



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Jorge Luís da Silva Pires

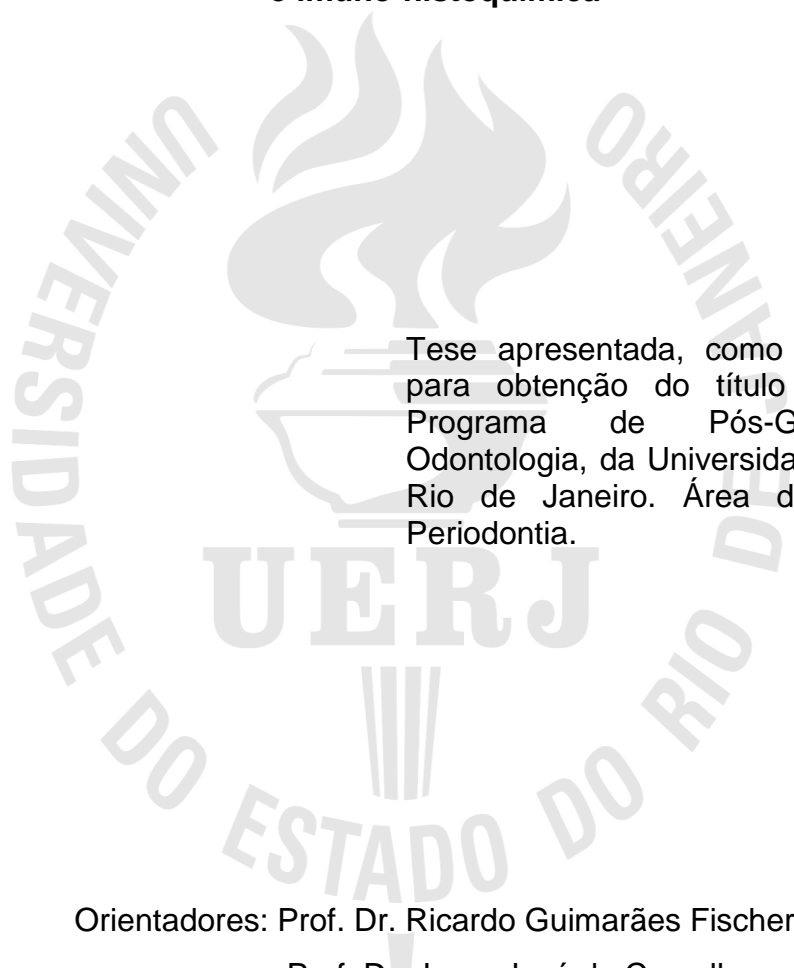
**Reparo de defeitos ósseos críticos usando hidroxiapatita sintética
ou bovina com ou sem fração mononuclear da medula óssea:
análise histomorfométrica e imuno-histoquímica**

Rio de Janeiro

2020

Jorge Luís da Silva Pires

Reparo de defeitos ósseos críticos usando hidroxiapatita sintética ou bovina com ou sem fração mononuclear da medula óssea: análise histomorfométrica e imuno-histoquímica



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

P667	<p>Pires, Jorge Luís da Silva. Reparo de defeitos ósseos críticos usando hidroxiapatita sintética ou bovina com ou sem fração mononuclear da medula óssea : análise histomorfométrica e imuno-histoquímica / Jorge Luís da Silva Pires. – 2020. 65 f.</p> <p>Orientadores: Ricardo Guimarães Fischer, Jorge José de Carvalho</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.</p> <p>1. Regeneração óssea. 2. Substitutos ósseos. 3. Células-tronco mesenquimais. 4. Aloenxertos. 5. Xenoenxertos. 6. Crânio – lesões. 7. Ratos Sprague-Dawley. I. Fischer, Ricardo Guimarães. II. Carvalho, Jorge José de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.314</p>
------	---

Bibliotecária: Adriana Caamaño CRB7/5235

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Jorge Luís da Silva Pires

Reparo de defeitos ósseos críticos usando hidroxiapatita sintética ou bovina com ou sem fração mononuclear da medula óssea: análise histomorfométrica e imuno-histoquímica

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 22 de outubro de 2020.

Orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Centro Biomédico - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Paulo Gonçalo Pinto dos Santos

Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Marisa Maria Dreyer Breitenbach

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Nilton de Bortoli Junior

Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia

Prof Dr. Aldir Nascimento Machado

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

A Deus por ser nossa fonte de luz a nos conduzir nesta missão terrena.

Aos meus pais, Jorge Manuel de Aguiar Pires (in memoriam) e Leonilda Augusta da Silva Pires, minhas referências de cidadania, respeito, família, e trabalho.

À minha esposa, Lenisa Martins Ferrato, por compartilhar os ideais de vida, o meu afeto, respeito e admiração.

Às minhas filhas Júlia Ferrato Pires e Letícia Ferrato Pires, por vocês e para vocês, ter a certeza que a história irá sempre continuar.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ricardo Guimarães Fischer por ter tido privilégio de ser seu orientado na elaboração deste trabalho, agradeço a confiança e o apoio necessários ao incentivo em buscar novos conhecimentos.

Ao Professor Doutor Jorge José de Carvalho, por ter me orientado e fornecido o necessário apoio no Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes na execução das diversas fases da metodologia deste estudo.

Ao Bioinformata Mario José dos Santos Pereira por sua competência e dedicação na análise estatística deste estudo.

À Bióloga Ana Lúcia Rosa Nascimento, a Técnica Universitária II Kissila Rebelo, e ao Técnico Vitor de Oliveira Araújo por conduzirem os processos de técnicas histológicas necessários a produção deste trabalho.

Aos Professores Doutores Paulo Gonçalo Pinto dos Santos e Marco Antônio de Alencar Carvalho pela confiança e apoio no trabalho executado.

Ao Professor Igor da Silva Brum por compartilharmos os conhecimentos adquiridos na execução deste estudo.

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.

Paulo Freire

RESUMO

PIRES, Jorge Luís da Silva. *Reparo de defeitos ósseos críticos usando hidroxiapatita sintética ou bovina com ou sem fração mononuclear da medula óssea: análise histomorfométrica e imuno-histoquímica*. 2020. 65 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a regeneração óssea de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos com a utilização de enxerto xenógeno Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) e hidroxiapatita sintética, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) puros e enriquecidos com a fração mononuclear medular de célula tronco. Material e métodos: quarenta ratos adultos jovens machos, Sprague Dawley, com doze semanas distribuídos em cinco grupos com oito animais, sendo assim denominados: grupo controle, grupo 1, grupo 2, grupo 3, e grupo 4. Além dos quarenta ratos adultos jovens, mais oito ratos adultos jovens machos, Sprague Dawley, com doze semanas foram utilizados como doadores de medula óssea. Os cinco grupos foram submetidos a defeitos ósseos críticos com trefina de 8 (oito) milímetros de diâmetro, na região temporoparietal. No grupo controle não teve a colocação de biomaterial, no grupo 1 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita sintética ,0,10 gramas, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil), no grupo 2 foram preenchidos com hidroxiapatita bovina,0,10 gramas, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), no grupo 3 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita sintética,0,10 gramas, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) enriquecida com 300 µl da fração mononuclear medular de células tronco na concentração de 1×10^6 , obtida dos animais doadores de medula, e no grupo 4 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita bovina, 0,10 gramas, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) também enriquecida com 300 µl da fração mononuclear medular de células tronco na concentração de 1×10^6 , obtida dos animais doadores de medula Após oito semanas, os cinco grupos tiveram todos os animais eutanasiados, por intermédio de overdose anestésica de Pentobarbital (180 mg/ kg intraperitoneal). Os grupos, foram submetidos a análises histomorfométrica, preparados corados com tricrômico de Masson, e técnicas imuno-histoquímica de VEGF e Osteopontina. Não existiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos 1, 2, 3 e 4, porém existiu entre o grupo controle e os demais grupos que receberam tratamento para regeneração dos defeitos ósseos críticos.

Palavras-chave: Osseointegração. Regeneração Óssea. Fração Mononuclear da Medula Óssea. Defeito Ósseo Crítico.

ABSTRACT

PIRES, Jorge Luís da Silva. *Repair of critical size bone defects using synthetic or bovine hydroxyapatite with or without bone marrow mononuclear fraction: histomorphometric and immunohistochemical analysis*. 2020. 65 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

The present study aimed to evaluate the bone regeneration of critical bone defects in the calvaria of rats using xenogenous grafts, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) and synthetic hydroxyapatite, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro / RJ, Brazil) pure or enriched with the medullary mononuclear fraction of stem cells, in the material and methods: forty young adult male rats, Sprague Dawley, were used, with twelve weeks distributed in five groups with eight animals, being thus named: control group, group 1, group 2, group 3, and group 4. In addition to the forty young adult rats, eight more animals were used as bone marrow donors. The Five groups were submitted to critical size bone defects with 8 (eight) millimeter diameter trephine, in the temporoparietal region. In the control group there was no biomaterial placement, in group 1 the critical size bone defects were filled with synthetic hydroxyapatite, 0,10 grams, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro / RJ, Brazil), in group 2 they were filled with bovine hydroxyapatite, 0,10 gramas, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland), in group 3 the critical size bone defects were filled with synthetic hydroxyapatite, 0,10 grams, (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro / RJ, Brazil) enriched with 300 µl of BMMF containing 1×10^6 cells, obtained from bone marrow donors animals, and in group 4 the critical size bone defects were filled with bovine hydroxyapatite, 0,10 grams Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Switzerland) enriched with 300 µl of BMMF containing 1×10^6 cells, obtained from bone marrow donors animals. After eight weeks, all five of animals were euthanized by Pentobarbital anesthetic overdose (180 mg / kg intraperitoneal). The groups were submitted to histomorphometric analysis, using Masson's trichrome Stain, and immunohistochemical techniques of VEGF and Osteopontin. There was no statistically significant difference among groups 1, 2, 3 and 4, but it did exist with the control group and the other groups that received treatment for the regeneration of critical bone defects.

