

LUIZA SILVA ARAUJO CORTEZ

**USO DE CÉLULAS TRONCO EM PROCEDIMENTOS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR NA IMPLANTODONTIA – REVISÃO DE LITERATURA.**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

2015

Luiza Silva Araujo Cortez

**USO DE CÉLULAS TRONCO EM PROCEDIMENTOS DE REGENERAÇÃO ÓSSEA
ALVEOLAR NA IMPLANTODONTIA – REVISÃO DE LITERATURA.**

Monografia apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Odontologia – área de concentração em Implantodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Frazão Cury

Faculdade de Odontologia – UFMG

Belo Horizonte

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

ATA

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais, por serem
meu exemplo de vida,
trabalho e amor.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me proporcionar a realização de tantos sonhos e objetivos, sempre com a graça de ter pessoas maravilhosas ao meu lado.

À minha mãe, Regina, por sempre me incentivar a buscar meus objetivos, me dando todo o amparo possível, e por me ensinar, a cada dia, a ser uma pessoa melhor.

Ao meu pai, Francisco, pelo apoio constante e por sempre me ensinar a ter “força, coragem e determinação”, em sua palavra e em seu exemplo.

Ao Guilherme, por todo amor, carinho, cuidado e compreensão.

Aos meus irmãos e cunhadas, pelo apoio constante e enorme amizade.

Ao Dr. Ernani, por fazer de sua clínica uma escola para mim, e compartilhar tantos ensinamentos.

Aos professores do curso de especialização, por todos os ensinamentos que nos foram passados, com grande dedicação e entusiasmo. Em especial, agradeço à minha orientadora, Dra. Vanessa Frazão, pela grande habilidade em ensinar, sempre com muito comprometimento, atenção e carinho.

À Vanessa, por organizar com tanto empenho e dedicação o nosso curso, sempre com muita alegria.

À Rosa e Adriana, por todo apoio durante as clínicas.

À Débora, de quem tive a sorte de ser dupla e, agora, amiga, pelo grande companheirismo, troca de conhecimentos e exemplo de dedicação.

À Danielly, por termos compartilhado tantos momentos de aprendizagem e crescimento ao longo do curso.

Aos demais colegas, pelo companheirismo, apoio e solidariedade. Em especial à Alexa, pelas jornadas para a UFMG, repletas de ensinamentos clínicos, desabafos e gargalhadas.

Aos pacientes, pela confiança e compreensão. Sem vocês, nada seria possível.

RESUMO

A perda de elementos dentários causa alterações estruturais no rebordo alveolar, levando a necessidade de serem realizados procedimentos de regeneração óssea previamente ao tratamento reabilitador com implantes. Diante da variedade de técnicas e materiais utilizados para reconstruções teciduais, o enxerto autógeno é considerado o “padrão ouro”. Contudo, sua utilização pode ser limitada pela disponibilidade óssea, necessidade de outra área cirúrgica e grande morbidade da área doadora. Assim, técnicas alternativas para reconstruções alveolares são extensamente investigadas, como os métodos que envolvem a engenharia tecidual. O presente estudo teve como objetivo revisar a literatura científica, visando avaliar a eficácia das diferentes abordagens terapêuticas com células tronco derivadas da medula óssea, empregadas para a regeneração óssea alveolar na implantodontia, enfocando os métodos de processamento e arcabouços utilizados, além de sua eficácia, reprodutibilidade e segurança para a aplicação clínica. Foram incluídas revisões de literatura, estudos *in vitro* e *in vivo*, em modelo animal ou em humanos, que apresentaram a utilização de uma ou mais abordagens terapêuticas com células tronco derivadas da medula óssea para reconstrução alveolar. Concluiu-se que a literatura científica apresenta evidências de que a utilização de abordagens terapêuticas com células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea é eficaz para a regeneração óssea alveolar, porém, mais estudos são necessários para que estas novas abordagens possam se tornar práticas clínicas confiáveis, seguras, e reproduzíveis.

ABSTRACT

The loss of dental elements causes structural changes on the alveolar ridge, leading to the necessity of bone regeneration procedures, for the treatment with implants. Given the variety of techniques and materials used for tissue reconstructions, the autogenous bone graft is considered the "gold standard." However, its use can be limited due to factors such as bone availability, need to another surgical area and high morbidity of the donor site. Therefore, alternative techniques to alveolar bone regeneration are widely investigated. In addition to the methods that involve the use of biomaterials, like homologous, xenogeneic and synthetic bone grafts, many research advance in the field of tissue engineering. The present study aimed to review the scientific literature, in order to evaluate the efficacy of different therapeutic approaches with bone marrow derived stem cells, employed for alveolar bone regeneration in implant dentistry. Furthermore, this study focused on processing methods and scaffolds, and the efficacy, reproducibility and safety for its clinical application. There were included other reviews and *in vitro* and *in vivo* studies related to cell-based approaches with bone marrow derived stem cells. In conclusion, that are evidences that those methods are efficient, but more research is necessary for its safe and predictable use in clinical situations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: fontes teciduais de células tronco mesenquimais. (Fonte: CASTRO-SILVA, COUTINHO e GRANJEIRO, 2010).

Figura 2: representação da técnica de aspiração da medula óssea da crista ilíaca posterior (Fonte: www.institutotumor.blogspot.com).

Figura 3: (a) enxertos em posição; (b) cilindros fechados pelas tampas oclusivas. (Fonte: PELEGRINE, *et al.*, 2011).

Figura 4: tubo de propileno após centrifugação do gradiente de densidade. (a) Notar fração mononuclear (seta); (b) Fração mononuclear da medula óssea misturada ao Bio-Oss. (Fonte: PELEGRINE, *et al.*, 2013).

Figura 5: preparação do osso injetável. (a) Procedimento de mistura dos componentes; (b) Forma de aplicação clínica. (Fonte: YAMADA, *et al.*, 2008).

Figura 6: Esquema do protocolo de aplicação clínica do osso injetável. (Fonte: YAMADA, *et al.*, 2011).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP - Fosfatase Alcalina

AMO - Aspirado de Medula Óssea

BMAC – *Bone Marrow Aspirate Concentrate*

cCTM-MO - Células Tronco Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea de Cabras

CEHVUs - Células Endoteliais Derivadas da Veia Umbilical Humana

Células iPS - Células Tronco Pluripotentes Induzidas

CF - Cola de Fibrina

CMO - Concentração do Aspirado da Medula Óssea

CTs - Células Tronco

CTM-MOs - Células Tronco Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea

CTMs - Células Tronco Mesenquimais

dCTMs - Células Tronco Mesenquimais Caninas

DMEM - Meio de Eagle Modificado de Dulbecco

DMO - Densidade Mineral Óssea

EA - Enxerto Autógeno

FCMMO - Fração Celular Mononuclear da Medula Óssea

FBS – Soro Fetal Bovino

FCS - Soro Fetal de Bezerro

FDBA - Enxerto Ósseo Homólogo Congelado e Seco

HA - Hidroxiapatita

HASi - Hidroxiapatita Recoberta por Sílica

HA/TCP - Hidroxiapatita/Tricálcio Fosfato

hCTM-MOs - Células Tronco Mesenquimais Humanas Derivadas da Medula Óssea

LSSM - Levantamento de Soalho de Seio Maxilar

MO - Medula Óssea

NO - Novo Osso

OAP - Osso Autógeno Particulado

ON - Osso Nativo

PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

PECAM – 1 – *Platelet – Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*

PLGA - Ácido Polilático Glicólico

PLH - *Platelet Lysate* Humana

PPP - Plasma Pobre em Plaquetas

PRGF - Fator de Crescimento Rico em Plaquetas

PRP – Plasma Rico em Plaquetas

RCT - Ensaio Clínico Radomizado

TGF-β - Fator de Crescimento Transformador β

β-TCP - Beta Tricálcio Fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	16
3 METODOLOGIA	17
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
4.1 DA ENXERTIA AUTÓGENA À TERAPIA CELULAR.....	18
4.2 CÉLULAS TRONCO: DEFINIÇÃO, ORIGEM E FONTES DE OBTENÇÃO.....	21
4.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA – MÉTODOS DE PROCESSAMENTO PARA USO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA	25
4.3.1 ASPIRADO DA MEDULA ÓSSEA (AMO)	25
4.3.2 CONCENTRAÇÃO DO ASPIRADO DA MEDULA ÓSSEA (CMO).....	26
4.3.3 FRAÇÃO CELULAR MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA / CONCENTRAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES	27
4.3.4 ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA.....	28
4.4 ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	30
4.5 ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	34
4.5.1 ESTUDOS EM MODELO ANIMAL.....	34
4.5.1.1 USO DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA.....	34
4.5.1.2 USO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA.....	36
4.5.1.3 EXPERIMENTOS COM ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA	39
5.1 ESTUDOS EM HUMANOS.....	46
5 DISCUSSÃO.....	55
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

A perda de elementos dentários leva a alterações estruturais no rebordo alveolar, que podem se tornar grandes complicadores ao tratamento reabilitador com implantes dentários. Além da limitação referente à quantidade de tecido ósseo suficiente para a instalação de implantes, incluem-se também os fatores estéticos, hoje considerados como importantes critérios para se atingir o sucesso nos tratamentos odontológicos (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A).

Diante disto, buscam-se estratégias para minimizar a perda óssea ou reconstruir os tecidos quando as alterações teciduais já ocorreram. Assim, o principal objetivo de uma reabilitação com implantes torna-se regenerar o tecido ósseo perdido de forma previsível, para possibilitar a instalação de implantes dentários em posições protética e esteticamente adequadas (SHANBHAG E SHANBHAG, 2013).

Segundo Darby *et al.* (2008) definem-se como técnicas para preservação da crista óssea alveolar quaisquer procedimentos realizados no momento ou em seguida à extração dentária, com o objetivo de minimizar a reabsorção externa da crista e maximizar a formação óssea no alvéolo. Já as técnicas regenerativas são definidas como procedimentos que visam substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos, com o objetivo de restaurar suas funções normais. Atualmente, várias técnicas de preservação e de regeneração óssea alveolar são conhecidas, e estas se baseiam principalmente no uso de osso autógeno ou de biomateriais, com ou sem a associação de membranas como barreiras (SHANBHAG E SHANBHAG, 2013).

O enxerto autógeno é considerado “Padrão Ouro” da reconstrução óssea, devido à sua biocompatibilidade e à suas propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese (ROGERS E GREEN, 2012). Os enxertos podem ser removidos de áreas intra ou extraorais, de acordo com as condições clínicas de cada caso, entretanto, independentemente da região doadora, a realização deste tipo de procedimento geralmente é limitada, em vista da necessidade de outra área cirúrgica e por apresentar maior morbidade pós-operatória. Além disto, apesar de apresentarem relativamente fácil acesso, as áreas doadoras intra-orais apresentam baixa disponibilidade de tecido ósseo, sendo insuficientes para regenerações muito extensas, e as áreas extra-orais, embora possuam boa disponibilidade óssea, necessitam que haja internação hospitalar, têm alto custo e apresentam morbidade ainda maior (SOLTAN, *et al.*, 2005; ROGERS E GREEN, 2012).

As reconstruções com osso autógeno levam aos leitos receptores células osteocompetentes e fatores de crescimento, com a capacidade de formar novo osso e ativar o crescimento de uma camada óssea mais espessa, princípios denominados como osteogênese e osteoindução (ROGERS E GREEN, 2012).

Como alternativas aos enxertos autógenos, existem diversos substitutos ósseos, como os ossos homólogos, xenógenos e sintéticos. Porém, também existem várias limitações nas aplicações clínicas destes biomateriais, principalmente devido à suas propriedades biológicas e mecânicas (KAIGLER e MOONEY, 2001).

Diante disto, surge o campo da engenharia tecidual, que vem sendo desenvolvido para recriar funcionalmente tecidos e órgãos que tenham sido afetados por traumas, defeitos congênitos ou doenças adquiridas, como a doença periodontal, quando se trata da região maxilofacial (KAIGLER e MOONEY, 2001). Em resumo, busca-se replicar as propriedades intrínsecas dos enxertos autógenos, com sua tradicional tríade: osteocondução, osteoindução e osteogênese, sendo necessário um material (*scaffold*) com propriedades osteocondutoras, que mantenha o espaço a ser regenerado, fatores de crescimento capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, e células osteocompetentes em adequado número (KAIGLER e MOONEY, 2001; EGUSA, *et al.*, 2012). O uso da terapia celular geralmente refere-se à remoção de células multipotentes de uma fonte autógena e seu subsequente cultivo e expansão (EGUSA, *et al.*, 2012)

Várias técnicas de regeneração óssea vêm sendo desenvolvidas dentro da engenharia tecidual. Em relação àquelas que envolvem o uso de células tronco, citam-se variados arcabouços, como osso homólogo, xenógeno ou enxertos sintéticos (DALLARI, *et al.*, 2006; JAFARIAN, *et al.*, 2008; MANKANI, *et al.*, 2007). Há também o uso de diferentes fontes celulares autógenas, como, entre outras, a medula óssea, tecido adiposo e tecidos embrionários, sendo mais prevalente a utilização de células tronco mesenquimais (CTMs) provenientes da medula óssea (MO) (CASTRO-SILVA, COUTINHO E GRANJEIRO, 2010; HUANG, GRONTHOS e SHI, 2009). Além disto, existem diferentes métodos de processamento celular, como o uso do aspirado da medula óssea *in natura* (PELEGRINE, *et al.*, 2010; KUHL, *et al.*, 2013), da concentração das CTMs derivadas da MO (RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011) e de CTMs cultivadas e expandidas *in vitro* (YAMADA, *et al.*, 2011; BEHNIA, *et al.*, 2012).

O principal objetivo dos tratamentos clínicos regeneradores é restabelecer a função e a estética dos tecidos que sofreram alterações, através de intervenções menos invasivas e que gerem menor morbidade aos pacientes (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A). Apesar de já haver conhecimento clínico e teórico de técnicas alternativas aos enxertos autógenos que sejam eficazes para a regeneração do rebordo alveolar, ainda existem limitações em sua aplicação clínica, fazendo com que novas abordagens sejam investigadas, como as técnicas de terapia celular.

2 OBJETIVOS

Revisar a literatura científica, visando avaliar as diferentes abordagens terapêuticas com células tronco derivadas da medula óssea, em relação:

- À eficácia na regeneração óssea alveolar empregada pela implantodontia;
- Aos métodos de processamento e arcabouços utilizados;
- À eficácia, reprodutibilidade e segurança dos diferentes métodos para a aplicação clínica.

3 METODOLOGIA

Realizou-se uma busca bibliográfica detalhada nas principais bases de dados de literatura médica, e os artigos selecionados foram obtidos através do portal CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Nas buscas, utilizaram-se as seguintes palavras-chave: *bone marrow stem cells, tissue engineering, bone regeneration, cell therapy, mesenchymal stem cell, guided bone regeneration, alveolar augmentation*. Foram selecionados artigos publicados nos principais periódicos científicos, escritos na língua inglesa e em português.

