Ann Biomed Eng**, 2014.

NIÑO, A.F.V., DOS SANTOS, L.A.L. Preparation of an Injectable Macroporous  $\alpha$ -TCP Cement. **Materials Research**, v. 19, n. 4, p. 908-13, 2016.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, London, v. 410, n. 6829, p.701-5, apr. 2001.

OSTROVIDOV, S. et al. Stem Cell Differentiation Toward the Myogenic Lineage for Muscle Tissue Regeneration: A Focus on Muscular Dystroph. **Stem Cell Rev and Rep.**, n. 11, p. 866-84, 2015.

SCADDEN, D.T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, London, n. 441, v. 7097, p. 1075-79, jun. 2006.

SCHINDELER, A.; KOLIND, M.; LITTLE, D.G. Cellular transitions and tissue engineering. **Cellular Reprogramming**. v. 15, n. 2, p. 101-6, 2013

SCHUBERT, T. et al. The enhanced performance of bone allografts using osteogenic-differentiated-derived mesenchymal stem cells. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 32, n. 36, p. 8880-91, 2011.

SEEBACH, C. et al. Endothelial Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells Seeded onto b-TCP Granules Enhance Early Vascularization and Bone Healing in a

Critical-Sized Bone Defect in Rats. **Tissue Engineering: Part A**, New Rochelle, v. 16, n. 6, p. 1961-70, jun. 2010.

SIMCOCK, J.W. et al. Endothelial precursor cells home to a vascularized tissue engineering chamber by application of the angiogenic chemokine CXCL12. **Tissue Engineering: Part A**, New Rochelle, v. 15, n. 3, p. 655-64, march. 2009.

STYLIOS, G.; WAN, T.; GIANNOUDIS, P. Present status and future potential of enhancing bone healing using nanotechnology. **Injury**, Bristol, v. 38, Suppl 1, p. S63-74, march. 2007.

SUN, K et al. Combined transplantation of mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells for tissue engineering: a systematic review and meta-analysis. **Stem Cell Research & Therapy**, n. 7, p. 151. 2016.

TODESCHI, M.R. et al. Transplanted Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Modify the In Vivo Microenvironment Enhancing Angiogenesis and Leading to Bone Regeneration. **Stem Cells and Development**, Larchmont, p. 1-39, feb. 2015.

TOHILL, M.; TERENCEHI, G. Stem-cell plasticity and therapy for injuries of the peripheral nervous system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego, v. 40, n. Pt 1, p. 17-24, aug. 2004.

VIERO, C.C. et al. Molecular analysis of the differentiation potential of murine mesenchymal stem cells from tissues of endodermal or mesodermal origin. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v. 21, n. 10, p. 1761-8, jul. 2012.

WAGNER, W. et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 11, p. 1402-16, nov. 2005.

YAMADA, M., SHIOTA, M., YAMASHITA, Y., KA-SUGAI, S. Histological and histomorphometrical comparative study of the degradation and osteoconductive characteristics of alpha- and beta-tricalcium phosphate in block grafts. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**; v. 82, p. 139-48, 2007.

YOON, Y.S. et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. **The Journal of Clinical Investigation**., v. 115, n. 2, p. 326-38, feb. 2005.

YOUNG, S. et al. Microcomputed tomography characterization of neovascularization in bone tissue engineering applications. **Tissue Engineering. Part B. Reviews**, New Rochelle, v. 14, n. 3, p. 295-306, sep. 2008.

ZANETTI, A.S. et al. Human adipose-derived stem cells and three-dimensional scaffold constructs: A review of the biomaterials and models currently used for bone regeneration. **Journal of Biomedical Material Research: Part B**, Hoboken, v. 101b, n.1, p. 187-99, 2012.

ZHANG, Xiaoying; ZHANG, Yangde. Tissue Engineering Applications of Three-Dimensional Bioprinting Cell. **Biochem Biophys**, n. 72, p.777–82, 2015.

ZIGDON-GILADI, H.; BICK, T.; LEWINSON, D.; MACHTEI, EE. Co-transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells promote neovascularization and bone regeneration. **Clin Implant Dent Relat Res**, n. 17, p. 353–9. 2015.

ZIGDON-GILADI, H. et al. Mesenchymal stem cells and endothelial progenitor cells stimulate bone regeneration and mineral density. **J Periodontol**, n. 85, p. 984-90. 2014.

ZUK, P.A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 13, n.12, p. 4279-95. dec. 2002.

ZUK, P.A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, New York, v. 7, n.2, p. 211-28, 2001.

ZUK, P.A. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, n. 11, p. 1783-87, june. 2010.

**ANEXO**

## Anexo A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 160059

**Data da Versão do Projeto:** 06/05/2016

**Pesquisadores:**

DEISE PONZONI

JOSÉ LUIZ BERNARDON PRETTO

ADRIANA CORSETTI

**Título:** AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO EM FÊMUR DE RATO COM USO DE  $\beta$ -  
FOSFATO TRICÁLCICO E CÉLULAS TRONCO

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 11 de maio de 2016.

  
Biol. Michael Everton Andrades  
Coordenador CEUA/HCPA