Keywords: Osseointegration. Bone Regeneration. Mononuclear Fraction of the Bone Marrow, Critical Bone Defects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Biomateriais instrumentais e medicamentos	27
Figura 2	Isolamento das células mononucleares da medula óssea	27
Figura 3 -	Fração Mononuclear Medular de Célula Tronco	28
Figura 4 –	Sequência Cirúrgica 1	28
Figura 5 –	Sequencia Cirúrgica 2	29
Figura 6 –	Sequência Cirúrgica 3	29
Figura 7 –	Peças descalcificadas	30
Figura 8 –	Defeitos ósseos críticos após a descalcificação por via anatômica caudal	30
Figura 9 –	Processamento Histológico	31
Figura 10 –	Fotomicrografia: análise histomorfométrica do material corado com tricrômico de Masson. No defeito ósseo o azul identifica matriz colágena e o azul mais compacto, onde as fibras colágenas apresentam - se mais condensadas. Barra de calibração com 50 µm.	32
Figura 11 –	Fotomicrografia: seleção dos cortes corados com o tricrômico de Masson, com os delimitadores das áreas de interesse em verde. O azul identifica matriz colágena e o azul mais compacto, onde as fibras colágenas apresentam - se mais condensadas, região onde a matriz óssea começa a ser secretada. Barra de calibração com 50 µm.....	33

Figura 12-	Fotomicrografia: quantificação das áreas de interesse dos cortes corados com o tricrômico de Masson, as áreas marcadas em amarelo dentro dos delimitadores representam fibras colágenas mais condensadas, região onde a matriz óssea começa a ser secretada. Capturas e quantificação por intermédio do software Imagem Pro Plus 7.0. Barra de calibração com 50 μm	33
Figura 13-	Fotomicrografia do corte histológico marcado com a técnica da imunoperoxidase para VEGF. Áreas de cor castanha no defeito denotam a expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μm .	34
Figura 14-	Fotomicrografia do corte histológico marcado com a técnica da imunoperoxidase para VEGF. Delimitadores das áreas de interesse no defeito ósseo em verde, cor castanha, representam áreas de expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μm	34
Figura 15-	Fotomicrografia do corte histológico marcado com a técnica da imunoperoxidase para VEGF. As áreas marcadas em verde, dentro dos delimitadores, representam áreas de expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μm	35
Figura 16-	Fotomicrografia do corte histológico marcado com a técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Áreas de cor castanha no defeito denotam presença de Osteopontina na formação de matriz óssea. Barra de calibração com 50 μm	35
Figura 17-	Fotomicrografia do corte histológico da área de interesse marcado com a técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Delimitadores das áreas de interesse no defeito ósseo em verde. A cor castanha no interior dos delimitadores, representam áreas de presença de Osteopontina na formação da matriz óssea. Barra de calibração com 50 μm	36
Figura 18 -	Fotomicrografia de cortes histológico com a técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Quantificação da área de interesse dos cortes imunomarcados. As áreas marcadas em verde dentro dos delimitadores, representam presença de Osteopontina na formação de matriz óssea.....	36

Figura 19 - Fotomicrografia: análises dos grupos controle, 1, 2, 3 e 4 histomorfometria do material corados com tricrômico de Masson e marcados pelas técnicas da imunoperoxidase para VEGF e Osteopontina. Barra de calibração com 50 μm 47

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de coloração do tricrômico de Masson pela análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos..... 41
- Gráfico 2 – Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de imunomarcção VEGF análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos..... 43
- Gráfico 3 – Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de imunomarcção da Osteopontina pela análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise de resultados de todos os grupos dos cortes corados com tricrômico de Masson – através do teste estatístico Kruskal – Wallis.....	41
Tabela 2 –	Análise de resultados de todos os grupos, cortes corados com tricrômico de Masson – através do teste de comparações múltiplas de Dunn.....	42
Tabela 3 –	Análise de resultados em pares dos cortes corados com tricrômico de Masson, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P- Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.....	42
Tabela 4-	Análise de resultados dos cortes de todos os grupos imunomarcados com VEGF através do teste estatístico Kruskal – Wallis.....	43
Tabela 5 -	Análise de resultados de todos os grupos, cortes imunomarcados com VEGF através do teste de comparações múltiplas de Dunn.....	44
Tabela 6 -	Análise de resultados em pares dos cortes imunomarcados com VEGF, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P- Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.....	44
Tabela 7 -	Análise de resultados dos cortes de todos os grupos imunomarcados com Osteopontina através do teste estatístico Kruskal – Wallis.....	45
Tabela 8 -	Análise de resultados de todos os grupos, cortes imunomarcados com Osteopontina através do teste estatístico de comparações múltiplas de Dunn.....	46
Tabela 9 -	Análise de resultados cortes imunomarcados com Osteopontina, através do teste de comparação estatístico de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMSCs	Adult Mesenchymal Stem Cells derived From Adipose Tissue
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BMA	Bone Marrow Aspirate
BMAC	Bone Marrow Aspirate Concentrate
BBM	Bovine Bone Mineralized
BMMSCs	Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
β - TCP	Beta Tricálcio fosfato
CD	Cirurgião Dentista
CEUA	Comissão de Ética para o Uso de Animais
CFO	Conselho Federal de Odontologia
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CGF	Concentrated Growth Factor
CTM	Célula Tronco Mesenquimal
CTP	Célula Tronco Pulpar
DAB	Diaminobenzidina
DBBM	Dried Bovine Bone Mineralized
DOU	Diário Oficial da União
g	grama
FMMO	Fração Mononuclear da Medula Óssea
FN	Fibronectina
HLA	Human Leucocyte Antigen
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes
μ l	Microlitros
μ m	Micrometros
NHA	Nano hidroxiapatita
RTC	Randomized Clinical Study
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRF	Plasma Rico em Fibrina
PRP	Plasma Rico em Plaqueta
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SVF Stromal Vascular fraction

VEGF Fator de Crescimento Vascular Endotelial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1	Materiais Aloplástico-Hidroxiapatita sintética	19
1.2	Xenoenxerto-Hidroxiapatita bovina	19
1.3	Fração mononuclear da medula óssea	20
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Modelo Animal	23
3.2	Desenho experimental e protocolo Cirúrgico	23
3.3	Obtenção da Fração Mononuclear da Medula Óssea	25
3.4	Análise de Imagens	31
3.5	Análise estatística	37
4	RESULTADOS	38
4.1	Análise histomorfométrica do material corado com tricrômico de Masson	38
4.2	Análise imunomarcção para VEGF	39
4.3	Análise imunomarcção para Osteopontina	40
5	DISCUSSÃO	48
	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO - Comitê de ética em pesquisa	65

INTRODUÇÃO

Com o avanço da implantodontia como especialidade, pode ser observado um grande aumento no uso clínico dos implantes osseointegrados e uma busca por maiores índices de sucesso. Uma linha de pesquisas frequente na última década tem sido voltada para procedimentos regeneradores e substitutos ósseos visto que os defeitos ósseos são comuns na rotina do especialista. Diversos mecanismos biológicos e fisiológicos devem ser compreendidos para que a regeneração seja conduzida da melhor forma possível obtendo maior previsibilidade dos resultados. Em diversas áreas da odontologia, os mecanismos de osteogênese, morfogênese, biotecnologia e biologia das células-tronco estão sendo intensamente estudados.¹

A reconstrução de defeitos ósseos extensos com o objetivo de instalar implantes representa um dos maiores desafios à profissão odontológica e. Infelizmente este tipo de situação pode ser considerado um achado comum. Os defeitos ósseos alveolares podem ser consequentes de várias causas, como por exemplo a reabsorção óssea fisiológica após exodontia, sendo a preservação do alvéolo dentário um tema que tem sido bastante abordado na literatura,²⁻⁷ assim como o trauma, a doença periodontal, a falha no tratamento endodôntico, e os cistos e tumores que acometem os maxilares.⁸⁻¹¹

Os enxertos comumente utilizados nas cirurgias de reconstrução são os seguintes: autógeno, alógeno, xenógeno, e aloplástico (hidroxiapatita sintética (HA) e beta tricálcio fosfato (β -TCP), porém o único que possui a capacidade osteogênica é o osso autógeno, considerado o padrão ouro, os demais possuem a capacidade de osteocondução e ou osteoindução,¹¹⁻¹⁶ mas não a osteogênica, e são dependentes inteiramente das células do leito receptor, particularmente do pequeno subconjunto de células-tronco e células progenitoras, capazes de gerar novo tecido, logo a presença destas células no enxerto ósseo autógeno, permite uma maior previsibilidade nas reconstruções de defeitos ósseos.^{1, 11-14} No entanto, a retirada de um enxerto autógeno frequentemente representa um risco significativo de morbidade, e complicações pós-operatórias

Uma abordagem promissora para a regeneração óssea. foi estabelecida pela identificação de certas células multipotenciais, entre elas, as células estromais da

medula óssea. Muitos estudos de engenharia de tecidos foram realizados utilizando a medula óssea, nas seguintes modalidades: o aspirado de medula, a fração mononuclear de célula tronco, a cultura de células troncos de origem mesenquimal (CTMs),^{6,17-24} e a cultura de células troncos de origem adiposa (ADMSCs).²⁵⁻²⁶ Uma célula tronco mesenquimal (CTM) é uma célula indiferenciada que pode se autorreplicar e se diferenciar em vários tecidos, como ossos, cartilagens, músculos e tendões, e possui também muitas habilidades e funções, incluindo depressão imune. Estudos confirmaram que uma CTM indiferenciada pode proliferar e se diferenciar em um tecido desejado em um ambiente específico.¹⁷

A engenharia tecidual tem avançado no sentido de se tentar reproduzir órgãos e tecidos, incluindo o tecido ósseo. Com isso, os estudos vêm sendo direcionados à criação de protocolos para terapias, no sentido de restaurar os tecidos nativos sem a necessidade da remoção de grandes enxertos de áreas doadoras, onde estas células (aspirado de medula óssea, fração mononuclear da medula óssea, células tronco da medula óssea, células tronco do tecido adiposo) são adicionadas a um arcabouço apropriado, como um substituto ósseo comercialmente disponível, utilizado como carreador, objetivando alcançar o potencial osteogênico, observado no osso autógeno, porém com uma menor morbidade.^{1,8,10,18,24,27-33}

O objetivo do presente trabalho consiste no estudo comparativo, por meio de análise histomorfométrica e técnicas imuno-histoquímicas de dois biomateriais de enxertia puros e enriquecidos com a fração mononuclear da medula óssea (FMMO), que foram utilizados na regeneração de defeitos ósseos críticos na calvaria de ratos.