Como critérios de seleção, buscaram-se revisões de literatura, estudos *in vitro*, *in vivo* em animais e em humanos que apresentaram a utilização de uma ou mais abordagens terapêuticas com células tronco realizadas com o objetivo de regeneração óssea alveolar na implantodontia. Foram incluídos apenas os estudos que utilizaram abordagens com células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Não foram incluídos neste estudo trabalhos que utilizaram a terapia celular para reconstrução de defeitos ósseos em geral, como fendas nasopalatinas, reconstruções bucomaxilofaciais, reconstruções de ossos longos e consolidação de fraturas, assim como não foram incluídos estudos relacionados a tratamentos periodontais e periimplantares.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 DA ENXERTIA AUTÓGENA À TERAPIA CELULAR

Sabe-se que, dentre todos os materiais de enxerto ósseo conhecidos, o enxerto autógeno é considerado “padrão ouro”, uma vez que, sozinho, fornece mecanismos para a osteocondução, osteogênese e osteoindução (ROGERS E GREEN, 2012). Define-se como osteocondução o mecanismo pelo qual é formado novo tecido ósseo por aposição através da utilização de uma matriz. Quando um arcabouço biocompatível é inserido em um sítio receptor, este processo ocorre de maneira controlada a partir do osso nativo em direção ao biomaterial, podendo haver uma gradativa reabsorção do material enxertado e sua substituição por novo tecido, através de uma reação mediada por células. O mecanismo da osteoindução é definido pelo processo no qual células tronco mesenquimais indiferenciadas se transformam em células osteogênicas. Este processo é mediado por proteínas morfogenéticas ósseas, que podem provocar a diferenciação de células mesenquimais primitivas em osteoblastos. Por fim, o mecanismo da osteogênese caracteriza-se pela habilidade de osteoblastos viáveis em formar osso diretamente no material enxertado (SOLTAN, *et al.*, 2005).

Além da matriz inorgânica que é levada às áreas receptoras, um bloco ósseo autógeno córtico-medular também leva osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e proteínas, que possuem a capacidade de iniciar a osteogênese. Osteoblastos são células provenientes de células osteoprogenitoras. Possuem a função de sintetizar os componentes orgânicos da matriz óssea, como colágeno, proteoglicanos e glicoproteínas, além de participarem da mineralização desta matriz. Localizam-se na superfície do osso, formando camadas de células cubóides ou cilíndricas. Sua morfologia se altera de acordo com sua atividade metabólica: quando estão em intensa atividade de síntese, apresentam forma cubóide, e seu citoplasma torna-se mais basófilo. Em estado de pouca atividade, tornam-se achatadas e a basofilia citoplasmática diminui (GARTNER e HIATT, 2003).

À medida que a matriz óssea é depositada, os osteoblastos vão sendo aprisionados pela matriz recém sintetizada, e passam a ser denominados osteócitos. A matriz deposita-se ao redor das células, formando lacunas, e de seus prolongamentos, formando canalículos. Após serem aprisionados, os osteócitos abandonam a função de secretar a matriz óssea, porém permanecem liberando outras substâncias

necessárias para a manutenção do osso, como fatores de crescimento (GARTNER e HIATT, 2003).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes e multinucleadas. Originam-se pela fusão de precursores mononucleados provenientes da medula óssea e são responsáveis pela reabsorção da matriz e degradação do tecido ósseo, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (GARTNER e HIATT, 2003).

A despeito de os enxertos autógenos transportarem tais células, acredita-se que sua atividade osteogênica é limitada, uma vez que pesquisas indicaram que aproximadamente 80% das células presentes nos enxertos autógenos morrem em algum momento durante o procedimento, seja ele no processo de remoção do bloco da área doadora, no armazenamento do tecido ou na adaptação ao leito receptor. Entretanto, proteínas e outros fatores morfogenéticos são liberados em decorrência à morte celular, o que pode iniciar a transformação de células indiferenciadas que foram atraídas para a área receptora. Além disto, os osteoblastos que resistem a este processo não possuem a capacidade de se dividir, limitando-se a apenas produzir matriz óssea mineralizada (SOLTAN, *et al.*, 2005).

Apesar da técnica de enxertia autógena ser universalmente aceita, associa-se a ela o risco de ocorrerem diversas complicações, tais como, hemorragia, parestesia e maior morbidade. Desta maneira, investigam-se novas abordagens para reduzir ou eliminar a dependência dos procedimentos de regeneração óssea aos enxertos autógenos, levando a estudos de vários substitutos, tais como: fosfatos de cálcio, beta tricálcio fosfato (β -TCP) (TOKUGAWA, *et al.*, 2012; JAFARIAM, *et al.*, 2008), biomateriais de origem xenógena (osso bovino mineralizado desproteínizado – Bio-Oss) (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A; ITO, *et al.*, 2005; RICKERT, *et al.*, 2011) e de origem homóloga (osso humano congelado desmineralizado e osso homólogo congelado fresco) (SOLTAN, *et al.*, 2007; FILHO-CERRUTI, *et al.*, 2007; DALLARI, *et al.*, 2006).

Segundo Soltan *et al.* (2005), a avaliação de qualquer procedimento de regeneração óssea deve se pautar pela análise de sua eficácia biológica, e, neste aspecto, a eficácia dos enxertos depende da presença de osteoblastos, ou de células tronco que possam se diferenciar em osteoblastos. Como a maioria dos substitutos ósseos são apenas osteocondutores, pesquisadores buscam estratégias para incrementar estes materiais com células viáveis, para que sejam alcançadas características semelhantes às dos enxertos autógenos (TOKUGAWA, *et al.*, 2012; JAFARIAM, *et al.*, 2008; PELEGRINE, *et al.*, 2013 A).

Novas terapias dentro da engenharia tecidual vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de possibilitar a obtenção de uma regeneração óssea previsível clinicamente. Estas incluem, mas não se limitam, à liberação de fatores de crescimento incorporados em carreadores, a estimulação da produção seletiva de fatores de crescimento através de terapias genéticas e a liberação de arcabouços compostos por células expandidas. Abordagens que utilizam este tipo de estratégia são definidas, em geral, pelo termo terapia celular (PAGANI, *et al.*, 2012).

4.2 CÉLULAS TRONCO: DEFINIÇÃO, ORIGEM E FONTES DE OBTENÇÃO

Sabe-se que no corpo humano existem mais de 200 tipos de células, organizadas em órgãos e tecidos. A necessidade de se entender como os tecidos são mantidos na idade adulta, e como surgem tantos tipos celulares em um embrião humano, estimulou o início das pesquisas com células tronco, que estão em foco na atualidade.

Células tronco (CT) são células indiferenciadas que apresentam duas importantes propriedades. A primeira é a capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, sem alterar seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa e constante de sua população nos tecidos (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009). Estas células filhas são consideradas como células tronco adultas, e geram somente linhagens apropriadas para os tecidos nos quais residem, sendo referidas como multipotentes ou unipotentes (LEBLOND, 1964). A segunda é a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, gerando células especializadas. Desta maneira estão diretamente relacionadas à regeneração de tecidos (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009).

As CT podem ser classificadas em três diferentes categorias: células tronco embrionárias, que são existentes apenas nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário; células tronco adultas (também denominadas somáticas), encontradas em vários tecidos do organismo humano; e células tronco pluripotentes induzidas (células iPS), que se caracterizam por células recentemente desenvolvidas por pesquisadores e apresentam propriedades semelhantes às embrionárias. As células iPS foram desenvolvidas a partir de células com funções especializadas, como as da pele. Apesar de haver estes três tipos celulares, um estudo demonstrou que, no período compreendido entre 1995 e 2009, houve grande prevalência de pesquisas com células tronco mesenquimais adultas ou pós-natais (94,15%) em comparação com as embrionárias ou pré-natais (7,88%) (CASTRO-SILVA, COUTINHO e GRANJEIRO, 2010).

As CT embrionárias possuem a habilidade de gerar todas as células diferenciadas de um indivíduo adulto, e são definidas como pluripotentes (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009). O primeiro relato em humanos de que estas células poderiam ser derivadas de blastocistos humanos abriu oportunidades para os tratamentos baseados na terapia celular. Porém, devido ao fato destas células serem provenientes de embriões poupados na fertilização *in vitro*, sempre existem controvérsias em sua utilização (THONSON, MARSHALL e TROJANOWSKI, 1998).

As CT adultas são definidas como multipotentes, por terem uma maior restrição para as opções de diferenciação, havendo apenas a possibilidade de diferenciação em sua própria linhagem celular (ectodérmica, mesodérmica ou endodérmica) (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009). Entretanto, com os avanços da ciência, este conceito têm sido alterado, uma vez que já se conhece a possibilidade de se reprogramar células adultas para um estado pluripotente através da transferência de núcleos adultos no citoplasma de oócitos, como na criação da ovelha Dolly (WILMUT, *et al.*, 1997).

Células tronco mesenquimais (CTMs) são um tipo heterogêneo celular com o potencial de diferenciação em diversas linhagens somáticas. Elas podem ser isoladas de vários órgãos e apresentam a capacidade de autorrenovação e diferenciação em múltiplos tipos de células de origem mesodérmica, como células dos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo, tendinoso e muscular (SOUSA, *et al.*, 2014). Diante de resultados de pesquisas recentes, possivelmente também podem se diferenciar em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais e hepatócitos (SOUSA, *et al.*, 2014).

Há mais de 40 anos, Friedentstein *et al.* (1968) descreveram pela primeira vez este tipo celular isolado da medula óssea, as definido como células aderentes com uma aparência próxima à do fibroblasto. As observações iniciais de Friedenstein *et al.* (1968) serviram como base para estudos posteriores, que mostraram que as células estromais da medula óssea são os precursores comuns dos tecidos mesenquimais. As CTMs, embora possuam uma capacidade de diferenciação mais limitada que as CT embrionárias, apresentam grandes vantagens, levando-se em conta a facilidade de isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura, e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alogênicos (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009).

No corpo humano há varias fontes de CTMs, como periósteo, cérebro, fígado, bexiga, medula óssea (MO), tecido adiposo, ossos, músculos, líquido amniótico, folículo piloso, cordão umbilical, sangue menstrual e placenta fetal (SOUSA, *et al.*, 2014). Uma revisão sistemática publicada em 2010 indicou que, dentre os artigos científicos publicados entre 1995 e 2009, o isolamento das CTMs neste período foi realizado especialmente na medula óssea (79,31%) (Figura 1) (CASTRO-SILVA, COUTINHO e GRANJEIRO, 2010). Corroborando este achado, Huang e colaboradores afirmaram que, dentre as CTMs, as derivadas da medula óssea (CTMs-MO) são as mais estudadas (HUANG, GRONTHOS e SHI, 2009). Fontes teciduais alternativas incluíram: tecido adiposo (6,65%), tecido muscular (4,50%), sangue (2,52%), parede

de cordão umbilical (1,54%), periósteo (3,02%), tecido ósseo (2,83%), tecido conjuntivo de órgãos, como pele (0,86%), fígado (0,49%), pulmão (0,31%) e polpa dental de dentes permanentes (1,11%) ou decíduos (0,49%), sangue periférico (1,48%), mórula ou blástula (1,23%), âmnio (1,17%), placenta (1,11%), ligamento periodontal (1,05%), sinóvia (0,86%) e papila dental (0,62%), dentre outras fontes (CASTRO-SILVA, COUTINHO e GRANJEIRO, 2010).

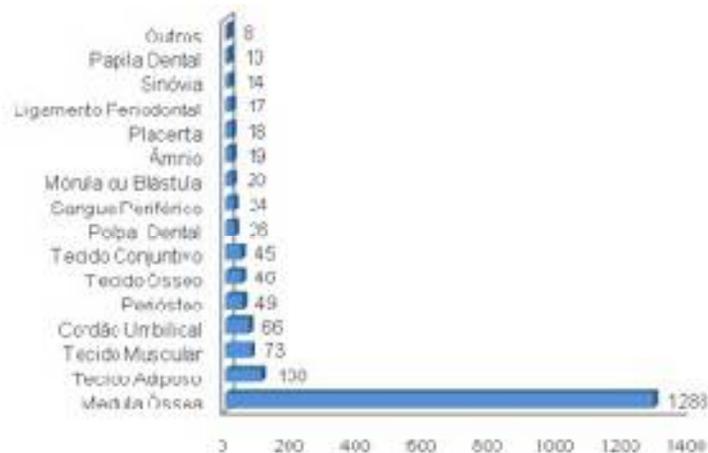


Figura 1: fontes teciduais de células tronco mesenquimais. (Fonte: CASTRO-SILVA, COUTINHO e GRANJEIRO, 2010).

Desde a primeira descrição como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (FRIEDSTEIN, *et al.*, 1968), a principal fonte de CTMs permanece a medula óssea. A MO é uma fonte rica e heterogênea de CT com potencial de se diferenciar em outras células que irão formar os progenitores hematopoiéticos e mesenquimais (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009). Também contém fatores de crescimento e abundante suplemento para as CT adultas. As CT hematopoiéticas são responsáveis pela formação das células sanguíneas, e as mesenquimais, além das funções já citadas anteriormente, fornecem suporte a estas (SOLTAN, *et al.*, 2005). A quantidade de CTMs neste tecido varia, principalmente, com a idade (ARVIDSON, *et al.*, 2011), sendo que a MO de crianças contém uma maior concentração de CTMs do que a de adultos. Assim, na medula óssea fetal existem 25 vezes mais CTMs do que na medula de uma pessoa adulta (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009).

Contrariamente às técnicas de remoção de enxertos ósseos autógenos, a técnica para aspiração da MO não requer um sítio cirúrgico aberto e é considerada relativamente simples, de baixo custo e pouca morbidade (SOLTAN, *et al.*, 2005), além de causar menor desconforto aos pacientes (SAUBIER, *et al.*, 2011). É realizada rotineiramente

por hematologistas e oncologistas. Recomendam-se três localizações para a aspiração da MO em pacientes adultos: crista ilíaca anterior, crista ilíaca pósterosuperior e externo (SOLTAN, *et al.*, 2005).

As CTMs podem ser utilizadas para transplantes em indivíduos com doenças malignas hematológicas, como a leucemia. Além disto, podem ser utilizadas na terapia celular, em procedimentos que visam regenerar tecidos, como ósseo e cartilaginoso. As CTMs oferecem o maior potencial para a aplicação clínica da engenharia tecidual, já que são multipotentes, apresentam relativamente fácil acesso e seu isolamento e cultivo *in vitro* em determinados tipos celulares são previsíveis, incluindo em células osteoprogenitoras (KHOJASTEH, *et al.*, 2012).

4.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA – MÉTODOS DE PROCESSAMENTO PARA USO EM REGENERAÇÃO ÓSSEA

Existem várias formas de se trabalhar com a medula óssea quando se trata de regeneração tecidual óssea (SOLTAN, *et al.*, 2005), e estas, em geral, se baseiam nos seguintes métodos: aspirado da medula óssea (AMO) (OLIVEIRA E SILVA, *et al.*, 2012; KUHL, *et al.*, 2013); concentração do aspirado da medula óssea (CMO) (SAUERBIER, *et al.*, 2011; KUHL, *et al.*, 2013); fração celular mononuclear da medula óssea (FCMMO) (FILHO-CERRUTI, *et al.*, 2007); isolamento e cultura das células tronco mesenquimais adultas derivadas da medula óssea (YAMADA, *et al.*, 2011; HONDA, *et al.*, 2013).

4.3.1 ASPIRADO DA MEDULA ÓSSEA (AMO)

A coleta da MO pelo método do aspirado pode ser realizada em ambiente ambulatorial com o paciente sob anestesia local, sendo possível a aspiração em vários ossos, como o íliaco (Figura 2), externo, fêmur e humero. Em um ambiente apropriado, o sítio para aspiração é demarcado, e se realiza a assepsia da pele com iodo ou clorexidina. Aplica-se anestesia local infiltrativa, que irá atingir a epiderme, tecido subcutâneo e periósteo. Em seguida, insere-se a agulha com mandril de aspiração e biópsia da MO até o contato com o osso. Mantendo firmemente a agulha sob pressão constante, ela é rotacionada em ambos os sentidos para se penetrar no espaço medular através do osso cortical. A perda da resistência indica que este passo foi alcançado (SOLTAN, *et al.*, 2005).