1 REVISÃO DE LITERATURA

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas capazes de dar origem aos tecidos de origem mesodérmica, tais como dentina, osso e ligamento periodontal. A presença dessas células na medula óssea mostra, apesar de pequeno número, que o uso associado a enxertos de forma concentrada representa um fator promissor na formação de osteoblastos nos procedimentos ósseos regenerativos.³⁴⁻³⁶ A perda de elementos dentários acarreta inúmeras alterações em maxila e mandíbula, que refletem alterações morfológicas no terço inferior da face, e conseqüentemente alteram o perfil estético dos indivíduos, pois o rebordo tende a se reabsorver gradativamente após as exodontia. A busca por um material que pudesse substituir o osso autógeno na técnica de regeneração, proporcionando adequada estrutura para a instalação de implantes, tem sido rotineiramente pesquisado.^{12,28,37-46}

Pesquisas a respeito das técnicas de terapia celulares com: aspirado de medula óssea,^{1,19,47-49} concentrado do aspirado de medula óssea,^{32,34,51-56} fração mononuclear da medula óssea,^{10,15,47,57,58} cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea,^{23,34,39,53,59} e células tronco mesenquimais de origem adiposa,^{21,25,60} têm sido realizadas com o objetivo de conseguir as mesmas propriedades osteogênica, osteoindutora e osteocondutora do osso autógeno, que é considerado o padrão ouro.⁶

Estas terapias celulares são utilizadas associada aos diversos carreadores que são usados como substitutos ósseos e funcionam como um arcabouço , sendo eles, aloenxerto,^{62,63} osso xenógeno um dos mais pesquisados,^{50,51,64-67} beta tricálcio fosfato (β -TCP),²⁴ fosfato de cálcio,⁶⁸ hidroxiapatita sintética.⁶⁹⁻⁷²

1.1 Materiais aloplástico hidroxiapatita sintética

Os materiais aloplásticos mais comuns no mercado são: fosfato tricálcio, vidros bioativos, sulfato de cálcio, carbonato de cálcio, polímeros, hidroxiapatita sintética e as associações hidroxiapatita com fosfato tricálcico.¹⁴ Destes, os fosfatos de cálcio em especial a hidroxiapatita sintética (HA) e o beta tricálcio fosfato (β -TCP) usados puros ou associados tem sido os mais estudados,^{6,9,73} em função da composição que lembra muito a fase inorgânica do osso.⁷⁴ São fabricados sinteticamente e estão disponíveis em suprimento ilimitado, com a vantagem de possuir osteocondutividade com menor possibilidade de respostas imunes e infecciosas do que os aloenxertos e xenoenxertos. Devido às características, os biomateriais inorgânicos apresentam-se como uma opção de tratamento. A composição química, a porosidade e as estruturas cristalinas semelhantes à matriz óssea inorgânica resultam em uma ligação direta entre o material e o tecido ósseo, permitindo a osteocondução, na qual o biomaterial serve como arcabouço, por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo os componentes necessários à formação óssea. Ao serem aplicados, os biomateriais devem manter as suas propriedades e características estruturais durante as fases iniciais de cicatrização e posteriormente serem reabsorvidos, de uma maneira progressiva, a tempo de serem substituídos por um novo osso.⁶⁹ Em nosso estudo foi utilizado uma hidroxiapatita sintética, principal componente encontrado na fase mineral do esmalte do dente e dos ossos, com grânulos porosos, osteocondutora para as células e com baixa cristalinidade.

1.2 Xenoenxerto hidroxiapatita bovina

Os xenoenxertos são enxertos derivados de outras espécies, onde a hidroxiapatita (HA) é obtida, removendo todos os componentes orgânicos do tecido ósseo, e a estrutura inorgânica restante de cálcio e fosfato, fornece uma matriz arquitetônica natural, com um arcabouço favorável a neoformação óssea que ocorre lentamente para o interior deste arcabouço. São biocompatíveis e osteocondutores.

As propriedades osteocondutoras da HA bovina são bem relatadas na literatura,³⁻⁷ possui um grau de reabsorção muito baixo. Biópsias em humanos realizadas após 10 anos em cirurgias de seio maxilar, mostram remanescente de partículas óssea bovina.⁷⁵ Seu uso isoladamente é bem documentado em procedimentos cirúrgicos de Regeneração Óssea Guiada de pequenos defeitos e levantamento de seio maxilar,¹³ pesquisas no aumento vertical e horizontal dos rebordos tem sido realizadas.⁷⁶ Possui como grande vantagem a disponibilidade de grandes volumes sem a necessidade de área doadora, e como desvantagem não fornecimento de células viáveis osteogênicas, além de não ser osteoindutor.¹⁴

1.3 Fração mononuclear da medula óssea

Dentre as técnicas de terapia celular pesquisadas algumas delas apresentam aplicabilidade clínica imediata. Este é o caso do uso do aspirado de medula óssea, do concentrado da medula óssea, e da fração mononuclear da medula óssea(FMMO). Em nosso estudo utilizamos a fração mononuclear da medula óssea (FMMO), que pode ser obtida por três métodos específicos para a separação de camadas celulares da medula óssea ou do sangue periférico, sendo eles: 1) Separação por gradiente de densidade; 2) separação baseada na afinidade celular (positiva e negativa), 3) separação por tamanho de célula. Destes três métodos o por gradiente de densidade é o mais utilizado, devido a facilidade de execução, e foi o realizado neste trabalho. Para a realização deste método é necessário a utilização de um gradiente de densidade que vem a ser uma mistura de polissacarídeos neutros, hidrofílicos de alta densidade que se dissolvem prontamente em solução aquosa. O gradiente de densidade mais utilizado para separar os componentes celulares do sangue periférico (eritrócitos, leucócitos...) é o Ficoll – Histopaque (Sigma – Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Esta mistura do Ficoll- Histopaque, utilizada na separação da camada de células mononucleares da medula óssea, após processada, exhibe o tubo de ensaio com a seguinte distribuição: na parte mais superior do tubo ficam o plasma e plaquetas, no halo alaranjado as células mononucleares da medula que serão utilizadas junto com os biomateriais

(hidroxiapatita sintética e bovina), a camada abaixo o Ficoll- Histopaque e por último os eritrócitos e granulócitos.¹

2 OBJETIVOS

São objetivos do presente trabalho avaliar através de técnicas de histomorfometria e imuno-histoquímica:

- a) Se existe diferença na regeneração de defeitos ósseos críticos entre a hidroxiapatita sintética, e a hidroxiapatita bovina usadas puras.
- b) Se existe diferença na regeneração de defeitos ósseos críticos entre a hidroxiapatita sintética, e a hidroxiapatita bovina, enriquecidas com a fração mononuclear da medula óssea (FMMO).
- c) Se existe diferença na regeneração de defeitos ósseos críticos entre a hidroxiapatita sintética pura, e enriquecida com a (FMMO).
- d) Se existe diferença na regeneração de defeitos ósseos críticos entre hidroxiapatita bovina pura, e enriquecida com a (FMMO).
- e) Se existe diferença na regeneração de defeitos ósseos críticos entre as hidroxiapatita sintética e bovina puras, e enriquecidas com a (FMMO), em relação ao grupo controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo animal

Os experimentos em animais fornecem embasamento para o desenvolvimento de diversos tratamentos serem utilizados em humanos, como elaboração de drogas, vacinas, entre outros,¹ a literatura nos apresenta trabalhos na área de engenharia tecidual em modelo animal em calvária de ratos,^{17,43,71,77} e calvaria de coelhos.^{23,38,39,69} Entretanto o uso terapias avançadas, em especial, o uso de células-tronco, em humanos a nível de consultório dentário não é permitido, sendo regulamentado pela resolução do CFO 157 de 8 de junho de 2015, que determina que a coleta de material biológico de origem odontológica deva ser feita somente por CDs, no centro de tecnologia celular (CTC) e que todo (CTC) tenha um Cirurgião Dentista (CD) como responsável técnico.⁷⁸ A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na sua Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 214, de 7 de fevereiro de 2018 (Publicada no DOU nº 36, de 22 de fevereiro de 2018), dispõe sobre as boas práticas em células humanas para uso terapêutico e pesquisa clínica, e dá outras providências.⁷⁹ O presente trabalho para fins de pesquisa realizada, encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6899 de 15 de junho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (IBRAG) sob o registro 016/2018. (Anexo 1).

3.2 Desenho experimental e protocolo cirúrgico

No presente trabalho, foram utilizados quarenta ratos adultos jovens machos, Sprague Dawley, com doze semanas distribuídos em cinco grupos com oito animais,

sendo assim denominados: grupo controle, grupo 1, grupo 2, grupo 3, e grupo 4. Além dos quarenta ratos adultos jovens, mais oito animais foram utilizados como doadores de medula óssea. Os cinco grupos foram submetidos a defeitos ósseos críticos de 8 mm, que são os defeitos cuja amplitude não possui capacidade de auto cicatrização em ratos, e demandam um procedimento reconstrutivo que permita o seu restabelecimento.¹ Os defeitos críticos foram realizados com trefina de 8 (oito) milímetros de diâmetro,⁴³ na calvária dos ratos e os grupos foram assim constituídos: no grupo controle não teve a colocação de biomaterial; no grupo 1 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita sintética, 0,10 gramas de (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil); no grupo 2 foram preenchidos com hidroxiapatita bovina, 0,10 gramas de (Bio-Oss® Small Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça); no grupo 3 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita sintética, 0,10 gramas de (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil) enriquecida com 300 microlitros (μ l) de fração mononuclear medular de células tronco na concentração de 1×10^6 , obtida dos animais doadores de medula, e, no grupo 4 os defeitos críticos foram preenchidos por hidroxiapatita bovina, 0,10 gramas de (Bio-Oss® Small Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) enriquecida com 300 microlitros (μ l) de fração mononuclear medular de células tronco na concentração de 1×10^6 , obtida dos animais doadores de medula (Figuras 1, 2, 3).

A seguinte sequência cirúrgica em cada grupo foi seguida, os espécimes foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2 % (Calmiun Agener União Quimica Farmacêutica Nacional São Paulo/SP, Brasil) 0,1 ml por 100 g/peso, e quetamina 10 g (Dopalen – CEVA, Paulínea/SP, Brasil) 0,1 ml por 100 g/peso, e após anestesia de cada espécime, foi realizada a seguinte sequência cirúrgica: tricotomia da região temporoparietal com lamina de bisturi nº 15C, antisepsia com povidine, incisão semilunar com retalho de espessura total com lamina de bisturi 15 C, descolamento da pele e periósteo, e exposição óssea cirúrgica da região temporoparietal com o descolador de Molt (Duflex - Juiz de Fora , MG) utilização de trefina de 8(oito) milímetros de diâmetro (Harte instrumentos Ribeirão Preto, SP) com contra ângulo redutor 20:1 (Kavo do Brasil – Joinville/SC, Brasil), acoplado ao motor de implante BLM 600 (Driller Carapicuíba/ SP, Brasil), promoção do defeito ósseo crítico de 8 (oito) milímetros até a dura-máter; descolamento da porção óssea trefinada com

espátula de Molt (Duflex Juiz de Fora/MG, Brasil). Em seguida os procedimentos regenerativos dos defeitos ósseos críticos, foram realizados com os respectivos enxertos de cada grupo como descrito no primeiro parágrafo, a reposição do perióstio e pele foi realizada, seguindo da sutura do retalho com categute (Shalon – São Luis de Montes Belos/ GO, Brasil), (Figuras 4,5,6). A recuperação pós-anestésica foi monitorada clinicamente, realizada a avaliação do animal, que foi observado, e ao completar 8 (oito) semanas todos foram eutanasiados, por intermédio de overdose anestésica de Pentobarbital (Cristália Cotia/SP, Brasil), 180 mg/ kg intraperitoneal com aplicação prévia, 10 minutos antes da overdose anestésica de Pentobarbital, de Lidocaína (DFL, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) 1 a 3 mg/Kg na concentração de 0,5% sem vasoconstictor, por via intraperitoneal. O crânio de cada espécime eutanasiado, foi descalcificado com EDTA 10 % (Sigma – Aldrich, St Louis, Missouri, USA) durante 38 (trinta e oito dias). Após a descalcificação,(Figuras 7,8) o defeito ósseo crítico de 8 (oito) milímetros, foi processado para inclusão em Paraplast (Figura 9), realizada a microtomia, e os preparados histológicos foram corados pela técnica do tricrômico de Masson e analisados por histomorfometria, e por técnicas de imunomarcção para VEGF e Osteopontina, todas com microscopia óptica empregando o microscópio Olympus BX-50.