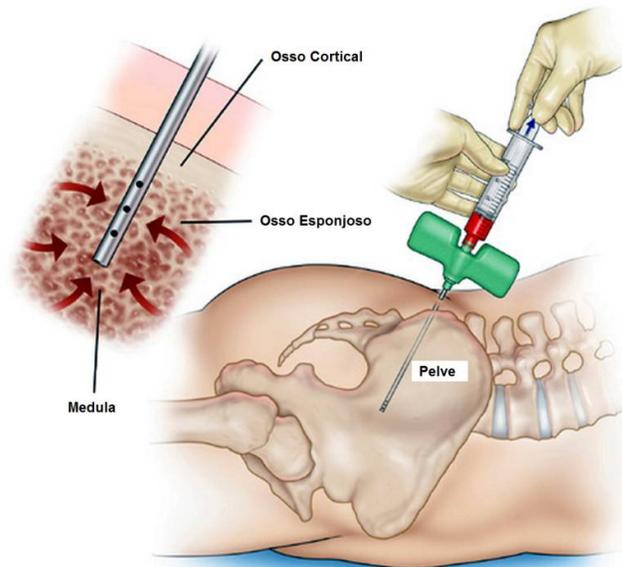


Figura 2: representação da técnica de aspiração da medula óssea da crista íliaca posterior (Fonte: www.institutotumor.blogspot.com).

Neste momento, o mandril é removido e se acopla uma seringa previamente heparinizada, na qual a MO será inserida após retração do êmbolo. Os primeiros 2 a 3 mL do aspirado contêm a maior concentração de células osteoprogenitoras, e quando se ultrapassa este volume, ocorre uma diluição por sangue venoso. Desta maneira, se for necessário maior volume, a agulha deve ser redirecionada, ou um novo sitio deve ser puncionado. Entretanto, sabe-se que a maioria dos defeitos ósseos na mandíbula e maxila podem ser reconstruídos com aproximadamente 02 mL de AMO (SOLTAN, *et al.*, 2005).

4.3.2 CONCENTRAÇÃO DO ASPIRADO DA MEDULA ÓSSEA (CMO)

O concentrado da medula óssea é o produto da centrifugação do AMO. Este método permite que grandes quantidades de medula óssea fresca possa ser concentrada em um volume menor, como, por exemplo, de 30 mL para 4 mL. O significado deste processamento é o aumento do número de células viáveis por mililitro de medula, fator diretamente relacionado à regeneração tecidual (PELEGRINE, *et al.*, 2013 B).

Diante da necessidade de haver uma proximidade física entre o local de atendimento do paciente e o local de processamento do AMO, o método de obtenção do CMO foi desenvolvido. Com o objetivo de ser um sistema fechado portátil e automatizado, desenvolveu-se o BMAC™ System (Haverst Technologies Corp. Suite 10040 Grissom Road Plymouth, MA, USA). Este sistema consiste em uma centrífuga (SmartPReP 2) e um kit de processamento de MO (BMAC 30-01). Com este sistema um profissional habilitado pode, após a aspiração da MO, realizar o processamento para a obtenção do CMO no local da punção, sem necessidade de locomoção do paciente.

No sistema BMAC é possível se processar o AMO anticoagulado em três diferentes volumes: 30 mL, 60 mL ou 120 mL. Sua obtenção deve seguir rigorosamente a metodologia preconizada, sempre por um profissional habilitado.

4.3.3 FRAÇÃO CELULAR MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA / CONCENTRAÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Com o objetivo de se promover a separação de camadas celulares da medula óssea, existem três diferentes métodos, que também são utilizados para a separação de componentes do sangue periférico: separação por gradiente de densidade; separação baseada na afinidade celular (positiva e negativa) e separação por tamanho celular. O método de separação por gradiente de densidade é o mais utilizado, por apresentar fácil execução. Para a realização deste método, necessita-se da utilização de um gradiente de densidade, que é uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade que prontamente se dissolvem em solução aquosa (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A).

Brevemente, o método de separação por gradiente de densidade se baseia na coleta do aspirado de medula óssea de maneira convencional, adição de solução salina tampão ao AMO e sua homogeneização em ambiente estéril de fluxo laminar. A este composto adiciona-se um gradiente de densidade, como, por exemplo, Ficoll-*Histopaque* (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Em seguida, inicia-se um processo de centrifugação para que haja separação efetiva das fases. Após este processo, visualizam-se fases bem distintas: na parte mais superior localiza-se o plasma e seus constituintes solúveis, na interfase as células mononucleares, logo abaixo, a camada contendo o gradiente de densidade e, em seguida, os eritrócitos e

granulócitos, que ficam sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo. A interfase contendo as células mononucleares é coletada através de uma pipeta, adicionada a um meio de cultura, submetida à nova centrifugação, após a qual será formado um *pellet*, que, ressuspenso em meio de cultura, formará a suspensão celular final (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A).

4.3.4 ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA

A partir dos achados de Friedenstein *et al.* (1968), vem sendo construído o conhecimento de que as CTMs podem ser expandidas e induzidas *in vitro* a se diferenciarem em diferentes tipos celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e fibroblastos (SOLTAN, *et al.*, 2005; SOUSA, *et al.*, 2014). Outros estudos já demonstraram que estas células podem também ser induzidas experimentalmente a se diferenciar em células não derivadas do folheto embrionário mesenquimal, como células do tipo neural, endodérmicas e cardiomiócitos (SOUSA, *et al.*, 2014). Entretanto, sabe-se que o tema da diferenciação celular é bastante controverso, e, em parte, ainda é desconhecido, uma vez que não se consegue suprir em laboratório todas as características do ambiente *in vivo* das CT (PELEGRINE, *et al.*, 2013 A)

Em virtude de ainda não se conseguir isolar e caracterizar as CTMs em um estado não manipulado, sua definição está baseada em uma combinação de propriedades morfológicas, fenotípicas e funcionais, que em sua maioria foram obtidas através de estudos *in vitro* (BERNARDO, *et al.*, 2011). Estas propriedades variam de acordo com os métodos empregados em seu cultivo, porém atualmente o isolamento e identificação destas células estão principalmente relacionados à sua morfologia e aderência ao plástico, resultando em uma população heterogênea de células, referidas como CTMs. A imunofenotipagem por citometria de fluxo também é aplicada para esta caracterização, mas ainda não existem marcadores específicos para a identificação destas células. Sabe-se, apenas, que elas se coram com uma combinação de marcadores positivos (CD105, CD73, CD90, CD166, CD44 e CD29) e negativos (CD14, CD31, CD34 e CD45) (HORWITZ, *et al.*, 2005). Além disto, geralmente se utiliza a diferenciação em osso, tecido adiposo e cartilagem como um critério de multipotencialidade (HORWITZ, *et al.*, 2005; WARNKE, *et al.*, 2013). Assim, pouco se sabe sobre as características das células precursoras primárias *in vivo*, uma vez que

ainda não foi possível isolar a célula mesenquimal mais primitiva em culturas celulares (BERNARDO, *et al.*, 2011).

Existem diversos métodos para isolamento e cultivo de CTMs *in vitro*, assim como já foram publicados vários estudos que envolvem estas células em métodos de terapia celular, tanto em modelo animal (ITO, *et al.*, 2005; BEHNIA, *et al.*, 2013; HONDA, *et al.*, 2013), quanto em humanos (YAMADA, *et al.*, 2008; YAMADA, *et al.*, 2011; BEHNIA, *et al.*, 2012; SHANBHAG E SHANBHAG, 2013). O método proposto por Pittenger *et al.* (1999), é referência para muitos destes estudos. No modelo destes autores, células que apresentam características de CMTs humanas foram isoladas do aspirado de medula óssea de doadores voluntários. Estas células apresentaram um fenótipo estável e permaneceram em monocamada *in vitro*, além de terem sido induzidas a se diferenciarem exclusivamente em linhagens de adipócitos, condrócitos e osteócitos. As CT foram identificadas como aquelas que mantiveram seu potencial multipotente após serem expandidas a colônias.

Brevemente, o modelo se baseou no isolamento das células do aspirado de medula óssea, utilizando o soro fetal bovino (FBS) como meio de expansão, e um gradiente de densidade para eliminar as células indesejadas, como as hematopoiéticas. Um pequeno percentual das células isoladas da interface de densidade se aderiu e proliferou como células fibroblásticas, que, em cultura por 05 a 07 dias, se desenvolveram em colônias visíveis e simétricas. A cultura das células mesenquimais isoladas foi composta por uma população de um único fenótipo (95 e 98% homogêneas nas passagens 1 e 2, respectivamente) pela análise de citometria de fluxo da expressão de antígenos de superfície. Estas células expandidas foram uniformemente positivas para SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124 e várias outras proteínas de superfície. A avaliação microscópica por imunofluorescência não mostrou células não marcadas, e morfologicamente não foram identificadas subpopulações de CTMs-MO, tanto por observação microscópica, quanto por citometria. A partir 10 mL de AMO, puderam ser geradas de 50 a 375 milhões de células pela segunda passagem. O estudo incluiu mais de 350 doadores de 19 a 57 anos, e destes, testou-se a multipotencialidade das CTMs expandidas de pelo menos 50 indivíduos. Todos os indivíduos submetidos aos ensaios das três linhagens responderam positivamente.

4.4 ESTUDOS *IN VITRO*

Para que os métodos de regeneração baseados na terapia celular sejam aplicados em procedimentos clínicos, extensivas pesquisas laboratoriais são necessárias para se assegurar sua eficácia, segurança e reprodutibilidade.

Alterações nas concentrações de oxigênio afetam várias características inatas das CT e células progenitoras. Grayson, *et al.* (2007) realizaram um experimento para avaliar se situações de hipóxia beneficiariam a proliferação e manutenção do estado indiferenciado de CTMs humanas em cultura em monocamada. Neste caso, culturas com concentrações de 2% de O₂ foram comparadas àquelas realizadas nas condições tradicionais de 20% de O₂. Tais condições de hipóxia favoreceram a expansão das CTMs humanas por 6 semanas, sem haver perda da capacidade de diferenciação das células, que mantiveram suas taxas de crescimento mesmo após atingirem a confluência, resultando na formação de múltiplas camadas celulares. Em adição, foram observadas diferenças na morfologia nuclear das CTMs e aumento da formação e organização da matriz extracelular. Portanto, estes resultados demonstraram que a hipóxia afeta em vários aspectos a fisiologia das células tronco, podendo ser um importante parâmetro durante os processos de expansão e diferenciação.

Lei *et al.* (2009) realizaram um experimento para avaliar a eficácia do plasma rico em plaquetas (PRP) em transportar células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTM-MOs) em arcabouços porosos 3D em comparação ao plasma pobre em plaquetas (PPP) e o meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Foram testadas *in vitro* a eficácia de sedimentação, proliferação e diferenciação das CTM-MOs através do PRP, PPP e DMEM em uma matriz porosa de ácido polilático glicólico (PLGA). Os resultados demonstraram que a eficácia de sedimentação das CTMs do PRP foi similar ao PPP, mas os potenciais para proliferação celular *in vitro* foram maiores do que PPP e DMEM. Assim, os autores concluíram que o PRP pode potencialmente efetuar um transporte efetivo e conveniente das células aos arcabouços porosos, característica que apresenta grande valia na engenharia tecidual.

Um estudo realizado em 2009 (NAIR, *et al.*, 2009) investigou a influência do plasma rico em plaquetas (PRP) e cola de fibrina (CF) na atividade funcional das células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de cabras (cCTM-MOs) que se diferenciam em linhagens osteogênicas. Desta maneira, PRP e CF foram separadamente aplicadas na superfície de cerâmicas bioativas, como hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita recoberta por sílica (HASi), e, nestes biomateriais, as cCTM-MOs

foram sedimentadas e induzidas a se diferenciarem na linhagem osteogênica durante 28 dias. Após este período, as células foram analisadas em relação à sua viabilidade, morfologia, proliferação, ciclo celular e diferenciação (atividade de fosfatase alcalina – ALP e análise de PCR em tempo real dos genes da ALP, osteocalcina e osteopontina). Observou-se que PRP e CF favorecem a viabilidade e proliferação das cCTM-MOs. A expressão dos genes da osteopontina e osteocalcina foi aumentada significativamente em ambos arcabouços testados, porém PRP não apresentou efeitos sobre a expressão e atividade da ALP. Desta maneira, os resultados demonstraram que as cerâmicas revestidas por CF foram melhores que as revestidas por PRP e pelas matrizes sem revestimento. Entre todas, a HASi associada à CF apresentou a melhor performance, o que pode ser atribuído à conhecida ação da sílica de emanar estímulos e à matriz extracelular temporária proporcionada pela CF. Portanto, os autores concluíram que PRP ou CF em combinação à cerâmicas bioativas podem possivelmente aumentar a atividade funcional de células, o que faz com que esta nova composição seja uma promissora candidata para aplicações na engenharia tecidual (NAIR, *et al.*, 2009).

Em relação aos métodos de expansão celular, discutiu-se a sua padronização em uma revisão de literatura, havendo o enfoque no uso de meios isentos de componentes animais. Apesar do soro fetal de bezerro (FCS) ser eficaz e ser o meio mais utilizado para expansão das CTMs, ele pode potencialmente transmitir zoonoses ou provocar reações imunológicas nos hospedeiros. Este fato leva à investigação de novas opções, como a *Platelet Lysate* humana (PLH), que é um componente sanguíneo obtido através do processamento de plaquetas, rico em fatores de crescimento naturais secretados por estas células. Esta característica faz com que a PLH seja um potencial suplemento para culturas de CTMs (LUDICONE, *et al.*, 2014). Neste estudo, os autores concluíram que a PLH é uma boa alternativa, sendo capaz de eliminar os riscos relacionados ao FCS e aumentar a capacidade proliferativa das CTMs expandidas (BERNARDO *et al.*, 2011).

Além disto, a revisão de Bernardo, *et al.* (2011) teve como objetivo investigar os riscos potenciais relacionados à expansão *ex vivo* destas células, particularmente em relação à transformação maligna. Testes para o estudo da estabilidade genética das CTMs expandidas *ex vivo* também foram analisados. À respeito do potencial de transformação maligna, os autores afirmaram que na literatura existem estudos que mostraram que a manipulação *ex vivo* de CTMs humanas e murinas podem provocar alterações em suas propriedades funcionais e biológicas, em particular após longo

período de expansão. Em adição, relataram a ocorrência de formação tumoral após injeção destas células em ratos (RUBIO, *et al.*, 2005; RØSLAND, *et al.*, 2009). Desta maneira, os autores afirmaram que é mandatória a caracterização da estabilidade genômica das células antes de sua liberação para uso clínico.

Também devido ao do risco biológico do uso do FCS para expansão *ex vivo* de CTMs, um modelo *in vitro* foi desenvolvido para testar se a PLH pode ser usada com sucesso para a propagação de CTMs humanas sedimentadas em dois tipos de biomateriais de colágeno, aprovados para uso clínico, em condições clinicamente reproduzíveis e aplicáveis, utilizando o FCS como controle. As CTMs foram isoladas da AMO de um doador adulto e foram cultivadas na presença de FCS ou PLH na mesma concentração (10%). As CTMs foram caracterizadas por citometria de fluxo e através de ensaios de diferenciação osteogênica e adipogênica, confirmados pela identificação de matriz calcificada e gotículas adipóides, respectivamente. Estas diferenciações autenticaram a multipotencialidade das CTMs. Os resultados indicaram que, em geral, a PLH foi superior ao FCS na promoção do crescimento celular, e, nos outros testes realizados, os resultados da PLH foram pelo menos similares aos do grupo controle. Desta maneira, concluiu-se que a PLH é um fator de crescimento efetivo para a expansão de CTMs humanas em escala clínica, quando associado à biomateriais já aprovados para uso em humanos (WARNKE, *et al.*, 2013).