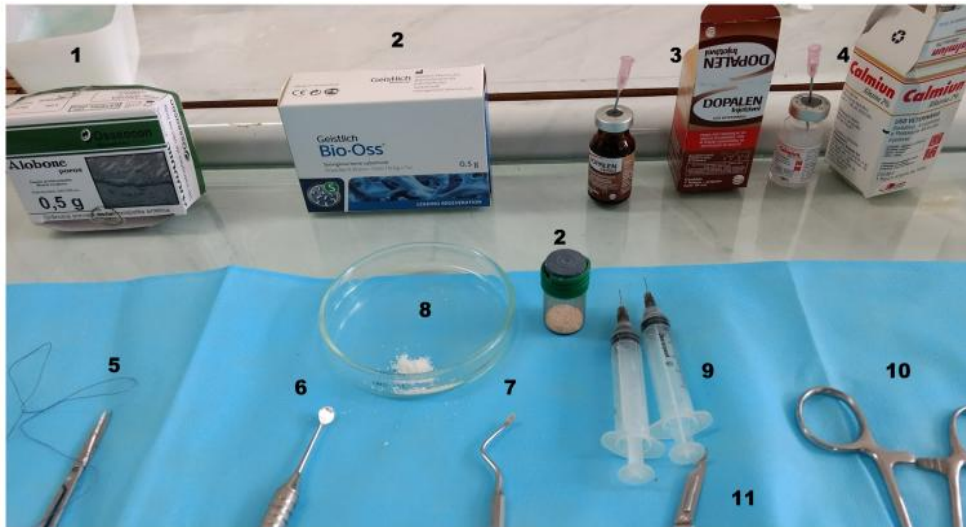
3.3 Obtenção da Fração Mononuclear da Medula Óssea

No presente estudo a fração mononuclear foi processada pelo emprego de Ficoll Histopaque (Sigma – Aldrich, St Louis, Missouri, USA) seguindo os seguintes passos, são eles:

1. As células de medula óssea foram conseguidas de fêmures e tíbias de ratos Sprague Dawley com aproximadamente 12 semanas de idade doadores de medula óssea.

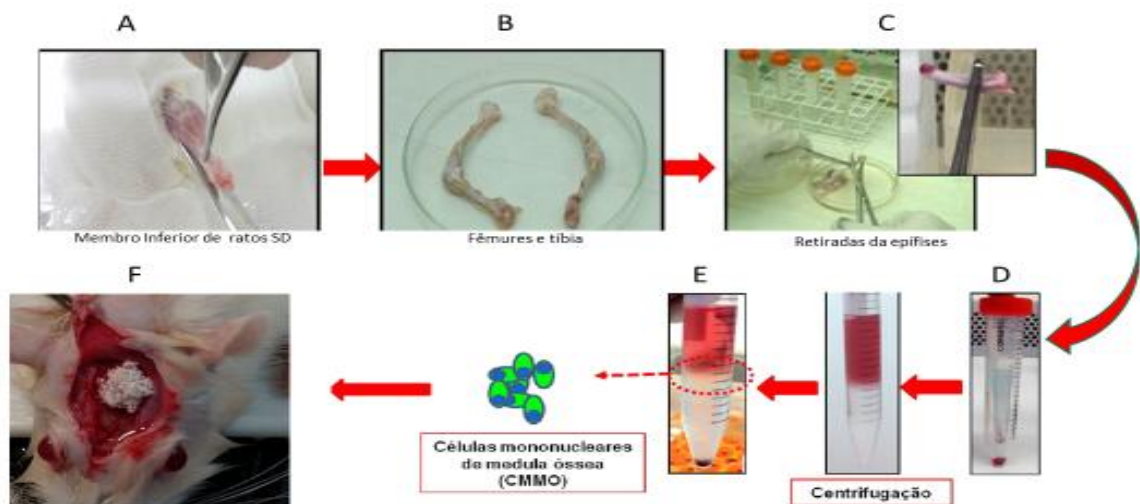
2. A pele e os músculos adjacentes ao fêmur e à tibia foram retirados, evitando o rompimento de vasos sanguíneos presentes na região. Os fêmures e as tíbias foram colocados em placas de Petri contendo PBS para dissecação do músculo.
3. As epífises ósseas foram cortadas e os ossos colocados no interior de uma ponteira de 1000 µL, sendo centrifugado a 461 g por 5 minutos à 4°C, para a obtenção do estroma medular.
4. A medula foi coletada e homogeneizada com PBS e as ponteiras, contendo os fêmures e as tíbias, foram descartadas. As amostras referentes a cada pata do animal foram reunidas e centrifugadas a 461 g por 5 minutos à 4°C. O pellet de células foi ressuspensionado em 4 ml de DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco, Sigma–Aldrich) sem soro, pH 7.2.
5. Em seguida, adicionado cuidadosamente sobre 4 ml de Ficoll (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich). Os tubos foram centrifugados a 819 g por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação as duas fases se tornam bem visíveis e a separação ocorre na seguinte forma: na fase superior fica o plasma e seus constituintes solúveis, na interfase as células mononucleares, logo abaixo a camada de Ficoll e mais abaixo a camada contendo eritrócitos e granulócitos sob a forma de um sedimento celular no fundo do tubo.
6. O anel de células formado na interface Ficoll – meio de cultura, que contém as células mononucleares de medula óssea, foi coletado e, então, as células foram ressuspensionadas em 10 ml PBS pH 7.2 e centrifugadas a 461 g por 5 minutos, à 4°C.
7. O sobrenadante foi desprezado e este processo repetido mais duas vezes, para a retirada total do Ficoll. Logo em seguida, as células foram ressuspensionadas em 1 ml de PBS gelado estéril, pH 7.2, e contadas na câmara de Neubauer. Os tubos de Ependorf de 1 ml foram preparadas com 1×10^6 células diluídas em 300 microlitros (µl) de PBS gelado, pH 7.2. A suspensão final da FMMO foi adicionada à hidroxiapatita sintética e ao xenoinxerto. (Figuras 2,3)

Figura 1- Biomateriais instrumentais e medicamentos



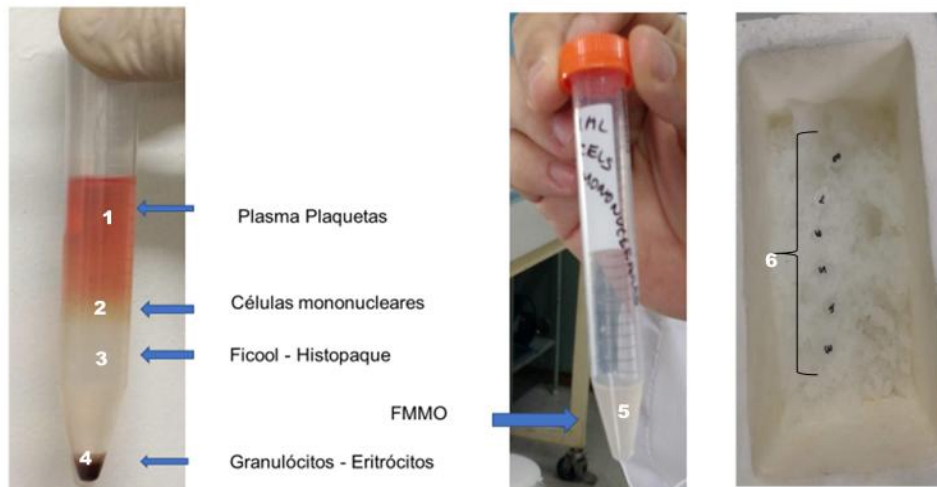
Legenda: 1 Alobone poros, 2 – Bio-Oss, 3-anestésico injetável a base de ketamina, 4 - sedativo, analgésico e relaxante muscular injetável, à base de cloridrato de xilazina, 5 - tesoura cirúrgica, 6 - espátula de Molt, 7 - cureta de alvéolo, 8 - placa de Petri com Bio – Oss, 9 - seringas descartáveis, 10 - porta agulha, 11- lamina de bisturi 15 c.
 Fonte: O autor, 2020.

Figura 2 - Isolamento das células mononucleares da medula óssea



Legenda: A Retirada do fêmur e tíbia; B Dissecção de todo o músculo; C. Retirada das epífises e exposição do canal medular; D Centrifugação para obtenção do estroma celular; E Formação do anel de FMMO; F Biomaterial + FMMO no defeito ósseo crítico.
 Fonte: O autor, 2020.

Figura 3 – Fração Mononuclear Medular de Célula Tronco



Legenda: 1- plasma plaquetas, 2 - células mononucleares, 3 - ficoll – histopaque, 4 - FMMO, granulócito- eritrócito, 6 - FMMO nos tubos Ependorf 300 µl.

Fonte: o autor, 2020.

Figura 4 - Sequência Cirúrgica 1



Legenda: 1-antissepsia, 2 – tricotomia, 3 – incisão bilateral na região temporoparietal, - 4 incisões final.