Em modelo *in vitro*, pesquisadores (KANG, *et al.*, 2013) investigaram a proliferação e diferenciação celular de células tronco mesenquimais humanas derivadas da medula óssea (hCTM-MOs) e células endoteliais derivadas da veia umbilical humana (CEHVUs) em mono ou co-culturas, em um arcabouço composto por β -TCP. Foram monitoradas a morfologia das células, através de microscopia eletrônica e a diferenciação celular, utilizando-se o marcador celular osteogênico ALP e o angiogêncio *Platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1). Os resultados indicaram que tanto as hCTM-MOs quanto as CEHVUs se aderiram e proliferaram nos arcabouços de β -TCP. Em monocultura, as hCTM-MOs apresentaram um crescimento mais rápido após a primeira semana, porém as CEHVUs alcançaram níveis similares de proliferação após 14 dias. Além disto, o arcabouço promoveu a atividade da ALP nas duas culturas separadas e também na co-cultura, sendo que nesta a atividade da ALP foi maior do que na monocultura de hCTM-MOs. Nos períodos de 07 e 14 dias, a reação da cadeia da polimerase em tempo real indicou que a expressão dos genes *runx2* e ALP permaneceram inalteradas nas culturas de hCTM-MOs, mas a expressão

gênica da ALP aumentou significativamente nas co-culturas quando não se diferenciou a contribuição de cada tipo celular.

Os resultados demonstraram que o β -TCP suportou a aderência e proliferação dos tipos celulares estudados, tanto em culturas separadas quanto em monoculturas. Nas co-culturas, observou-se que as CEHVUs promoveram o aumento da diferenciação osteogênica inicial das hCTM-MOs (KANG, *et al.*, 2013).

4.5 ESTUDOS *IN VIVO*

4.5.1 ESTUDOS EM MODELO ANIMAL

Os experimentos em modelo animal apresentam grande importância para o meio científico, uma vez que servem como base para o desenvolvimento de vários tratamentos a serem aplicados aos seres humanos, como métodos cirúrgicos, protocolos clínicos e drogas, dentre outros. Em relação ao uso de células tronco da medula óssea para regeneração óssea na implantodontia, encontram-se disponíveis na literatura científica diversos estudos de grande relevância, que utilizaram, em modelos animais, desde o aspirado "*in natura*", até as próprias células mesenquimais isoladas e cultivadas "*in vitro*", em associação ou não à diferentes biomateriais.

4.5.1.1 USO DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

Pelegrine *et al.* (2011) avaliaram, através de análises clínicas, histológicas e histomorfométricas, o potencial de formação óssea de enxertos homólogos e autógenos associados ou não à medula óssea autógena, em um modelo de regeneração óssea guiada na calvária de coelhos. O experimento incluiu 30 coelhos adultos, divididos aleatoriamente, formando 06 grupos contendo 10 animais, e estes foram avaliados após 02 e 03 meses de cicatrização.

Foram fixados 60 cilindros de titânio nos crânios dos coelhos, e estes foram preenchidos da seguinte maneira: (A) osso autógeno; (AM) osso autógeno associado à medula óssea; (H) osso homólogo fresco congelado; (HM) osso homólogo fresco congelado associado à medula óssea; (M) medula óssea autóloga pura; (C) coágulo sanguíneo. Em seguida ao preenchimento, os cilindros foram fechados por tampas oclusivas de titânio (Figura 3).



Figura 3: (a) enxertos em posição; (b) cilindros fechados pelas tampas oclusivas. (Fonte: PELEGRINE, *et al.*, 2011)

Após 02 e 03 meses da cirurgia, os cilindros foram reabertos para medição do aumento ósseo em altura e posterior remoção de amostras para análises histológicas e histomorfométricas. Para estas avaliações, consideraram-se os seguintes fatores: neoformação óssea, presença de partículas residuais dos enxertos e presença de tecido não mineralizado.

Macroscopicamente, determinou-se que os sítios enxertados com materiais mineralizados (grupos A, AM, H e HM) apresentaram maiores índices de reconstrução óssea, quando comparados aos sítios dos grupos enxertados apenas com medula óssea ou coágulo (M e C), nos dois momentos avaliados. Entretanto, o grupo M mostrou melhores resultados do que o C, que obteve resultados nulos. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os 04 grupos nos quais foram utilizados materiais mineralizados.

Os grupos que utilizaram osso homólogo apresentaram maiores taxas de partículas residuais do que os com osso autógeno, e em todos estes grupos, uma maior quantidade de partículas foram encontradas nos terços mais superiores dos cilindros. Em relação à quantidade de tecido não mineralizado, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos A e AM. Estes dois grupos mostraram as maiores quantidades de tecido não mineralizado, seguido por HM e H. Os grupos M e C apresentaram menores taxas de tecido não mineralizado.

As técnicas de enxerto que utilizaram osso homólogo fresco congelado ou osso autógeno, associados ou não à medula óssea, em conjunto a um dispositivo que funcione como uma barreira mantenedora de espaço promoveram maior formação óssea do que o coágulo sanguíneo e a medula óssea pura. Ambos os materiais mineralizados resultaram em similares quantidades de formação óssea, tanto no aspecto macroscópico quanto microscópico. O uso de apenas a medula óssea apresentou melhores resultados em comparação ao coágulo sanguíneo, entretanto,

quando se trata de enxertos *onlay*, a associação com materiais mineralizados é necessária.

Um estudo semelhante foi desenvolvido em coelhos, porém avaliou a regeneração óssea de defeitos críticos após o uso de um substituto ósseo xenógeno particulado (Bio-Oss; Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland) enriquecido com aspirado de medula óssea. A amostra incluiu 10 animais, que foram divididos em 02 grupos de maneira randomizada. Em cada animal foram criados defeitos ósseos críticos bilaterais de mesmo diâmetro nos ossos parietais. Nos ratos do grupo controle, os defeitos dos dois lados foram preenchidos por Bio-Oss, enquanto no grupo teste, os defeitos dos dois lados foram preenchidos por Bio-Oss enriquecido por aspirado medula óssea autóloga. Nos dois grupos, apenas um defeito de cada animal foi recoberto por membrana reabsorvível (Bio-Gide; Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland). Os animais foram sacrificados após 08 semanas e realizaram-se exames histomorfométricos e tomografias computadorizadas.

As tomografias indicaram um menor defeito remanescente nas áreas que receberam recobrimento por membrana do grupo teste, quando comparadas ao grupo controle, com ou sem a utilização de membrana. As análises histomorfométricas não indicaram diferenças entre os grupos com respeito às áreas de tecido não vital mineralizado. Em relação às quantidades de tecido vital, o grupo experimental com membrana apresentou uma maior área percentual, quando comparado ao grupo controle, em ambas situações. Para as áreas não mineralizadas, o grupo experimental associado à Bio-Guide obteve menor área percentual em comparação ao controle, com ou sem membrana. Desta maneira, os autores concluíram que tanto o uso de medula óssea autóloga, quanto o uso de membrana podem contribuir para o aumento da regeneração óssea, e estas parecem apresentar uma ação sinérgica quando utilizadas associadamente (OLIVEIRA E SILVA, *et al.*, 2012).

4.5.1.2 USO DA FRAÇÃO MONONUCLEAR DA MEDULA ÓSSEA

Dallari *et al.* (2006) desenvolveram um experimento com o objetivo de se comparar o reparo em defeitos ósseos de coelhos tratados com CTM-MO, PRP e enxertos ósseos homólogos congelados e secos (FDBA) sozinhos ou em combinações entre si (CTM-MO + PRP; FDBA + CTM-MO; FDBA + PRP; FDBA + PRP + CTM-MO).

Criaram-se defeitos ósseos críticos bilaterais nos fêmures de 48 coelhos adultos. Os animais foram divididos em grupos, nos quais os defeitos dos lados direito e esquerdo foram tratados com diferentes materiais, da seguinte maneira: Grupo 1 – lado direito: CTM-MO, lado esquerdo: PRP; Grupo 2 – lado direito: FDBA + CTM-MO, lado esquerdo: FDBA + PRP; Grupo 3 – lado direito: FDBA, lado esquerdo: PRP + CTM-MO; Grupo 4 – lado direito: FDBA + PRP + CTM-MO, lado esquerdo: sem nenhum preenchimento.

As células utilizadas no experimento foram obtidas do AMO da crista íliaca dos animais, coletado antes da cirurgia. Este material foi submetido a um processamento de separação celular por gradiente de densidade. Também anteriormente ao procedimento, sangue periférico arterial foi coletado para a obtenção do PRP.

Avaliações histológicas e histomorfométricas foram realizadas após 02, 04 e 12 semanas do procedimento. Calculou-se uma taxa de regeneração através da medição da área residual do defeito ósseo e a arquitetura do novo osso formado foi comparada com a original.

Em todos os momentos avaliados, a taxa de regeneração óssea foi maior nos grupos PRP + CTM-MO, FDBA + PRP, FDBA + CTM-MO e FDBA + PRP + CTM-MO, e os menores valores foram alcançados com PRP. Em 02 semanas, a maior taxa de regeneração tecidual foi alcançada pelo tratamento com FDBA + PRP + CTM-MO, apresentando diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos grupos PRP e CTM-MO. Após 04 semanas, a taxa de regeneração óssea aumentou em todos os grupos experimentais, com exceção do PRP. Finalmente, as avaliações após 12 semanas indicaram que as taxas de formação óssea em FDBA + PRP, FDBA + CTM-MO e FDBA + PRP + CTM-MO foram significativamente maiores que em PRP. Neste mesmo período de avaliação, diferenças significativas continuaram presentes entre os grupos PRP, CTM-MO, FDBA e osso nativo. Estes resultados indicaram que a combinação de osso homólogo fresco e congelado, células mesenquimais da medula óssea e plasma rico em plaquetas permite a aceleração dos processos de regeneração e remodelação ósseos.

Pelegrine *et al.* (2013) compararam a regeneração óssea obtida após o uso de: (1) enxerto xenógeno enriquecido por aspirado de medula óssea, (2) enxerto xenógeno enriquecido pela fração mononuclear da medula óssea (Figura 4) e (3) enxerto xenógeno sem associação à outro material. A amostra incluiu 21 coelhos, nos quais foram criados 02 defeitos ósseos críticos nos ossos parietais de cada animal, e estes foram distribuídos de maneira randomizada em três grupos de 06 animais (Grupos 1, 2

e controle), e um grupo de 03 animais (grupo sem preenchimento). Nos grupos 1, 2 e controle, os defeitos foram preenchidos com os seguintes materiais: grupo 1 – osso xenógeno (Bio-Oss) associado ao aspirado de medula óssea fresca; grupo 2 – osso xenógeno associado à fração mononuclear da medula óssea; e grupo controle – apenas osso xenógeno. Nestes grupos, um dos dois defeitos de cada animal foi aleatoriamente recoberto por membrana. Nos três animais remanescentes, os defeitos foram mantidos sem preenchimento. Após 8 meses, obtiveram-se amostras para as análises.

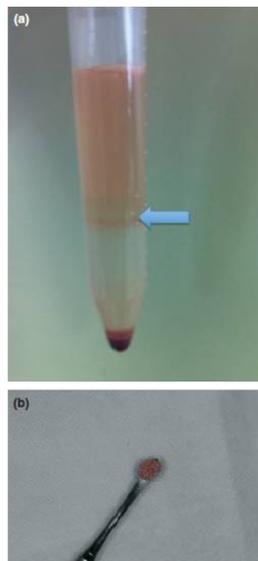


Figura 4: tubo de propileno após centrifugação do gradiente de densidade. (a) Notar fração mononuclear (seta); (b) Fração mononuclear da medula óssea misturada ao Bio-Oss. (Fonte: PELEGRINE, *et al.*, 2013)

Os defeitos do grupo sem preenchimento não apresentaram formação óssea. Os sítios que foram recobertos por membrana mostraram melhores resultados em relação à regeneração óssea. O grupo 2 apresentou o maior percentual de tecido vital mineralizado, sendo $28.17 \pm 3.19\%$ para os defeitos recobertos por membrana e $21.12 \pm 0.55\%$ para os sem membrana, seguido pelo grupo 1, que mostrou os percentuais de $21.14 \pm 7.37\%$ e $12.45 \pm 6.33\%$, para os sítios com e sem membrana, respectivamente. O osso nativo apresentou taxas de $65.31 \pm 4.43\%$ de osso vital mineralizado. O grupo 2 também teve o menor percentual de tecido não mineralizado, e o menor índice de reabsorção, possuindo a maior quantidade de partículas de biomaterial remanescentes. Neste aspecto, não houve diferenças estatísticas entre os grupos 1 e controle.

Portanto, concluiu-se que a associação do aspirado de medula óssea fresca e especialmente da fração mononuclear da medula óssea ao osso xenógeno,

preferencialmente com o uso de membrana, contribuíram ao aumento da regeneração óssea. Entretanto, o nível de tecido mineralizado do osso nativo não foi alcançado após 08 semanas de pós-operatório em coelhos.

4.5.1.3 EXPERIMENTOS COM ISOLAMENTO E CULTIVO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS PROVENIENTES DA MEDULA ÓSSEA

Com o objetivo de testar a habilidade das CTMs em regenerar tecido ósseo, CTMs foram carregadas em cilindros porosos de hidroxiapatita/tricálcio fosfato (HA/TCP) e implantados em defeitos ósseos segmentais de 08 mm em fêmures de ratos adultos. Para comparação, alguns defeitos foram mantidos sem preenchimento, e outros foram enxertados com o mesmo biomaterial associado à suspensão celular da medula óssea fresca ou em sua forma pura. O efeito de regeneração foi avaliado em 04 e 08 semanas através de radiografias e análises histológicas e histomorfométricas.

Os defeitos que não receberam enxertos, e aqueles que foram preenchidos por apenas HA/TCP, ou HA/TCP associado à medula óssea fresca falharam na cicatrização após 08 semanas. Em contrapartida, os defeitos enxertados por HA/TCP associado às CTMs mostraram significativamente maior formação óssea em 04 semanas, e foram completamente preenchidos após 08 semanas, havendo excelente união com o osso nativo. As análises histomorfométricas indicaram que o preenchimento ósseo no grupo HA/TCP associado à CTMs (43%) foi maior que o obtido pela associação de HA/TCP com a MO (19%) ou por apenas HA/TCP (10%), e que estas diferenças foram estatisticamente significativas (KADIYALA, *et al.*, 1997).

Mankani *et al.* (2007) demonstraram, através de um estudo em modelo animal, que transplantes de CTMs-MO são capazes de formar tecido ósseo maduro quando injetadas como suspensões celulares com uma matriz particulada. CTMs-MO humanas associadas a partículas de HA/TCP foram inseridas ou no espaço subcutâneo dorsal ou subperiostealmente na calvária de ratos imunodeficientes, totalizando 43 transplantes. Foram utilizadas duas vias de implantação, a injetável e a cirúrgica, e as áreas que receberam os enxertos pela via injetável foram incluídas no grupo experimental, enquanto as áreas acessadas por extensa exposição cirúrgica foram incluídas no grupo controle. Após 07 a 110 semanas, foram removidas amostras para análises histológicas, de propriedades mecânicas e de sua origem celular.

A extensão da neoformação óssea e hematopoiese, a aderência ao osso nativo da calvária, e a dureza e o módulo de elasticidade das amostras foram comparáveis entre os dois grupos. A hibridização *in situ* confirmou a origem humana do novo osso formado. Diante destes resultados, os autores concluíram que as CTMs-MO associadas a partículas de HA/TCP injetadas em suspensão podem formar tecido ósseo maduro que apresentem propriedades mecânicas e histológicas similares ao osso formado através de procedimentos cirúrgicos padrões. Assim, abrem-se possibilidades para se acessar a capacidade osteogênica de populações celulares, controlar a formação e reparação óssea e tratar deficiências ósseas, todas em intervenções minimamente invasivas.

Jafarian *et al.* (2008) compararam a regeneração óssea alveolar baseada em CTMs-MO associada a dois tipos de biomateriais, em um modelo de defeitos alveolares de espessura total em cachorros. As células foram isoladas do AMO, cultivadas e expandidas através de 03 sucessivas subculturas. O potencial de diferenciação em osteoblastos foi testado e confirmado *in vitro* antes do transplante celular. As células indiferenciadas foram incubadas com matrizes de HA/TCP recobertas por colágeno bovino tipo I purificado, e de Bio-Oss, e estes biomateriais associados ou não às células (HA/TCP/CTM-MO; HA/TCP; Bio-Oss/CTM-MO; Bio-oss) foram implantados intramuscularmente nos masseteres de 04 animais e também em defeitos ósseos criados nas suas mandíbulas. Estes procedimentos tiveram o objetivo de avaliar a formação ectópica de osso nas regiões intramusculares abordadas e nos defeitos ósseos críticos, que envolviam as duas corticais.