Fonte: o autor, 2020

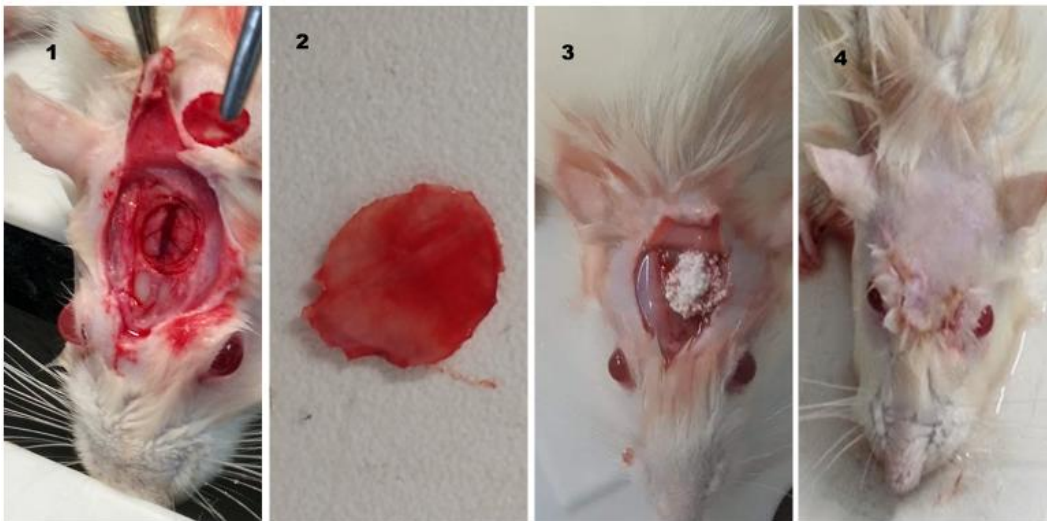
Figura 5 - Sequência Cirúrgica 2



Legenda: 1 – descolamento do retalho de tecido mole com espessura total, 2 - demarcação do defeito ósseo com trefina de 8mm, 3 - descolamento do tecido ósseo, 4 - remoção do defeito ósseo crítico com exposição da dura máter.

Fonte: o autor, 2020.

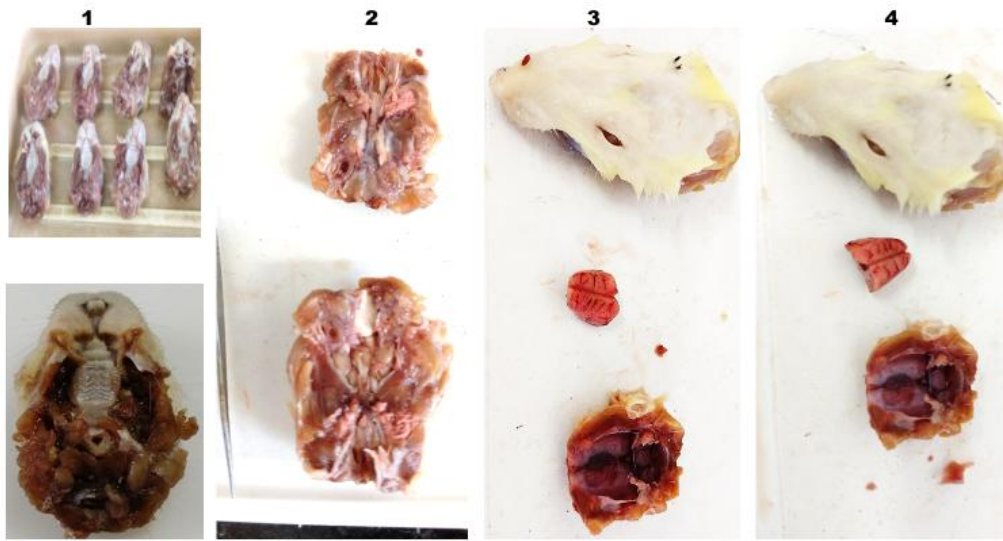
Figura 6 - Sequência Cirúrgica 3



Legenda: 1 – dura-máter, 2 - defeito ósseo, 3 – preenchimento do defeito ósseo com biomaterial, 4 - sutura.

Fonte: o autor, 2020

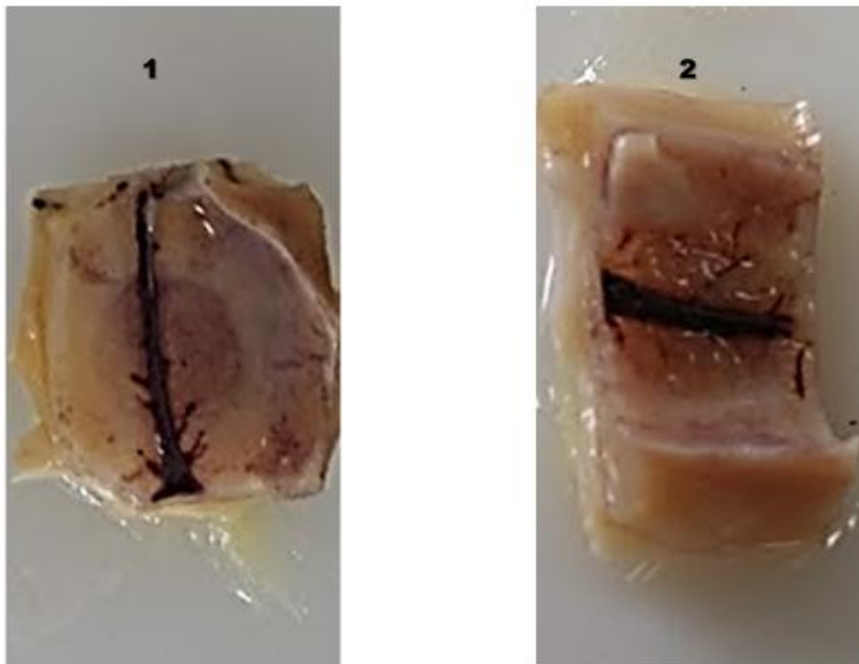
Figura 7 - Peças descalcificadas



Legenda: 1 - peças inteiras, 2 - remoção do palato, 3-4 remoção do sistema nervoso central e acesso aos defeitos ósseos por via anatômica caudal.

Fonte: o autor, 2020.

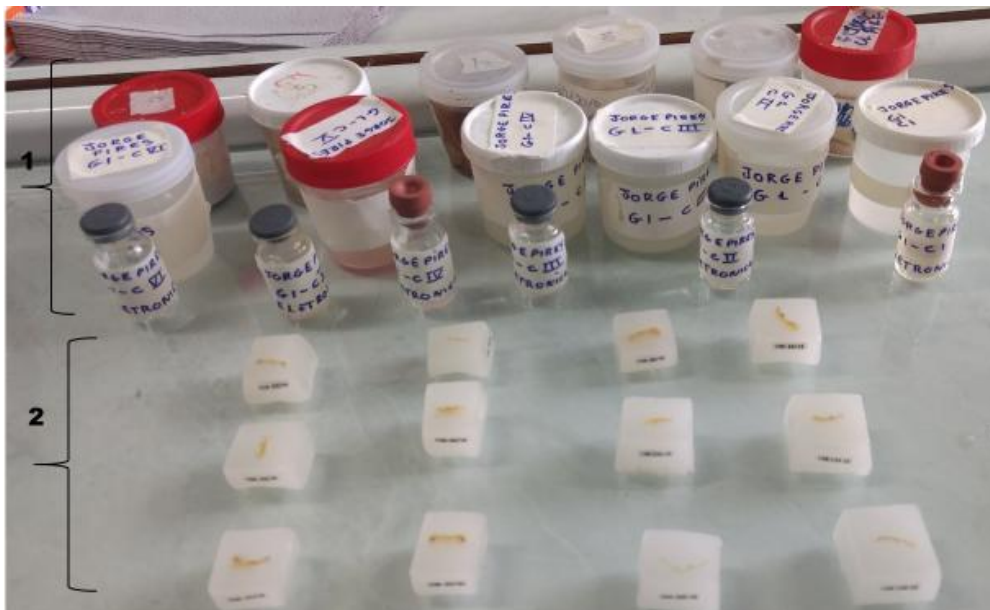
Figura 8 - Defeitos ósseos críticos após a descalcificação por via anatômica caudal:



Legenda: 1 – sentido antero posterior, 2 - sentido latero medial.

Fonte: o autor, 2020.

Figura 9 – Processamento Histológico



Legenda: 1 - Peças descalcificadas, 2 – Inclusão em Paraplast.

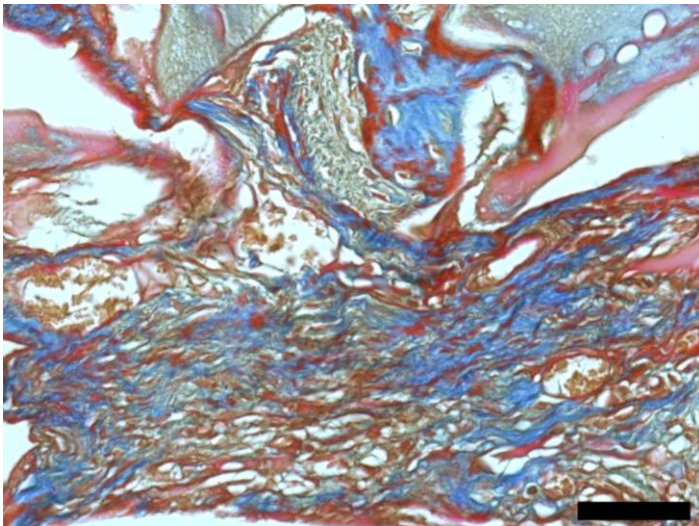
Fonte: o autor, 2020.

3.4 Análise de Imagens

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por intermédio do software Image Pro Plus 7.0 (Media Cibernéticas, EUA) acoplado a um sistema de videomicroscopia composto de um microscópio Olympus BX-50 e uma câmera Olympus DP-72 (Copyright OLYMPUS Corporation). Sendo definido previamente os parâmetros de luminosidade, balanço de branco para um aumento de aproximadamente 400x . Estas imagens obtidas, foram salvas em formato TIFF com 12 Mega Pixels, o que tornou mais precisa a segmentação das estruturas de interesse (Figuras 10, 13, 16). Na análise realizada pelo tricrômico de Masson no defeito ósseo, coloração azul representam matriz colágena, e o azul mais compacto, onde as fibras colágenas apresentam se mais condensadas, sugere uma região onde a matriz óssea começa a ser secretada (Figuras 11, 12). Nas análises pelas técnicas de imunomarcção para o VEGF e Osteopontina, as áreas impregnadas pelo diaminobenzidina (DAB), aparecem com uma cor castanha, representam áreas de expressão de angiogênese e presença de atividade de formação da matriz óssea

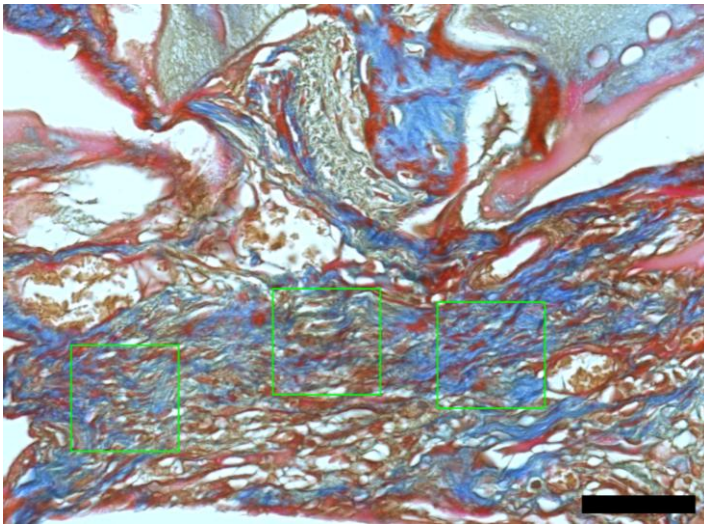
respectivamente (Figuras 14, 15, 17, 18). Ainda na análise de imagens, cada animal foi representado por três cortes histológicos semi-seriados. Para cada corte foram selecionados três campos (Figuras 11,14,17), um central e dois periféricos. Cada campo foi analisado com o uso de delimitadores de áreas de interesse, visando contornar artefatos histológicos que pudessem interferir na quantificação destas estruturas. A segmentação e quantificação foram feitas de modo interativo, possibilitando a correção de viés provocado por técnicas histológicas de coloração (Figuras 12,15,18). Os dados numéricos obtidos representaram o percentual de área ocupada pela estrutura de interesse nas áreas-teste, sendo o resultado final de cada animal representado pela média dos três cortes.