Após 06 semanas dos enxertos, os animais foram sacrificados e coletaram-se amostras para análises. As avaliações por microscopia eletrônica de amostras representativas indicaram que nas matrizes de HA/TCP ocorreu maior aderência celular e melhor distribuição das células. As análises histológicas das amostras inseridas nos músculos indicaram a presença de tecido ósseo trabecular, com osteócitos e osteoblastos regularmente distribuídos, além de matriz calcificada amorfa e cápsula fibrosa, indicando atividade de formação óssea. Os percentuais de novo osso foram de 29.12% nos enxertos de HA/TCP/CTM-MO e 28.18% nos de Bio-Oss/CTM-MO, enquanto nos grupos controle com as matrizes sem adição de células os valores foram de 23.57% e 24.17%, respectivamente. Estes achados indicaram que há diferenças na quantidade de regeneração óssea em resposta às células, mas não houve significância estatística.

Em relação às amostras removidas das áreas dos defeitos ósseos, os tecidos neoformados consistiram em pequenos pedaços de osso mineralizado e largos espaços medulares, com células adiposas e hematopoiéticas. Camadas de células ativas cubóides tipo-osteoblastos foram observadas em todos os grupos, sendo mais facilmente encontradas nos grupos com células mesenquimais sedimentadas. Verificou-se maior contato entre tecido ósseo e biomaterial nos grupos com CTM-MOs, e a adição destas células causou uma leve tendência de aumento das trabéculas ósseas. Após 06 semanas, o percentual de neoformação óssea no grupo HA/TCP/CTM-MO foi 65.78% e no grupo controle HA/TCP, 44.90%, havendo diferenças estatisticamente significantes. Em relação ao grupo Bio-Oss/CTM-MO e seu grupo controle Bio-Oss, o valor encontrado foi 50.31% e 36.83%, respectivamente. Apesar de ter havido diferenças entre as matrizes carregadas por células mesenquimais, estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Em conclusão, este estudo demonstrou que em combinação com as CTMs, os novos substitutos ósseos bifásicos podem oferecer melhores condições para a regeneração óssea do que o tradicional biomaterial de origem bovina. Estes materiais se mantiveram nos defeitos e contribuíram para a regeneração óssea.

Lei *et al.* (2009) realizaram um experimento para avaliar a eficácia do PRP em transportar CTMs em arcabouços porosos 3D em comparação ao plasma pobre em plaquetas (PPP) e o meio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM). Paralelamente a ensaios *in vitro*, desenvolveu-se um estudo *in vivo* que baseado na análise de em defeitos ósseos na calvária de cabras enxertados por estruturas de CTMs/PLGA, com o objetivo de se detectar radiológica e histologicamente a capacidade do PRP em incrementar a regeneração óssea. Os animais foram divididos aleatoriamente grupos que receberam diferentes modalidades de tratamento (defeitos não tratados; DMEM/CTM/PLGA; PPP/CTM/PLGA; e PRP/CTM/PLGA). Os resultados demonstraram que a eficácia de sedimentação das células tronco mesenquimais do PRP foi similar ao PPP, mas os potenciais para proliferação celular *in vitro* e para a regeneração óssea *in vivo* foram maiores do que PPP e DMEM. Assim, o PRP pode potencialmente efetuar um transporte efetivo e conveniente das células aos arcabouços porosos, característica que apresenta grande valia na engenharia tecidual.

Um estudo realizado em 2013 teve como objetivo avaliar o *NanoBone* (Artoss, Rostock, Germany) como carreador para CTMs e fator de crescimento rico em plaquetas (PRGF). *Nanobone* é um compósito de hidroxiapatita nanocristalina (HA) e matriz de sílica em gel. Este biomaterial caracteriza-se por alta porosidade (60%), fornecendo grandes propriedades osteocondutivas e angiogênicas. Suas

características de biocompatibilidade e biodegradação o fazem como um potencial material substituto à enxertos autógenos para o futuro. O PRGF, assim como o PRP, é obtido através de processamentos específicos do sangue e composto por fatores indutivos autógenos. Eles apresentam altas concentrações de plaquetas e contêm diferentes fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformador (TGF- β), fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e produtos da fibrina (BEHNIA, *et al.*, 2013).

O modelo experimental baseou-se na amostra de 08 coelhos, nos quais foram criados 04 defeitos ósseos nas calvárias. Os defeitos receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 – 0.2 mg de nano-HA + 1 mL de meio de cultura; Grupo 2 – 0.2 mg de nano-HA + 1 mL de PRGF autógeno + 2 mL de meio de cultura; Grupo 3 – 0.2 mg nano-HA + 2 mL de meio de cultura contendo 100,000 CTMs autógenas; Grupo 4 – 0.2 mg nano-HA + 2 mL de meio de cultura contendo 100,000 CTMs autógenas + 1mL de PRGF autógeno. Análises histomorfométricas realizadas após 06 e 12 meses demonstraram formação óssea significativamente maior no grupo 4 (29.45% e 44.55%, respectivamente). Nos grupos 1, 2 e 3, os percentuais de formação óssea encontrados nos dois períodos avaliados foram, respectivamente: 11.35% e 32.53%, 29.10% e 39.74%, 25.82% e 39.11%. Portanto, os autores concluíram que *Nanobone* associado a CTMs e PRGF aparentemente formam uma efetiva combinação para a regeneração óssea no modelo estudado (BEHNIA, *et al.*, 2013).

O PRP é uma excelente matriz para a indução da osteogênese, e possui muitos fatores de crescimento e proteínas de matriz extracelular, além de auxiliar na proliferação de CTMs indiferenciadas e de osteoblastos, acelerar os processos de quimiotaxia e estimular a deposição de colágeno e a angiogênese (YAMADA *et al.*, 2004). Vários estudos avaliaram técnicas que associam as CTMs à agregados plaquetários (YAMADA *et al.*, 2004 A; YAMADA *et al.*, 2004 B; ITO, *et al.*, 2005; OHYA, *et al.*, 2005; HWANG, *et al.*, 2010).

Mantendo o objetivo principal da engenharia tecidual, que é se regenerar defeitos ósseos significativos através de procedimentos minimamente invasivos, Yamada *et al.* (2004 A) desenvolveram um experimento para avaliar a formação óssea obtida pela combinação entre PRP e CTMs expandidas *in vitro*. Dentes da arcada inferior de cães foram extraídos, aguardaram-se dois meses pós-extração e defeitos ósseos bilaterais foram realizados com uma broca trefina. Os defeitos foram enxertados da seguinte maneira: PRP; CTMs caninas (dCTMs) e PRP; osso autógeno particulado (OAP); e grupo controle (apenas o defeito).

Os tecidos neoformados foram avaliados por radiografias, histologia e histomorfometria, após 02, 04 e 08 semanas. De acordo com as observações histológicas, o grupo dCTMs/PRP apresentou um tecido osso maduro mais bem estruturado e maior neovascularização, quando comparado com os outros grupos nos períodos após 02 e 04 semanas. Em relação aos achados das análises histomorfométricas, após 08 semanas, as áreas de neoformação representavam $18.3 \pm 4.84\%$ das amostras do grupo controle, $29.2 \pm 5.47\%$ do grupo PRP, $61.4 \pm 3.38\%$ do grupo OAP e $67.3 \pm 2.06\%$ do grupo dCTMs/PRP. As diferenças entre OAP, dCTMs/PRP e grupo controle foram estatisticamente significativas. Desta maneira, estes resultados demonstraram que a associação de células tronco mesenquimais expandidas *in vitro* ao PRP é útil como um substituto ósseo osteogênico.

O mesmo grupo de pesquisadores realizou um estudo em modelo similar ao anterior, porém com o objetivo de investigar a correlação entre a osseointegração de implantes dentais e osso injetável ("*injectable tissue-engineered bone*"), utilizando CTMs e PRP. Após 01 mês da extração de dentes inferiores de cães, criaram-se defeitos ósseos bilaterais, que foram enxertados da mesma maneira: PRP; dCTMs/PRP; OAP; e grupo controle (apenas o defeito).

Após dois meses, coletaram-se amostras para avaliação histológica e, no mesmo momento, instalaram-se implantes. Novamente após dois meses, os animais foram sacrificados e outras amostras foram avaliadas histológica e histomorfometricamente. De acordo com as observações histológicas, o grupo dCTMs/PRP apresentou tecido ósseo maduro e neovascularizado, em comparação aos grupos controle e PRP, assim como o grupo de osso autógeno. Observou-se um nível ósseo marginal mais alto ao redor dos implantes instalados nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Além disto, os valores descrevendo a quantidade de contato osso – implante (BIC) foram significativamente maiores nos grupos PRP, OAP, dCTMs/PRP em relação ao grupo controle, sendo que os maiores valores encontrados foram no grupo dCTMs/PRP. Também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre dCTMs/PRP e grupo controle no que se refere à densidade óssea. As análises deste experimento indicaram que a associação de CTMs ao PRP gera em bons resultados, e estes são comparáveis aos alcançados por enxertos autógenos (YAMADA *et al.*, 2004 B).

Também investigando a relação entre CTMs e PRP, um estudo realizado em 2005 avaliou a resistência mecânica baseada em achados histológicos de tecidos ósseos produzidos por este método de engenharia tecidual. Em um modelo experimental

similar a YAMADA, *et al.* (2004 A) , foram analisadas amostras de defeitos ósseos preenchidos pelos mesmos biomateriais, e também por Bio-Oss, da seguinte maneira: 1 – PRP; 2 – PRP/dCTMs; 3 – osso autógeno; 4 – Bio-Oss; 5 – grupo controle (apenas o defeito). Após 2, 4, 8 e 12 semanas as amostras foram analisadas histologicamente com o objetivo de se avaliarem suas propriedades mecânicas. De acordo com as observações histológicas, o grupo dCTMs/PRP apresentou um tecido ósseo maduro em comparação aos grupos controle, Bio-Oss e PRP. O valores encontrados pelo teste de dureza de Vickers foram: grupo controle - 8, PRP - 9, osso autógeno – 11, dCTMs/PRP – 17, e Bio-Oss: não foi detectado. Desta maneira, os autores concluíram que, do ponto de vista histológico e mecânico, a engenharia tecidual pode ser utilizada para os estágios iniciais de regeneração óssea (ITO, *et al.*, 2005).

Ohya *et al.* (2005) compararam a habilidade de regeneração óssea entre a combinação de CTMs e PRP e o promissor método que associa osso autógeno particulado ao PRP, em levantamentos de soalho de seio maxilares. O grupo amostral compreendeu 18 ratos, que foram submetidos à enxertos bilaterais nos seios maxilares, em modelo de boca dividida. Os animais foram sacrificados após 2, 4 e 8 semanas, e as amostras das áreas enxertadas foram analisadas histológica e histomorfometricamente. Os achados histológicos indicaram que ambos os lados (CTMs/PRP e OAP/PRP) mostraram boa neoformação óssea e neovascularização nos períodos de 2 e 4 semanas. Após 8 semanas, observou-se formação de cortical óssea abaixo da membrana e na parede lateral do seio, e as trabéculas com clara estrutura lamelar foram incorporadas nos espaços medulares nos dois lados. Não houve diferenças estatisticamente significantes em relação ao volume ósseo e altura óssea entre os grupos CTMs/PRP e OAP/PRP a cada semana, mas ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre 02 e 08 semanas no dois grupos. No grupo OAP/PRP houve significativa variação do volume ósseo entre 04 e 08 semanas. Assim, sugere-se que o complexo CTMs/PRP pode ser utilizado para regeneração óssea em levantamentos de soalho de seio maxilar, e se compara à associação OAP/PRP.

Hwang *et al.* (2010) investigaram se a combinação de CTMs com PRP apresenta vantagens sobre o uso de PRP, em relação ao período de consolidação de mandíbulas submetidas à distração osteogênica. Como esta técnica requer, em média, 08 a 12 semanas para consolidação, aumenta-se o risco de complicações, como infecções, fraturas e desconforto, o que faz com que novos métodos sejam desenvolvidos, em busca de soluções que reduzam este tempo. O modelo

experimental se baseou na instalação de distratores externos bilaterais nas mandíbulas de 38 coelhos. Após os 05 dias de latência, realizou-se a distração óssea por 06 dias, totalizando 6.3 mm de abertura. PRP com ou sem CTMs foi injetado nas regiões expandidas no primeiro dia do período de consolidação. Os animais incluídos no grupo controle não receberam nenhum material nos espaços obtidos pela expansão. Os tecidos cicatriciais foram analisados histológica, radiológica e mecanicamente após 01, 02, 03 e 04 semanas de consolidação.

Em todas as semanas do período de consolidação, o grupo CTM/PRP obteve melhores resultados que o grupo PRP e o grupo controle em todos os testes realizados. Após 01 semana, o grupo CTM /PRP mostrou o melhor resultado quando comparado às outras semanas de consolidação, e a diferença entre este grupo e os outros dois diminuiu com o tempo, indicando que a terapia celular influencia na regeneração óssea nos estágios iniciais de cicatrização. Este estudo utilizou a análise de radiodensidade através de radiografias, e apesar da correlação entre a densidade mineral óssea (DMO) e radiodensidade não terem sido estudadas, considerou-se que a DMO de 70%, citada por diversos estudos como padrão de períodos de consolidação em geral, se equivaleria às taxas entre 80% e 90% da taxa de radiodensidade obtida pela razão entre novo osso e osso nativo (NO/ON). Estas análises foram realizadas considerando o período de 04 semanas como o período padrão de consolidação para coelhos. O tempo requerido para se chegar aos percentuais de 80% e 90% de NO/ON no grupo CTM/PRP foi presumido através de análises de regressão, e foi comparado com os grupos controle e PRP. Foram diminuídos 15.6 e 6.6 dias na razão de 80% e 12.4 e 5.1 dias na razão de 90%, respectivamente.

Em conclusão, a adição de CTMs em matrizes de PRP aumentou significativamente a neoformação óssea, a mineralização e as propriedades mecânicas em comparação ao uso de apenas PRP. Assim, estes resultados indicaram que tal terapia combinada é mais efetiva para a redução do período de consolidação da distração osteogênica (Hwang, *et al.*, 2010)

Honda *et al.* (2013) desenvolveram um estudo com o propósito de avaliar *in vivo* a capacidade do fator de crescimento concentrado (FCG) associado a CTMOs-MO em regenerar defeitos ósseos em críticos em calvárias de ratos. Além disso, tiveram o objetivo de regular *in vitro* a proliferação e a diferenciação osteogênica das CTMs. FCG é um biomaterial de fibrina rica em plaquetas e rica em leucócitos (L-PRF) definido como “concentrado plaquetário de segunda geração”. O FCG contém fatores

de crescimento plaquetários autógenos osteoindutivos e matriz de fibrina osteocondutiva.

No experimento *in vivo*, 27 ratos foram aleatoriamente divididos em 03 grupos, sendo que em um grupo os defeitos foram preenchidos por FCG obtido dos animais, em outro, por FCG associado às CTMs e, no último, os defeitos ósseos não receberam nenhum preenchimento, sendo considerado como grupo controle. O grupo FCG apresentou melhor regeneração óssea em comparação ao controle, e a terapia combinada de FCG e CTMs levou ao quase total reparo dos defeitos após 12 semanas do procedimento cirúrgico. No experimento *in vitro*, foi utilizada uma linhagem de células tronco mesenquimais humanas, pois os autores acreditaram que o uso de estabelecida linhagem celular poderia produzir resultados experimentais mais estáveis, mesmo tendo sido necessária a utilização de FCG preparado de diferentes voluntários humanos. A fração líquida obtida do FCG promoveu proliferação, maturação osteogênica e mineralização das CTMs humanas de maneira dose dependente, mas apresentou um efeito inibitório em altas concentrações. Desta maneira, concluiu-se que a fração líquida do FCG promoveu a proliferação, maturação osteogênica e mineralização das CTMs humanas *in vitro*, e a terapia combinada de FCG e CTMs resultou em uma excelente regeneração óssea *in vivo* (HONDA, *et al.*, 2013).

5.1 ESTUDOS EM HUMANOS

4.5.1.1 APLICAÇÃO CLÍNICA DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

Pelegrine *et al.* (2010) realizaram um ensaio clínico randomizado (RCT) que investigou o potencial do uso do AMO na preservação da crista óssea alveolar após extração. Os alvéolos dentários incluídos no grupo teste foram enxertados com AMO, sem associação a nenhum biomaterial, e foram comparados com os alvéolos do grupo controle, que permaneceram preenchidos por apenas coágulo. O grupo teste demonstrou melhores resultados (estatisticamente significantes) na preservação alveolar em espessura, apresentado uma perda óssea em espessura de 14,28%, em média, enquanto no grupo controle, a perda foi de 34.82% em média. A altura da crista

vestibular perdida também foi maior no grupo controle do que no teste, variando de 1.17 ± 0.26 mm (mediana 0.5) e 0.62 ± 0.51 mm (mediana 1), respectivamente. Além disto, as análises histomorfométricas mostraram quantidades similares de osso vital mineralizado nos dois grupos.

Soltan *et al.* (2007) investigaram a influência da adição de AMO a enxertos ósseos homólogos em bloco utilizados na reparação de defeitos ósseos. Uma técnica para combinação destes dois materiais foi desenvolvida, na qual foram aspirados 3 a 4 mL de MO da crista ilíaca de 5 pacientes que apresentavam atrofia severa da crista óssea alveolar. Cinco sítios receberam os blocos ósseos saturados com AMO fixados com parafusos, e após 4 meses, coletou-se tecido para análises histológicas e histomorfométricas. Dentre o período de 4 a 8 meses de cicatrização, todos os enxertos se integraram aos leitos receptores, e receberam implantes que se osteointegraram sem intercorrências. As análises histológicas confirmaram adequada integração dos enxertos, apresentando 89% de osso vital. Portanto, os autores concluíram que a adição do aspirado aos blocos ósseos homólogos é favorável à formação novo osso no organismo.

Um estudo similar realizado em 2011 avaliou a eficácia de enxertos homólogos em blocos impregnados com medula óssea autóloga na terapia de aumento alveolar em espessura. Foram selecionados 10 pacientes com necessidade de aumento ósseo horizontal na região anterior da maxila, e estes foram randomizados em dois grupos. No grupo teste, os pacientes receberam blocos homólogos impregnados com AMO, e no controle, blocos homólogos puros. Através de exames de tomografia computadorizada realizados no pré-operatório e após 06 meses do procedimento, avaliou-se o ganho ósseo. Antes da instalação dos implantes, biópsias ósseas foram removidas e preparadas para análises histológicas e histomorfométricas.

O grupo experimental mostrou melhores resultados tomográficos no aumento da espessura alveolar, com $4,60 \pm 1,43$ mm ($118,23 \pm 56,93$ %), comparado com o grupo controle, que obteve $2,15 \pm 0,47$ mm ($49,91 \pm 20,24$ %). Apesar dos diferentes resultados no ganho alveolar em espessura entre os grupos, todos os sítios receberam implantes dentários. A análise histomorfométrica também mostrou melhores resultados ($P < 0,05$) na quantidade de osso mineralizado vital no grupo experimental, com $60,7 \pm 16,18$ %, comparado ao grupo controle, que teve $41,44 \pm 12,50$ %. Estes achados sugerem que o aspirado de medula óssea autóloga pode incrementar potencial regenerativo do enxerto com bloco córtico-medular de osso homólogo (COSTA, *et al.*, 2011).

4.5.1.2 APLICAÇÃO CLÍNICA DO CONCENTRADO DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

Sauerbier *et al.* (2011) realizaram um RCT com o objetivo de avaliar o potencial de substituição do osso autógeno pelo concentrado de medula óssea, obtido pelo processamento no sistema BMAC (Bone Marrow Aspirate Concentrate; Haverst Technologies Corp. Suite 10040 Grissom Road Plymouth, MA, USA). Foram testados osso autógeno e BMAC em combinação a osso bovino mineral para a habilidade de formação de novo osso. Realizou-se um ensaio clínico e histológico randomizado, multicêntrico e controlado. O potencial de formação óssea BMAC foi avaliado histomorfometricamente, após um período curto de cicatrização (3 a 4 meses), em procedimentos de levantamento de soalho de seio maxilar (LSSM). Como parâmetros de avaliação, listaram-se a formação de novo osso como parâmetro primário e volume do aumento ósseo e altura óssea como secundários. As CTMs obtidas do BMAC foram submetidas a uma prova de multipotencialidade, na qual elas foram diferenciadas em três linhagens e se testou sua habilidade em se diferenciar nos fenótipos condrogênicos, adipogênicos e osteogênicos. Foram incluídos 26 pacientes, com um total de 45 seios maxilares. No grupo teste foram incluídos 34 sítios, de 25 pacientes, que foram enxertados com a associação de Bio-Oss e BMAC, enquanto no grupo controle utilizou-se a mistura padronizada de osso autógeno e biomaterial, na proporção de 30% e 70%, respectivamente, em 34 seios maxilares. Desta maneira, um total de 10 pacientes receberam o tratamento no modelo de boca dividida.

Em 39 amostras, incluindo 28 do grupo teste e 11 do controle, o volume ósseo foi determinado radiograficamente. O ganho ósseo e a manutenção da altura deste aumento foram estatisticamente maiores no grupo teste. As análises histológicas foram similares nos dois grupos, mostrando ausência de sinais de inflamação, lamelas ósseas de osso neoformado contendo lacunas com osteócitos, osso neoformado conectando as partículas de biomaterial e estabilizando o complexo do enxerto. Observou-se também novo osso nos macroporos do biomaterial, e presença de vasos sanguíneos. Todas as espécimes mostraram principalmente osso reticular, com regiões de maturação óssea e estrutura parcialmente lamelar. As análises histomorfométricas demonstraram que não houve diferenças estatisticamente

significativas em relação à neoformação óssea, e a prova de multipotencialidade confirmou a multipotencialidade das células e as comprovou como CTMs.

Em vista destes resultados, os autores concluíram que a associação de BMAC ao Bio-oss pode promover regeneração óssea em quantidade equivalente à mistura de osso autógeno com tal biomaterial, mesmo após curto período de cicatrização, e que a composição de enxerto testada pode compensar completamente o conhecido benefício da utilização de osso autógeno na formação óssea inicial. Portanto, apresentaram esta composição como uma nova opção de tratamento, que incluiria praticamente toda a conveniência do uso de apenas biomateriais, com praticamente a mesma potência do osso autógeno (SAUERBIER, *et al.*, 2011).

Em outro RCT com metodologia bastante similar, Rickert, *et al.* (2011) avaliaram a formação óssea após LSSMs em 12 pacientes, realizados com Bio-Oss associado a BMAC no grupo teste e Bio-Oss misturado à osso autógeno no grupo controle. Os implantes foram instalados nas áreas enxertadas 03 a 04 meses após o primeiro procedimento cirúrgico, momento no qual foram removidos tecidos para biópsia. O principal ponto de avaliação foi o percentual de neoformação óssea após 03 meses. Os autores concluíram que CTMs-MO associadas à Bio-Oss podem induzir a formação de um volume suficiente de osso que proporcione a instalação de implantes de maneira confiável, em um período de tempo comparável com o necessário quando se utiliza somente Bio-Oss ou Bio-Oss misturado à osso autógeno. Esta técnica poderia ser uma alternativa aos enxertos autógenos, em particular por excluir a inerente morbidade do sítio doador (RICKERT, *et al.*, 2011).

Um RCT, publicado em 2013, foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da adição de AMO e BMAC ao Bio-Oss sobre a estabilidade volumétrica de enxertos em seios maxilares durante 06 meses. A hipótese foi de que ambos teriam influência positiva na estabilidade destes enxertos. O estudo compreendeu 13 pacientes com necessidade de LSSM bilateral, e baseou-se na análise de exames tomográficos, que foram realizados em três momentos: Inicial, dentro de 02 semanas após o procedimento (SCAN I) e após 06 meses, antes da instalação dos implantes (SCAN II). Os pacientes foram divididos de forma randomizada em dois grupos, e nestes seguiu-se o modelo de boca dividida. O grupo A incluiu 06 pacientes, que receberam, no lado controle, apenas enxerto com Bio-oss, e no lado teste, 08 mL AMO da tíbia associado a Bio-Oss. Já o grupo B abrangeu 07 pacientes, que receberam no lado controle, apenas Bio-Oss, e no lado teste, a associação de 03 mL BMAC da crista ilíaca com Bio-Oss.

Após 06 meses de cicatrização, volumes dos enxertos diminuíram em comparação aos volumes iniciais medidos pela SCAN I, sendo que a diminuição média dos volumes variou entre 0.46 mL para Bio-Oss+BMAC e 0.71 ml para Bio-Oss+AMO. As diminuições de volume foram significativas para todos os grupos (grupo A: $P = 0.028$; grupo B: $P = 0.018$). Comparando-se os dois enxertos em cada grupo, nenhuma diferença significativa na diminuição em volume foi evidente. (grupo A: $P = 0.950$; grupo B: $P = 0.318$). Uma análise das diferenças percentuais médias mostrou apenas pequenas variações entre os dois grupos, com valores variando de 15.2% a 21.5% de volume diminuído, e estas diferenças entre os dois grupos nos dois períodos não foram significativas, (grupo A $t1/t2$: $P = 0.600/P = 0.249$; grupo B $t1/t2$: $P = 0.735/P = 0.990$). Desta maneira, os autores concluíram que o volume de diferentes enxertos em seios maxilares diminui no período de seis meses, mas nem o AMO nem o BMAC podem impactar significativamente na diferença volumétrica (KUHL, *et al.*, 2013).

4.5.1.3 APLICAÇÃO CLÍNICA DA FRAÇÃO MONONUCELAR DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

Um estudo publicado em 2007 buscou descrever uma técnica de regeneração tecidual utilizando osso homólogo de bancos de ossos em combinação à células mononucleares autólogas e PRP, e visou demonstrar seus resultados clínicos a longo e médio prazo. As células eram provenientes do aspirado de medula óssea da crista ilíaca ou do externo de pacientes adultos, e foram cultivadas em um arcabouço por 24 horas para confirmação de sua capacidade e aderência ao arcabouço.

A amostra incluiu 32 indivíduos que necessitavam de enxertos ósseos em regiões da maxila, e os pacientes foram submetidos a tomografias computadorizadas realizadas no pré-operatório e após 8 meses da cirurgia. Os resultados em relação à osseointegração e quantidade óssea suficiente para a instalação de implantes demonstraram uma taxa de 94.7% de sucesso, e as análises histológicas indicaram linhas de formações ósseas e presença de osteoblastos ao redor de trabéculas ósseas. No acompanhamento pós-operatório de 02 a 04 anos, todos os implantes estavam em função e praticamente sem perda óssea.

Portanto, os autores concluíram que a grande vantagem da utilização da fração mononuclear composta por CTMs adicionada a precursores hematopoiéticos e fatores

de crescimento é a promoção de adequada cicatrização e integração dos enxertos. Assim, sugerem que no futuro as pesquisas deveriam se direcionar à expansão *in vitro* das células mononucleares da MO autóloga para posterior aplicação destas células nos pacientes em maiores concentrações (FILHO-CERRUTI, *et al.*, 2007).

4.5.1.4 APLICAÇÃO CLÍNICA DO ISOLAMENTO E CULTIVO DO ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA

A engenharia tecidual pelo transplante de células autólogas é um dos conceitos terapêuticos mais promissores que vem sendo desenvolvidos, uma vez que pode solucionar problemas como a morbidade dos sítios doadores em enxertos autógenos, imunogeneidade de enxertos homólogos e o insucesso de enxertos sintéticos. Com o objetivo de abolir estes problemas, um grupo de pesquisadores desenvolveu uma nova tecnologia denominada osso injetável, que envolve a morfogênese de um novo tecido através do uso de estruturas formadas por células autógenas isoladas, arcabouços biocompatíveis e fatores de crescimento (YAMADA, *et al.*, 2004 A; YAMADA, *et al.*, 2004 B; YAMADA, *et al.*, 2008; YAMADA, *et al.*, 2011). Uma das vantagens desta modalidade de terapia celular é o uso de células autógenas para regeneração óssea.

YAMADA, *et al.* (2008) avaliaram clinicamente o uso de osso injetável (“*injectable tissue-engineered bone*”) para levantamento de soalho de seio maxilar com instalação simultânea de implantes. A avaliação considerou o sucesso dos implantes e o estado do osso regenerado. Este ensaio clínico incluiu 16 seios maxilares de 12 pacientes, e o isolamento das CTMs-MO foi realizado a partir do AMO da crista ilíaca posterior, coletado 1 mês e meio antes do procedimento cirúrgico, de acordo com o método de Pittenger *et al.* (1999). Já o PRP foi preparado com um dia de antecedência, e, no dia da cirurgia, foi misturado em uma seringa com as células isoladas, cloreto de cálcio e trombina, para a produção do osso injetável (Figura 5).



Figura 5: preparação do osso injetável. (a) Procedimento de mistura dos componentes; (b) Forma de aplicação clínica. (Fonte: YAMADA, *et al.*, 2008).

A avaliação do osso regenerado foi realizada através das comparações da altura inicial do osso residual medida na radiografia panorâmica (confirmada no momento cirúrgico) com as radiografias pós-operatórias em 3, 6, 12 e 24 meses após, utilizando o comprimento dos implantes como referência. No segundo estágio cirúrgico foram removidas amostras para biópsia.

O potencial multipotente das células foi caracterizado pela diferenciação osteogênica (atividade da ALP e deposição de cálcio), e as taxas de sobrevivência e sucesso cumulativo dos implantes foi de 100%. Os exames tomográficos mostraram densa mineralização do tecido ao redor dos implantes, sendo difícil a delimitação da borda antiga do osso. Não se observou nenhuma reabsorção ou complicação no período pós-cirúrgico de 2 a 6 anos. (YAMADA *et al.*, 2008)

O mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu outro estudo clínico em 2011, que teve como objetivo avaliar os efeitos do osso injetável em levantamentos de soalho de seio maxilar pela técnica atraumática (por osteótomos), havendo instalação simultânea de implantes, em pacientes com reabsorção severa da crista óssea alveolar maxilar (Figura 6). A coleta e isolamento celular foram realizados da mesma maneira que YAMADA *et al.* (2008), assim como a produção do PRP. Os leitos cirúrgicos preparados de acordo com a técnica de Summers, *et al.* (1994) foram preenchidos por osso injetável anteriormente à instalação dos implantes, e o novo tecido mineralizado foi avaliado por radiografias e tomografias computadorizadas.

A altura óssea vertical medida no pré-operatório foi de 7.3 ± 1.4 mm. Os resultados finais indicaram que esta altura apresentou um aumento de 6.1 ± 1.5 mm. Além disto, a média da altura alveolar após 03 e 06 meses foi de 15.6 ± 1.5 (mediana 15.5) e 15.1 ± 1.4 (mediana 15.5), respectivamente, e foram estatisticamente significantes em comparação a altura óssea inicial. No período avaliado, a altura óssea se manteve. Em relação à média de osso regenerado, após 03 meses esta foi de 8.2 ± 1.6 mm, e após 6 meses, 8.0 ± 1.4 mm: 8.1 ± 1.3 mm no lado mesial e 7.9 ± 1.5 mm no distal.