Figura 10 – Fotomicrografia: análise histomorfométrica do material corado com tricrômico de Masson. No defeito ósseo o azul identifica matriz colágena e o azul mais compacto, onde as fibras colágenas apresentam – se mais condensadas. Barra de calibração com 50 μm .



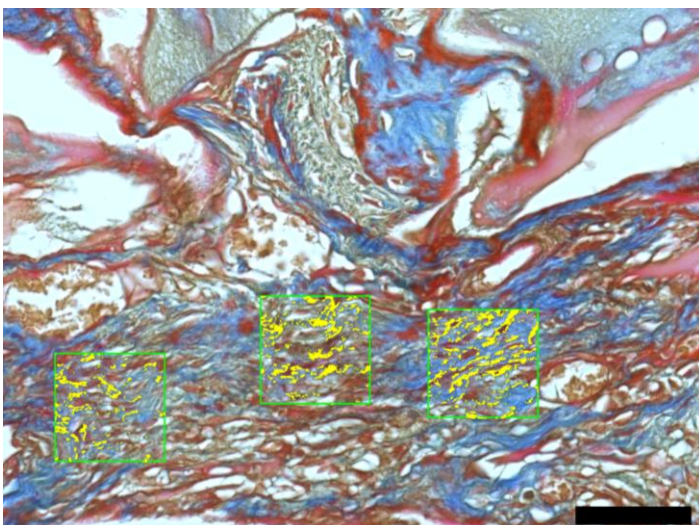
Fonte: o autor, 2020

Figura 11 - Fotomicrografia: seleção dos cortes corados com o tricrômico de Masson, com os delimitadores das áreas de interesse em verde. O azul identifica matriz colágena e o azul mais compacto, onde as fibras colágenas apresentam – se mais condensadas, região onde a matriz óssea começa a ser secretada. Barra de calibração com 50 μm



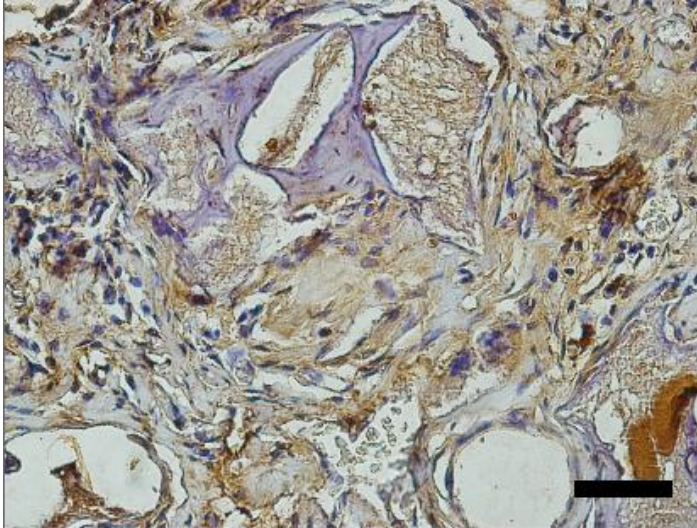
Fonte: o autor, 2020

Figura 12 Fotomicrografia: quantificação das áreas de interesse dos cortes corados com o tricrômico de Masson, as áreas marcadas em amarelo dentro dos delimitadores representam fibras colágenas mais condensadas, região onde a matriz óssea começa a ser secretada. Capturas e quantificação por intermédio do software Imagem Pro Plus 7.0. Barra de calibração com 50 μm .



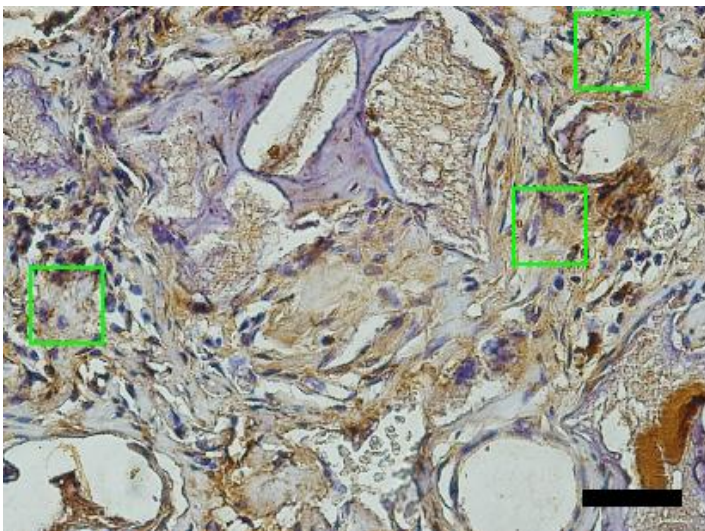
Fonte: o autor, 2020.

Figura 13 – Fotomicrografia do corte histológico marcado pela técnica da imunoperoxidase para VEGF. Metodologia de análise onde as áreas de cor castanha denotam expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μ m.



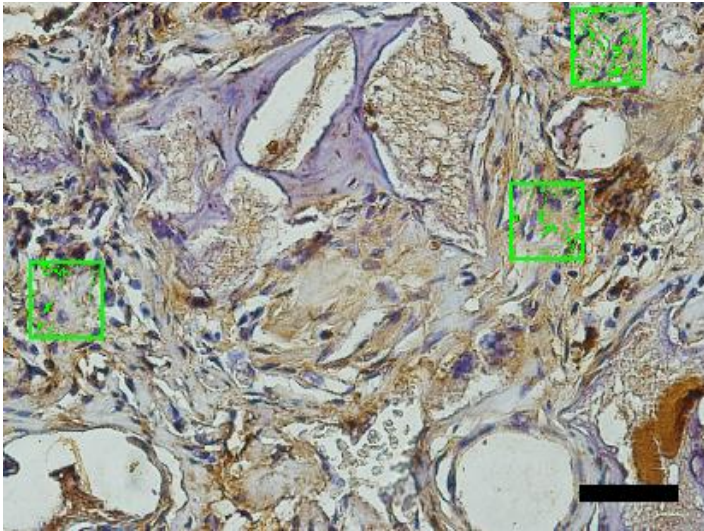
Fonte: o autor, 2020.

Figura 14 - Fotomicrografia do corte histológico marcado pela técnica da imunoperoxidase para VEGF. delimitadores das áreas de interesse no defeito ósseo em verde as áreas de cor castanha no interior, representam áreas de expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μ m.



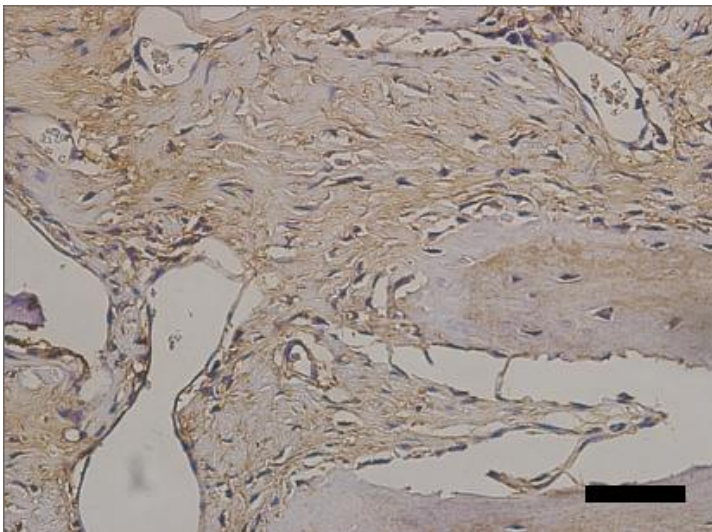
Fonte: o autor, 2020.

Figura 15- Fotomicrografia do corte histológico marcado pela técnica da imunoperoxidase para VEGF. Quantificação da área de interesse dos cortes imunomarcados. As áreas marcadas em verde dentro dos delimitadores, cor castanha, representam áreas de expressão de VEGF. Barra de calibração com 50 μm .



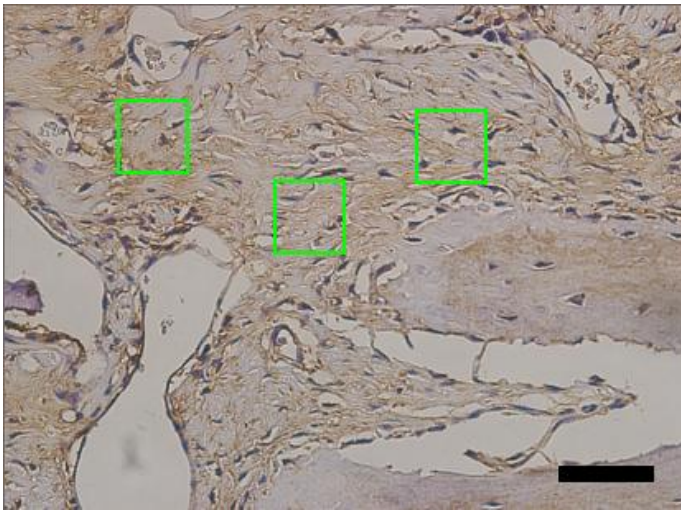
Fonte: o autor, 2020

Figura 16 – Fotomicrografia do corte histológico marcado pela técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Áreas de cor castanha no defeito ósseo denotam presença de Osteopontina na formação da matriz óssea. Barra de calibração com 50 μm .