Portanto, o estudo mostrou que um ganho ósseo suficiente para a instalação de implantes foi conseguido pela técnica atraumática de LSSM associada ao osso injetável. O tecido ósseo neoformado não foi reabsorvido no período de 06 meses. A mineralização óssea aumentou rapidamente em 03 meses, indicando que pode ser possível alcançar uma regeneração óssea precoce em curto período de cicatrização (YAMADA, *et al.*, 2011).

Uma revisão sistemática de literatura teve como objetivo investigar as evidências científicas disponíveis à respeito das características e da efetividade clínica de procedimentos de regeneração óssea alveolar baseados na terapia celular, comparados à métodos convencionais já conhecidos, em humanos adultos. Para a pesquisa bibliográfica, não houve distinção entre as fontes das CTMs. Estudos observacionais e experimentais em adultos que relataram resultados de procedimentos de regeneração óssea por terapia celular ou engenharia tecidual, realizados separadamente ou em comparação à métodos convencionais, foram incluídos. Como resultados primários, consideraram-se as análises histomorfométricas de neoformação óssea. A efetividade das técnicas baseadas na terapia celular foi avaliada de acordo com os resultados encontrados pelos estudos controlados.

Um total de 27 estudos foram identificados. Destes, 15 incluíam um grupo controle (8 RCTs), e foram considerados a possuir de moderado a alto risco de viés. A maioria dos estudos relataram o uso da combinação de CTMs com um arcabouço osteocondutivo. Medula óssea e periósteo mandibular foram frequentemente relatados como fontes de CTMs. As culturas *in vitro* levaram entre 12 dias a um mês e meio. Uma série de arcabouços foram identificados, sendo autógenos, homólogos, xenógenos e aloplástico. O uso de osso bovino mineral foi frequentemente relatado a alcançar resultados favoráveis, enquanto o PLGA foi associado à falhas em três estudos. A combinação entre Bio-Oss e CTMs obteve resultados similares à associação de osso autógeno e Bio-Oss. Três RCTs e um relato de caso controlado relataram formação óssea significativamente maior em sítios que foram enxertados com terapia celular, quando comparados aos sítios tratados convencionalmente, após 3 a 8 meses.

Assim, baseado nas limitadas evidências científicas existentes, em um risco moderado a alto de viés, procedimentos baseados em células são comparáveis, ou até superiores, às terapias convencionais, com a significativa vantagem de evitar a remoção de tecido ósseo autógeno. Novos ensaios clínicos deveriam avaliar os

resultados em relação às características envolvendo cada paciente e a relação entre tempo e custo destes métodos (SHANBHAG E SHANBHAG, 2013).

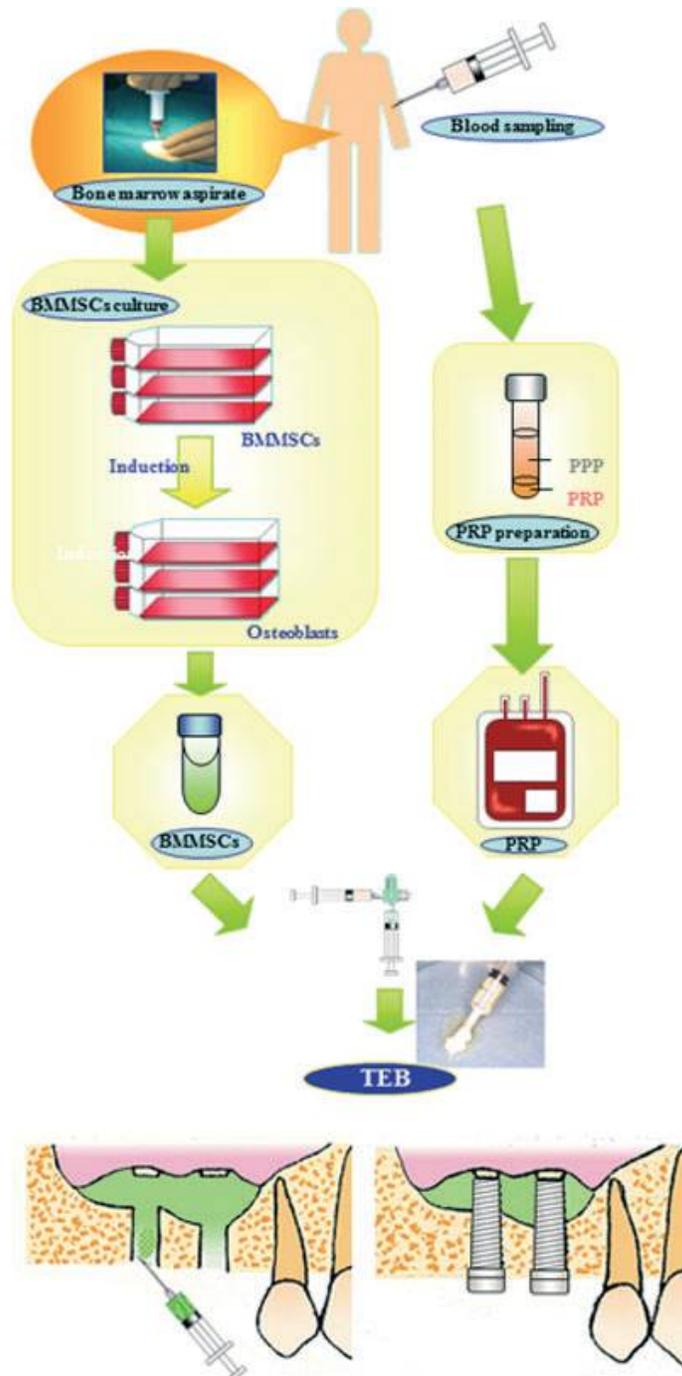


Figura 6: Esquema do protocolo de aplicação clínica do osso injetável. (Fonte: YAMADA, *et al.*, 2011)

5 DISCUSSÃO

Diante da variedade de técnicas e materiais utilizados para reconstruções teciduais, o enxerto autógeno é considerado o padrão ouro. Contudo, sua utilização pode ser limitada pela disponibilidade óssea, necessidade de outra área cirúrgica e grande morbidade da área doadora (ROGERS E GREEN, 2012). Assim, técnicas alternativas são extensamente investigadas para, em grande parte, substituir satisfatoriamente o uso do osso autógeno em reconstruções alveolares. Além dos métodos que envolvem o uso de biomateriais, como osso homólogo, xenógeno e sintético (PAGNI, *et al.*, 2012), muitas pesquisas avançam no campo da engenharia tecidual (EGUSA, *et al.*, 2012).

As técnicas de engenharia tecidual buscam somar as características de um material osteocondutor à células que iniciam a osteogênese e à fatores de crescimento que estimulam estas células a se diferenciarem, seguindo a tradicional tríade da osteocondução, osteogênese, e osteoindução, propriedades intrínsecas dos enxertos autógenos (KAIGLER e MOONEY, 2001; EGUSA, *et al.*, 2012). Segundo o regulamento técnico para o funcionamento de centros de tecnologia celular de células tronco humanas publicado pela ANVISA (2010), considera-se como terapia celular a restauração da função de um órgão ou tecido através do transplante de CTs para a substituição de células perdidas por trauma ou doença específica de qualquer natureza, ou substituição de células que não funcionam adequadamente devido a um defeito genético. Assim, os procedimentos que envolvem a engenharia de tecidos e terapia celular vêm sendo identificados como “padrão platina”, por atenderem aos requisitos citados anteriormente (SOLTAN, *et al.*, 2005). Desta maneira, diversos autores investigam a associação de diferentes biomaterias à CTs submetidas ou não à processamentos de separação e cultivo celular (YAMADA, *et al.*, 2004 A; ITO, *et al.*, 2005; PELEGRINE, *et al.*, 2011; RICKERT, *et al.*, 2011) e à fatores de crescimento (BEHNIA, *et al.*, 2013).

Em relação aos arcabouços utilizados como arcabouços para a terapia celular, vários substitutos ósseos foram avaliados quanto à sua eficácia quando associados às CTMs, isoladas ou não por métodos de separação celular. Dos estudos incluídos nesta revisão, encontraram-se os seguintes biomateriais: α -TCP; β -TCP; HA/TCP, HA, PLGA, CF, Bio-Oss, osso homólogo e PRP. Em sua maioria, os resultados encontrados foram satisfatórios, indicando a possibilidade de utilização das técnicas

propostas como alternativas confiáveis para a regeneração de rebordo alveolar (RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011; KUHL, *et al.*, 2013).

Em geral, dos biomateriais existentes, o Bio-Oss é o mais amplamente utilizado, pois apresenta propriedades físicas similares ao osso medular humano, tanto em relação a estrutura morfológica quanto à composição mineral (SAUERBIER, *et al.*, 2011). Sendo assim, vários pesquisadores avaliaram técnicas de terapia celular que o utilizam como arcabouço osteocondutor, havendo a hipótese de que os resultados seriam favoráveis. Oliveira e Silva, *et al.* (2012) realizaram um experimento em modelo animal que avaliou a associação do Bio-Oss ao AMO, e encontraram resultados favoráveis à regeneração óssea. Dois estudos clínicos randomizados em humanos quem avaliaram procedimentos de levantamento de soalho de seio maxilar com Bio-Oss indicaram que sua associação ao BMAC é eficaz e pode ser considerada como alternativa aos enxertos autógenos (RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011), havendo regeneração óssea equivalente à tradicional, obtida pela mistura de osso autógeno e Bio-Oss (SAUERBIER, *et al.*, 2011). Em adição, as conclusões apresentadas pela revisão sistemática de Shanbhag e Shanbhag (2013) indicaram que uso de osso bovino mineral foi frequentemente relatado a alcançar resultados favoráveis. Entretanto, Jafarian *et al.* (2008) compararam a regeneração óssea alveolar alcançada por CTMs isoladas e incubadas associadas à Bio-Oss com a associação destas células à matriz de HA/TCP, em um modelo experimental em cachorros, e demonstraram que, em combinação com as CTMs, as partículas de HA/TCP podem oferecer melhores condições para a regeneração óssea do que o tradicional biomaterial de origem bovina.

Ainda à respeito dos biomateriais utilizados como arcabouços para as CTMs, também há grande interesse sobre os efeitos das técnicas de terapia celular sobre o osso homólogo. Apesar de existirem relatos de bons resultados decorrentes de enxertos ósseos homólogos na literatura, seu teórico potencial osteogênico e osteoindutor é bastante controverso, uma vez que, devido aos métodos de processamento do tecido, o material se torna acelular (COSTA, *et al.*, 2011). Assim, seguindo a mesma linha de raciocínio da engenharia tecidual, incrementar os blocos homólogos com CTMs apresenta-se, possivelmente, como uma boa alternativa para a regeneração óssea, sem haver a necessidade de remoção de enxerto autógeno. Dallari *et al.* (2006) desenvolveram um experimento com o objetivo de se comparar o reparo em defeitos ósseos de coelhos tratados com CTMs-MO, PRP e enxertos ósseos homólogos sozinhos ou em combinações entre si, e seus resultados indicaram que a combinação

de osso homólogo fresco e congelado, CTMs e PRP permite a aceleração dos processos de regeneração e remodelação ósseos. Outro estudo em modelo animal avaliou o potencial de formação óssea de enxertos homólogos frescos congelados e enxertos autógenos associados ou não à medula óssea autóloga. A partir de análises macroscópicas e histomorfométricas, observou-se que nos grupos em que os defeitos foram preenchidos por osso homólogo, associado ou não ao AMO, os resultados de neoformação óssea foram comparáveis com aqueles obtidos com osso autógeno associado ou não ao AMO (PELEGRINE, *et al.*, 2011). Assim, diante destes achados preliminares, é provável que a adição de células tronco aos enxertos homólogos possa beneficiar a regeneração óssea (DALLARI *et al.*, 2006; PELEGRINE, *et al.*, 2011), contudo, mais estudos são necessários para a afirmação de que esta técnica pode substituir, de maneira confiável, o enxerto ósseo autógeno.

Sabe-se que existem várias fontes de CTMs no corpo humano, entretanto, desde a primeira identificação das CTMs por Friedstein, *et al.* (1968), a medula óssea é a fonte mais utilizada pelas técnicas regenerativas com CTs (HUANG, RONTOS E SHI, 2009; CASTRO-SILVA, COUTINHO E GRANJEIRO, 2010; SHANBHAG E SHANBHAG, 2013). Com o conhecimento de que a MO é composta por diversos tipos celulares, métodos de separação celular foram desenvolvidos para otimizar os processos de reparação tecidual. Existem várias formas de se trabalhar com a MO quando se trata de regeneração óssea (SOLTAN, *et al.*, 2005), e estas, em geral, se baseiam nos seguintes métodos: aspirado da medula óssea (AMO) (OLIVEIRA E SILVA, *et al.*, 2012; KUHL, *et al.*, 2013); concentração do aspirado da medula óssea (CMO) (SAUERBIER, *et al.*, 2011; KUHL, *et al.*, 2013); fração celular mononuclear da medula óssea (FCMMO) (FILHO-CERRUTI, *et al.*, 2007); isolamento e cultura das células tronco mesenquimais adultas derivadas da medula óssea (YAMADA, *et al.*, 2011; HONDA, *et al.*, 2013). Diversas pesquisas buscam analisar a eficácia destes métodos para a reconstrução de tecidos ósseos alveolares, associando-os ou não a diferentes biomateriais.

Com o conhecimento atual sobre a multipotencialidade da medula óssea adulta e a disponibilidade de avançados substitutos ósseos, Soltan, *et al.* (2005) surgiram um novo padrão para a regeneração óssea oral, acreditando que a adição do aspirado de medula óssea a uma matriz osteocondutora pode contribuir substancialmente a eficácia dos procedimentos de regeneração óssea. De fato, experimentos realizados com o AMO, associado à biomateriais, indicaram que as novas técnicas apresentam resultados positivos (SOLTAN, *et al.*, 2006; PELEGRINE, *et al.*, 2011; OLIVEIRA E

SILVA, *et al.*, 2012; PELEGRINE, *et al.*, 2013 A). Entretanto, existem algumas importantes ressalvas que devem ser observadas para a correta execução das técnicas com AMO: não se deve aspirar mais do que 4 mL de medula óssea de apenas um sítio de aspiração, uma vez que a coleta de maiores quantidades não aumenta substancialmente o número de células osteoprogenitoras retiradas, mas sim dilui a concentração destas células com outras células mononucleadas provenientes do sangue periférico. Deve-se também haver cautela em relação à quantidade de material de enxerto, pois quando se utiliza um grande volume, é possível que ocorra o indesejável aumento da distância de difusão do oxigênio e nutrientes, podendo levar à necrose do enxerto (SOLTAN, *et al.*, 2012).

Diante da afirmação de que aumentados volumes de AMO levam à diminuição da concentração de CTMs, questionam-se os procedimentos realizados para a obtenção do concentrado de medula óssea pelo sistema BMAC, já que a técnica preconizada indica a coleta de volumes de 30 mL, 60 mL ou 120 mL para posterior centrifugação. Segundo Soltan, *et al.* (2012), para se aspirar volumes superiores a 4 mL, o mais indicado é alterar a posição da agulha dentro do espaço medular, mantendo apenas o seu ponto de entrada na cortical óssea, ou alterar o sítio de aspiração. Em adição, Soltan, *et al.* (2012), também sugeriram que o AMO não deve ser concentrado através de procedimentos de centrifugação, pois, nestes casos, ao invés de serem isoladas as células desejadas, são concentradas todas as células mononucleares, aumentando a atividade metabólica total em detrimento às CTMs. Contudo, resultados positivos são apresentados por estudos que avaliaram a eficácia do BMAC na regeneração óssea alveolar, havendo conclusões de que técnicas realizadas com BMAC associado à um arcabouço podem ser consideradas como alternativas aos enxertos autógenos (RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011). O mesmo pode ser afirmado à respeito do método de separação da fração mononuclear da medula óssea, que também envolve o processo de centrifugação, como é demonstrado pelos resultados de Pelegrine, *et al.* (2013), que compararam a reconstrução óssea por Bio-Oss associado ao AMO ou à fração mononuclear, e relataram que ambos contribuem para a regeneração, mas a fração contribui de maneira ainda maior. Desta forma, ainda não está esclarecido o real efeito dos métodos de centrifugação sobre o potencial de regeneração da medula óssea.