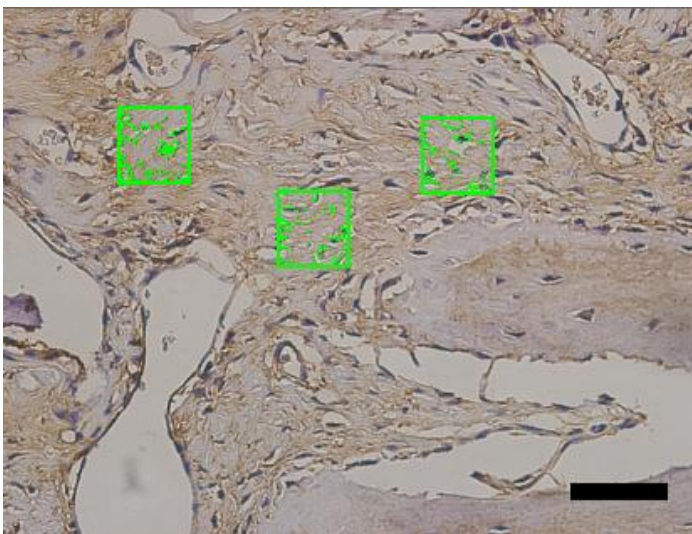
Fonte: O autor, 2020

Figura 17 – Fotomicrografia do corte histológico da área de interesse marcado com a técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Delimitadores das áreas de interesse no defeito ósseo em verde. A cor castanha no interior dos delimitadores, representam áreas de presença de Osteopontina na formação da matriz óssea. Barra de calibração com 50 μm



Fonte: O autor, 2020.

Figura 18 - Fotomicrografia de cortes histológico com a técnica da imunoperoxidase para Osteopontina. Quantificação da área de interesse dos cortes imunomarcados. As áreas marcadas em verde dentro dos delimitadores, representam presença de Osteopontina na formação de matriz óssea.



Fonte: O autor, 2020

3.5 Análise estatística

A análise dos dados obtidos das imagens dos cortes histológicos corados com o tricrômico de Masson, e imunomarcados para VEGF e Osteopontina foram feitas com o auxílio do software Prism 6.0 (GraphPad Software, inc). Realizamos o teste de distribuição *D'Agostino & Pearson omnibus* para análise de distribuição em função do n pequeno. Para a comparação entre os grupos usamos o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5 % ($P \leq 0,05$) e pós teste de Dunn. Foi complementada com a comparação dos grupos em pares, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada de acordo com os objetivos do trabalho. A hidroxiapatita sintética pura foi comparada com a hidroxiapatita bovina pura, e com a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO (o grupo 1 foi comparado com o grupo 2 e 3); a hidroxiapatita bovina pura foi comparada com a hidroxiapatita sintética pura e hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO (grupo 2 comparado com o grupo 1 e 4); a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO foi comparada com a hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO (grupo 3 comparado com o grupo 4) e, o grupo controle foi comparado com todos os grupos: hidroxiapatita sintética pura, bovina pura, sintética enriquecida com a FMMO, e bovina enriquecida com a FMMO (grupo controle comprado com grupo 1,2,3,4).

4- RESULTADOS

Os resultados obtidos durante a elaboração deste trabalho foram demonstrados por análise estatísticas com representações através de gráficos e tabelas. Os dados de cada grupo foram representados graficamente no formato Boxplot usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor encontrado, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75% e o maior valor encontrado. Foi realizado uma prancha ilustrativa dos cortes histológicos dos grupos controle, 1, 2, 3 e 4 dos materiais corados com tricrômico de Masson e marcados pelas técnicas da imunoperoxidase para VEGF e Osteopontina com barra de calibração com 50 μm . representando um aumento de 400 x (Figura 19).

4.1 Análise histomorfométrica do material corado com tricrômico de Masson

Na avaliação dos intergrupos com o teste de distribuição *D'Agostino & Pearson omnibus* em função do n pequeno. Para a comparação entre os grupos usamos o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5 % ($P - \text{Valor} \leq 0,05$) e pós teste de Dunn. Foi Observado não existir diferença significativa entre os grupos 1,2,3, e 4. Porém, existindo diferença significativa entre esses grupos e o grupo controle que não recebeu tratamento (Gráfico 1, Tabelas 1,2). Estas análise foram complementadas através da comparação dos grupos em pares, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% ($P - \text{Valor} \leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada de acordo com os objetivos do trabalho, da seguinte forma: a hidroxiapatita sintética pura foi comparada com a hidroxiapatita bovina pura ($P - \text{Valor} = 0,6294$), e com a com a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO ($P - \text{Valor} = 0,3231$) (o grupo 1 foi comparado com o grupo 2 e 3); a hidroxiapatita bovina pura foi comparada com a hidroxiapatita sintética pura ($P - \text{valor} = 0,6294$) e hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO (0,4945) (grupo 2 comparado com o grupo 1 e 4); a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO foi comparada com a hidroxiapatita bovina enriquecida

com a FMMO (P- valor = 0,7023) (grupo 3 comparado com o grupo 4) e, o grupo controle foi comparado com todos os grupos: hidroxiapatita sintética pura, bovina pura, sintética enriquecida com a FMMO, e bovina enriquecida com a FMMO (P – valor <0,001) (grupo controle comparado com grupo 1,2,3,4). (Gráfico 1 Tabela 3).

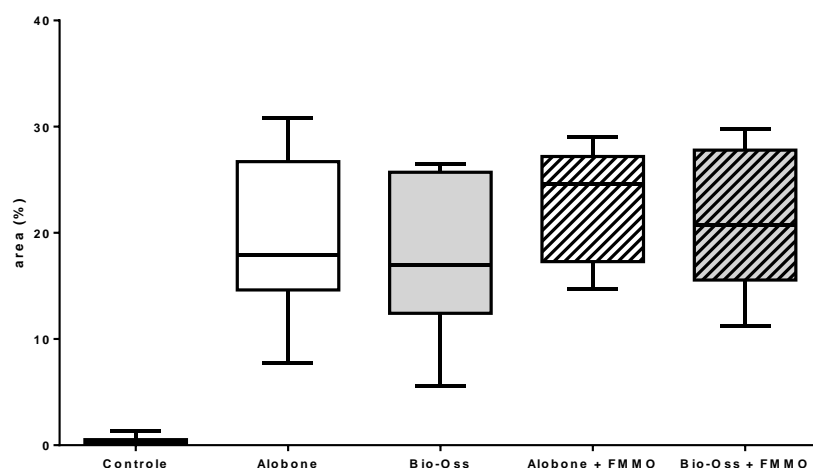
4.2 Análise imunomarcção para VEGF

Na avaliação intergrupos com teste de distribuição *D'Agostino & Pearson omnibus* em função do n pequeno. Para a comparação entre os grupos usamos o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5 % (P – Valor $\leq 0,05$) e pós teste de Dunn. Foi Observado não existir diferença significativa entre os grupos 1,2,3, e 4. Porém, existindo diferença significativa entre esses grupos e o grupo controle que não recebeu tratamento (Gráfico 2 Tabelas 4,5). Estas análise foram complementadas através da comparação dos grupos em pares, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P- Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada de acordo com os objetivos do trabalho, da seguinte forma: a hidroxiapatita sintética pura foi comparada com a hidroxiapatita bovina pura (P- Valor = 0,3754), e com a com a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO(P – Valor = 0,1930) (o grupo 1 foi comparado com o grupo 2 e 3); a hidroxiapatita bovina pura foi comparada com a hidroxiapatita sintética pura (P- Valor=0,3754) e hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO (P-Valor =0.4331) (grupo 2 comparado com o grupo 1 e 4); a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO foi comparada com a hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO (P-Valor =0.8541) (grupo 3 comparado com o grupo 4) e, o grupo controle foi comparado com todos os grupos: hidroxiapatita sintética pura, bovina pura, sintética enriquecida com a FMMO, e bovina enriquecida com a FMMO (P – Valor < 0,001) (grupo controle comprado com grupo 1,2,3,4). (Gráfico 2, Tabela 6).

4.3 Análise imunomarcção para Osteopontina

Na avaliação intergrupos com teste de distribuição *D'Agostino & Pearson omnibus* em função do n pequeno. Para a comparação entre os grupos usamos o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5 % ($P - \text{valor} \leq 0,05$) e pós teste de Dunn. Foi Observado não existir diferença significativa entre os grupos 1,2,3, e 4, entretanto com diferença estatística significante entre grupo controle e os grupos 1 e 2, 3 e 4. (Gráfico 3, Tabelas 7,8). Estas análise foram complementadas através da comparação dos grupos em pares, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% ($P\text{- Valor} \leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada de acordo com os objetivos do trabalho, da seguinte forma: a hidroxiapatita sintética pura foi comparada com a hidroxiapatita bovina pura ($P\text{- Valor} = 0,4945$), e com a com a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO ($P - \text{Valor} = 0,4331$) (o grupo 1 foi comparado com o grupo 2 e 3); a hidroxiapatita bovina pura foi comparada com a hidroxiapatita sintética pura ($P\text{-Valor}=0,4945$) e hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO ($P\text{-Valor} =0,2317$) (grupo 2 comparado com o grupo 1 e 4); a hidroxiapatita sintética enriquecida com a FMMO foi comparada com a hidroxiapatita bovina enriquecida com a FMMO ($P\text{-Valor} =0,1593$) (grupo 3 comparado com o grupo 4), e o grupo controle foi comparado com todos os demais grupos: hidroxiapatita sintética pura, bovina pura, sintética enriquecida com a FMMO, e bovina enriquecida com a FMMO ($P - \text{Valor} < 0,001$) grupo controle comparado com grupo 1,2,3,4). (Gráfico 3, Tabela 9).

Gráfico 1- Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de coloração do tricrômico de Masson pela análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos.



Fonte: o autor, 2020.

Tabela 1 - Análise de resultados de todos os grupos, cortes corados com tricrômico de Masson – através do teste estatístico Kruskal – Wallis.

<i>Teste Kruskal-Wallis</i>	
Tabela analisada	% área
Valor de P	0,0005
Valor de P exato ou aproximado?	aproximado
Resumo do valor de P	***
Diferença significativa. ($P < 0.05$)	sim
Número de grupos	5
Kruskal-Wallis estatístico	19,85
Resumos dos dados	
Número de grupos	5
N total dos 5 grupos	40

Fonte: o autor, 2020

Tabela 2 - Análise de resultados de todos os grupos, cortes corados com tricrômico de Masson – através do teste de comparações múltiplas de Dunn.