A despeito de a MO ser a fonte mais utilizada para a coleta de CTMs, apresentar uma técnica de aspiração relativamente simples, de baixo custo e pouca morbidade (SOLTAN, *et al.*, 2005), ainda é definida como um procedimento invasivo por alguns

autores (ARVIDSON, *et al.*, 2011). Além disto, o número de CTs presentes na MO diminui consideravelmente com a idade do indivíduo (BYDLOWSKI, *et al.*, 2009; ARVIDSON, *et al.*, 2011), e é em idades mais avançadas que geralmente as pessoas procuram procedimentos regenerativos. Estas condições fazem com que outros tecidos sejam investigados para a descoberta de fontes que tenham mais fácil acesso, como o sangue periférico, cordão umbilical, ligamento periodontal e polpa dental (ARVIDSON, *et al.*, 2011).

Como a concentração das CTMs na MO é limitada, o isolamento destas células *in vitro* e sua expansão são recomendados para se alcançar um número significativo de CTMs capazes de se diferenciarem na linhagem osteogênica (SHANBHAG E SHANBHAG, 2013). Teoricamente, este método seria ideal para se maximizar o potencial osteogênico dos enxertos, porém, vários fatores deste processo ainda são questionáveis para sua aplicação clínica. Primeiramente, ainda não foram definidos marcadores específicos para as CTMs, o que torna difícil a comparação de resultados entre os diversos grupos de pesquisa e retarda o progresso neste campo (PELEGRINE, *et al.*, 2013). Geralmente, estas células são identificadas por uma combinação de marcadores positivos e negativos (HORWITZ, *et al.*, 2005), por propriedades morfológicas, fenotípicas e funcionais (BERNARDO, *et al.*, 2011) e por provas de multipotencialidade, que utilizam como critério a diferenciação em osso, tecido adiposo e cartilagem (PITTENGER, *et al.*, 1999; HORWITZ, *et al.*, 2005). Em segundo lugar, há controvérsias em relação aos meios de expansão utilizados, uma vez que os meios mais empregados são de origem animal, como o soro fetal bovino (FCS), que podem potencialmente transmitir zoonoses ou provocar reações imunológicas nos hospedeiros. Diante disto, outros meios estão sendo desenvolvidos e testados, como a *Platelet Lysate* humana (PLH) (BERNARDO, *et al.*, 2011; WARNKE, *et al.*, 2013), que a princípio parece ser eficaz e segura para a expansão de CTs em escala clínica.

Por fim, uma importante questão à respeito do cultivo e expansão celular vem sendo discutida, que é o potencial de transformação maligna das células cultivadas. Bernardo *et al.* (2011) afirmaram, em sua revisão de literatura, que existem estudos que demonstraram que a manipulação *ex vivo* de CTMs humanas e de ratos podem provocar alterações em suas propriedades funcionais e biológicas, em particular após longo período de expansão. Além disto, relataram de ocorrência de formação tumoral após injeção destas células em ratos (RUBIO, *et al.*, 2005; RØSLAND, *et al.*, 2009). Desta maneira, os autores afirmaram que é mandatória a caracterização da

estabilidade genômica das células antes de sua liberação para uso clínico (BERNARDO, *et al.*, 2011).

Em relação à aplicabilidade clínica, as vantagens e desvantagens de cada técnica devem sempre ser levadas em consideração, para que os profissionais possam decidir qual a melhor opção para cada caso, ou seja, optar pela previsibilidade dos enxertos autógenos ou pelos benefícios decorrentes dos métodos alternativos. Uma revisão sistemática publicada em 2013 avaliou evidências científicas disponíveis à respeito da efetividade clínica e das características de procedimentos de regeneração óssea alveolar baseados em terapia celular, comparados aos métodos convencionais, em humanos adultos. A maioria dos estudos relatou o uso da combinação de CTMs com um arcabouço osteocondutivo, como autógenos, homólogos, xenógenos e aloplásticos. Assim, baseados nas limitadas evidências científicas disponíveis na literatura sobre este assunto, e em um risco moderado à alto de viés, os autores concluíram que os procedimentos baseados em células são comparáveis, ou até mesmo superiores, às terapias convencionais, com a significativa vantagem de evitarem a remoção de tecido ósseo autógeno (SHANBHAG E SHANBHAG, 2013).

Neste aspecto, um método bastante importante para avaliação de novas terapias é a comparação destes com técnicas convencionais já amplamente aceitas e comprovadas por evidências, como o enxerto ósseo autógeno e a associação deste ao Bio-Oss, para as terapias de regeneração óssea alveolar. Dos estudos incluídos na presente revisão de literatura, 07 compararam métodos de terapia celular com enxertos autógenos para a regeneração de rebordos alveolares atróficos, sendo 05 destes realizados em modelo animal (YAMADA, *et al.*, 2004 A; YAMADA, *et al.*, 2004 B; OHYA, *et al.*, 2005; ITO, *et al.*, 2005; PELEGRINE, *et al.*, 2011) e 02 RCTs (RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011). Corroborando as conclusões de Shanbhag e Shanbhag (2013), todos estes estudos, sejam em animais ou em humanos, apresentaram conclusões favoráveis à utilização das novas técnicas propostas, uma vez que, de acordo com as análises realizadas, os resultados obtidos foram comparáveis aos alcançados com enxerto ósseo autógeno (YAMADA, *et al.*, 2004 A; YAMADA, *et al.*, 2004 B; OHYA, *et al.*, 2005; ITO, *et al.*, 2005; PELEGRINE, *et al.*, 2011; RICKERT, *et al.*, 2011; SAUERBIER, *et al.*, 2011).

Assim a utilização da terapia celular parece ser uma alternativa viável para reconstruções ósseas do rebordo alveolar. A literatura científica já apresenta algumas evidências de que a utilização das células tronco mesenquimais com este objetivo é viável, porém, ainda é necessário esclarecer várias questões à respeito do cultivo das

células e o controle de sua expansão, assim como questões relacionadas ao hospedeiro, para que as técnicas possam ser empregadas com confiabilidade na clínica.

6 CONCLUSÕES

- A literatura científica apresenta evidências de que a utilização de abordagens terapêuticas com células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea é eficaz para a regeneração óssea.
- Os métodos para reconstrução alveolar envolvem ou não processamento e cultivo de células do aspirado da medula óssea, e ainda não está claro se esta prática é necessária para a aplicação clínica.
- Dentre os diferentes métodos, a presença de arcabouços osteocondutivos se apresenta como um diferencial para a regeneração, porém não está definido qual o biomaterial mais indicado para cada situação clínica.
- Ensaios clínicos randomizados bem desenhados e controlados são necessários para avaliar a eficácia das técnicas de regeneração óssea com células tronco a longo prazo e os fatores relacionados aos pacientes devem ser investigados, para que as novas abordagens possam se tornar práticas clínicas confiáveis, seguras, e reproduzíveis.

7 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta Pública n. 92, 1 dez. 2009. Minuta RDC/ANVISA. Regulamento técnico para o funcionamento de centros de tecnologia celular de células-tronco humanas [text on the Internet]. [cited 2010 Nov 17]. Available from: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B28867-1-0%5D.PDF>

Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, *et al.* Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med.* 2011;15(4):718-46.

Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, *et al.* Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral And Maxillofacial Surgery.* 2013;115(2):7-15.

Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, *et al.* Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* 2012;40:2-7.

Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, Cristantielli R, Palumbo G, Locatelli F. Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2011; 24: 73–81.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LMF, JanZ FL. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;31(Supl. 1):25-35.

Castro-Silva IL, coutinho LACR, Granjeiro JM. systematic review of use of mesenchymal stem cells in bone loss therapies. *Innov Implant J, Biomater Esthet.* 2010; 5(3):29-34.

Costa CES, Pelegrine AA, Fagundes DJ, Simoes MJ, Taha MO. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks impregnated with bone marrow aspirate: a clinical, tomographic and histomorphometric study. *General Dentistry.* 2011;59:200-205.

Dallari D, Fini M, Stagni C, *et al.* *In vivo* study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.* 200;624:877–888.

Darby I, Chen S, De Poi R. Ridge preservation: what is it and when should it be considered. *Australian Dental Journal* 2008; 53: 11–21

Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Research*. 2012;56:229–248.

Filho Cerruti H, Kerkis I, Kerkis A, Tatsui NH, Neves AC, Bueno DF, Silva MCP. Allogeneous Bone Grafts Improved by Bone Marrow Stem Cells and Platelet Growth Factors: Clinical Case Reports. *Artificial Organs*. 2007; 31(4):268–273.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 196;6(2):230-47.

Gartner LP, Hiatt JL. *Tratado de histologia em cores*. 2 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 358:948–953.

Honda H, Tamai N, Naka N, Yoshikawa H, Myoui A. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model. *J Artif Organs*. 2013;16(3):305-15.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393–5.

Huang GTJ, 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.

Hwang YJ, Choi JY. Addition of mesenchymal stem cells to the scaffold of platelet-rich plasma is beneficial for the reduction of the consolidation period in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68(5):1112-24.

Ito K, Yamada Y, Nagasaka T, Baba S, Ueda M. Osteogenic potential of injectable tissue-engineered bone: a comparison among autogenous bone, bone substitute (Bio-

oss), platelet-rich plasma, and tissue-engineered bone with respect to their mechanical properties and histological findings. *J Biomed Mater Res.* 2005; 73A: 63–72.

Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. 2008;100(5):14-24.

Kadiyala S, Jaiswal N, Bruder SP. Culture-Expanded, Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Can Regenerate a Critical-Sized Segmental Bone Defect. *Tissue Engineering.* 1997;3(2):173-185.

Kaigler D, Mooney D. Tissue Engineering's Impact on Dentistry. *Journal of Dental Education.* 2001;65(5):456-562.

Kang Y, Kim S, Fahrenholtz M, Khademhosseini A, Yang Y. Osteogenic and Angiogenic potentials of monocultured and co-cultured human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and human-umbilical-vein endothelial cells on three-dimensional porous beta-tricalcium Phosphate scaffold. *Acta Biomater.* 2013;9(1):4906-15.

Khojasteh A, Behnia H, Dasht SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70:972-982.

Kuhl S, Payer M, Kirmeier R, Wildburger A, Wegscheider W, Jakse N. The influence of bone marrow aspirates and concentrates on the early volume stability of maxillary sinus grafts with deproteinized bovine bone mineral – first results of a RCT. *Clin. Oral Impl. Res.* 2014, 25:221–225.

Leblond CP. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *Natl. Cancer Inst. Monograf.* 1964; 14: 119-150.

Lei H, Xiao R, Tang XJ, Gui L. Evaluation of the efficacy of platelet-rich plasma in delivering bmscs into 3d porous scaffolds. 2009;91(2):679-91.

Ludicone P, Fioravanti D, Bonanno G, *et al.* Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J Transl Med.* 2014; 12: 28.

Manitha B. Nair, M.Sc., H.K. Varma, Ph.D., and Annie John, Ph.D. Platelet-Rich Plasma and Fibrin Glue-Coated Bioactive Ceramics Enhance Growth and Differentiation of Goat Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering: Part A*. 2009;15(7):1619-1631.

Mankani MH, Sergei A, Kuznetsov SA, Marshall GW, Geron P. Creation of new bone by the percutaneous injection of human bone marrow stromal cell and HA/TCP suspensions. *Tissue Engineering: Part A*. 2007;14(12):1949-1958.

Oliveira e Silva M, Pelegrine A A, Alves Pinheiro da Silva, A, *et al*. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: a tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Biomater*. 2012:170520.

Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin. Oral Impl. Res*. 2005;16:622–629.

Pagni G, Kaigler D, Rasperini G, Avila-Ortiz G, Bartel R, Giannobile WV. Bone repair cells for craniofacial regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1310-9

Pelegrine AA, da Costa CES, Correa MEP, Marques JFC Jr. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin. Oral Impl. Res*. 2010; 21:535–542.

Pelegrine AA, Costa CES, Sendyk WR, Gromatzy A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank*. 2011; 12:171–184.

Pelegrine AA, Aloise AC, Costa ES. *Células tronco em implantodontia*. 1 Ed, Nova Odessa: Napoleão editora, 2013.

Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin. Oral Impl. Res*. 2013; 20: 1–6.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck CB, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craiq S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*.1999; 284:143.

Rickert D, Sauerbier S, Nagursky H, Menne D, Vissink A, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation with bovine bone mineral combined with either autogenous bone or autogenous stem cells: a prospective randomized clinical trial. *Clin. Oral Impl. Res.* 2011;22:251–258.

Rogers GF, Green AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *J Craniofac Surg.* 2012;23:323-327.

Rosland GV, Svendsen A, Torsiv A, *et al.* Long-term cultures of bone marrow derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009;69:5331-9.

Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, *et al.* Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005;65:3035-9.

Sauerbier S, Rickert D, Gutwald R, Nagursky H, *et al.* Bone marrow concentrate and bovine bone mineral for sinus floor augmentation: a controlled, randomized, single-blinded clinical and histological trial—per-protocol analysis. *Tissue Engineering: Part A.* 2010; 17(17-18):2187-2197.

Shanbhag S, Shanbhag V. Clinical applications of cell-based approaches in alveolar bone augmentation: a systematic review. *Clinical Implant Dentistry and Related Research.* 2013;*:1-18.

Silva MO, Pelegri AA, Silva AAP. Xenograft enriched with autologous bonemarrow in inlay reconstructions: a tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *International Journal of Biomaterials.* 2012;2012:1-7.

Soltan M, Smiler D, Prasad HS, Rohrer MD. Bone Block allograft Impregnated With Bone Marrow Aspirate. *Implant Dent.* 2007;16(4):329-39.

Soltan M, Smiler DG, Gailani F. A new platinum standart for Bone Grafting: autogenous Stem Cells. *Implant Dent.* 2005;14(4):322-5.

Soltan M, Smiler DG, Soltan C, Prasad HS, Rohrer MD. Theoretical model for bone graft success. *Implant Dent.* 2012;21(4):295-301.

Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, *et al.* Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A*. 2014;85(1):43-77.

Summers, R.S. A new concept in maxillary implant surgery: the osteotome technique. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*. 1994; 15: 152–160.

Thonsom JA, Marshall VS, Trojanowski JQ. Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *APMIS*. 1998; 106: 149-156.

Tokugawa Y, Kubota M, Nishimura M, *et al.* Bone regeneration of canine artificial alveolar clefts using bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells and b-tricalcium phosphate: a preliminary study. *Orthodontic waves*. 2012;71:51-58.

Warnke PH, Humpe A, Strunk D, *et al.* A clinically-feasible protocol for using human platelet lysate and mesenchymal stem cells in regenerative therapies. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013;41(2):153-61.

Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997; 385 (6619): 810-3. Erratum in: *Nature* 1997; 13:386:200.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(5):589-97.

Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Takahashi M, Hata K, Nagasaka T. Autogenous Injectable Bone for Regeneration with Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Tissue Eng*. 2004;10(5-6):955-64.

Yamada Y, Nakamura S, Ito K, Kohgo T, Hibi H, Nagasaka T, Ueda M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2–6-year follow-up. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(10):1699-707.

Yamada Y, Nakamura S, Ueda M, Ito K. Osteotome technique with injectable tissue-engineered bone and immediate implant placement by cell therapy. *Clin. Oral Imp. Res*. 2013;24:468–474.