<i>Teste de comparações múltiplas de DUNN – histomorfometria - tricrômico de Masson</i>	<i>Diferença significativa</i>
Controle vs. G1	sim
Controle vs. G2	sim
Controle vs. G3	sim
Controle vs. G4	sim
G1 vs. G2	não
G1 vs. G3	não
G1 vs. G4	não
G2 vs. G3	não
G2 vs. G4	não
G3 vs. G4	não

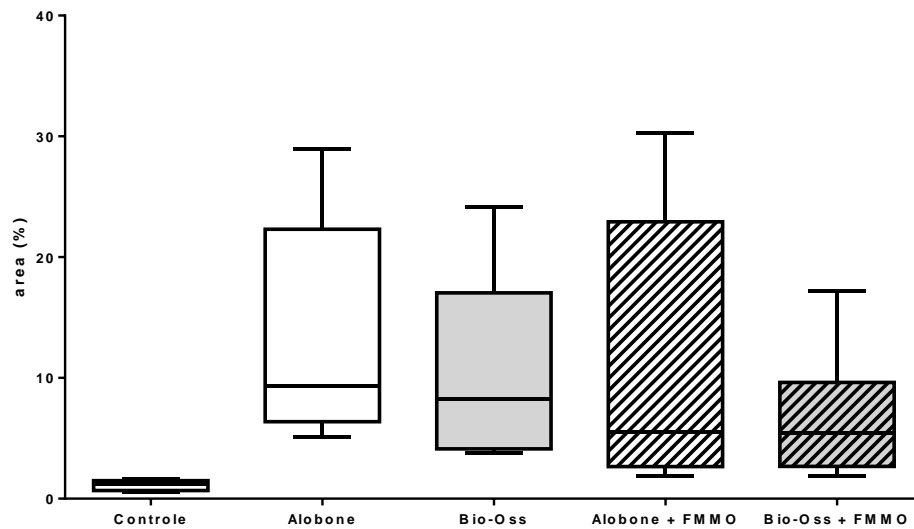
Fonte: o autor, 2020.

Tabela 3 -Análise de resultados em pares dos cortes corados com tricrômico de Masson, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P-Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.

<i>Teste de comparação entre 2 grupos Mann- Whitney Histomorfometria tricrômico de Masson</i>	<i>Valor de P</i>
Controle vs. G1	<0,001
Controle vs. G2	<0,001
Controle vs. G3	<0,001
Controle vs. G4	<0,001
G1 vs. G2	0,6294
G1 vs. G3	0,3231
G2 vs. G4	0,4945
G3 vs. G4	0,7023

Fonte: o autor, 2020.

Gráfico 2- Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de imunomarcção VEGF análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos.



Fonte: o autor, 2020

Tabela 4 - Análise de resultados dos cortes de todos os grupos imunomarcados com VEGF – através do teste estatístico Kruskal – Wallis.

<i>Teste Kruskal-Wallis</i>	
Tabela analisada	% área
Valor de P	0,0003
Valor de P exato ou aproximado?	aproximado
Resumo do valor de P	***
Diferença significativa. ($P < 0.05$)	sim
Número de grupos	5
Kruskal-Wallis estatístico	29.92
Resumos dos dados	
Número de grupos	5
N total dos 5 grupos	40

Fonte: o autor, 2020.

Tabela 5 - Análise de resultados de todos os grupos, cortes imunomarcados com VEGF – através do teste de comparações múltiplas de Dunn.

<i>Teste de comparações múltiplas de DUNN imuno-histoquímica –VEGF</i>	<i>Diferença significativa</i>
Controle vs. G1	sim
Controle vs. G2	sim
Controle vs. G3	sim
Controle vs. G4	sim
G1 vs. G2	não
G1 vs. G3	não
G1 vs. G4	não
G2 vs. G3	não
G2 vs. G4	não
G3 vs. G4	não

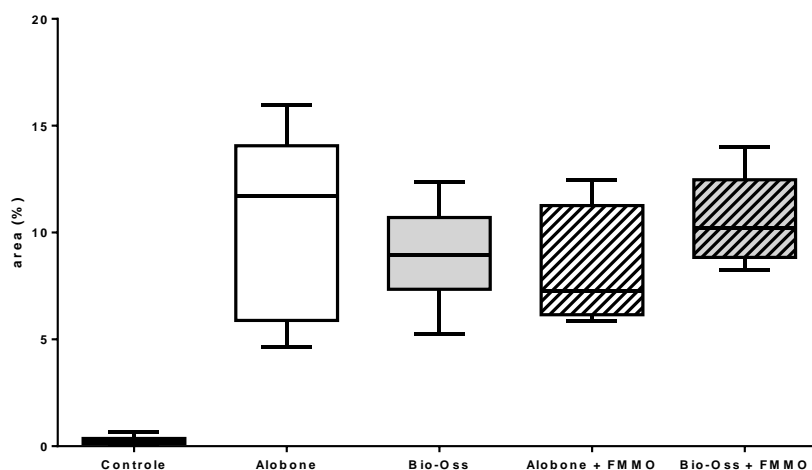
Fonte: o autor, 2020.

Tabela 6 - Análise de resultados em pares dos cortes imunomarcados com VEGF, através do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P- Valor \leq 0,05), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.

<i>Teste de comparação entre 2 grupos Mann-Whitney - VEGF</i>	<i>Valor de P</i>
Controle vs. G1	<0,001
Controle vs. G2	<0,001
Controle vs. G3	<0,001
Controle vs. G4	<0,001
G1 vs. G2	0,3754
G1 vs. G3	0,1930
G2 vs. G4	0.4331
G3 vs. G4	0.8541

Fonte: o autor. 2020.

Gráfico 3- Formato Boxplot. Usando como pontos de plotagem para cada grupo o menor valor, o quartil 25%, a mediana, o quartil 75%, o maior valor. Técnica de imunomarcção da Osteopontina pela análise do teste estatístico Kruskal – Wallis com pós teste de Dunn entre os grupos.



Fonte: O autor, 2020.

Tabela 7 - Análise de resultados dos cortes de todos os grupos imunomarcados com Osteopontina, através do teste estatístico Kruskal – Wallis.

<i>Teste Kruskal-Wallis</i>	
Tabela analisada	% área
Valor de P	0,0004
Valor de P exato ou aproximado?	aproximado
Resumo do valor de P	***
Diferença significativa. ($P < 0.05$)	sim
Número de grupos	5
Kruskal-Wallis estatístico	20,36
Resumos dos dados	
Número de grupos	5
N total dos 5 grupos	40

Fonte: O autor, 2020

Tabela 8 - Análise de resultados de todos os grupos, cortes imunomarcados com Osteopontina através do teste estatístico de comparações múltiplas de Dunn.

<i>Teste de comparações múltiplas de DUNN – imuno-histoquímica -Osteopontina</i>	<i>Diferença significativa</i>
Controle vs. G1	sim
Controle vs. G2	sim
Controle vs. G3	sim
Controle vs. G4	sim
G1 vs. G2	não
G1 vs. G3	não
G1 vs. G4	não
G2 vs. G3	não
G2 vs. G4	não
G3 vs. G4	não

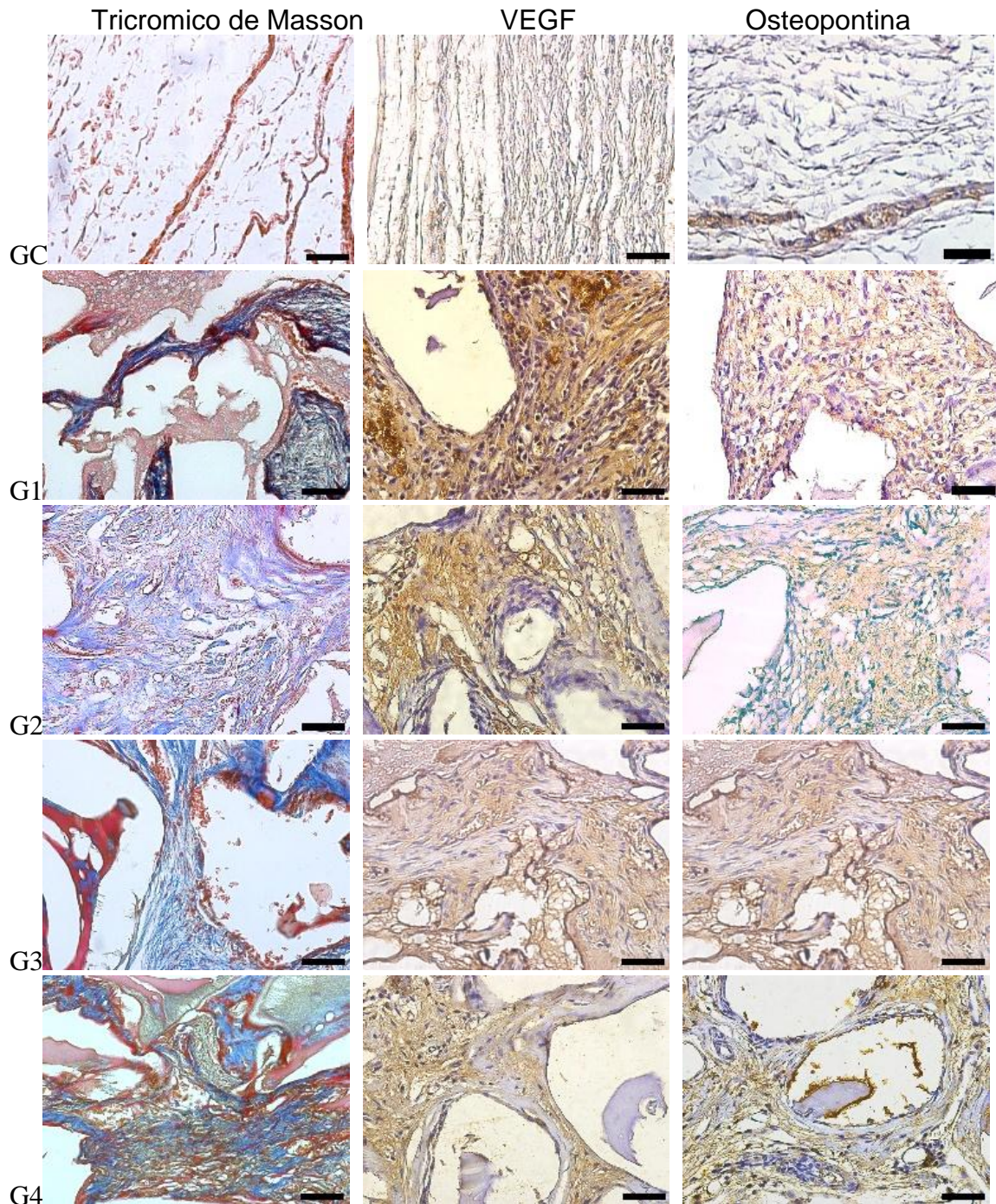
Fonte: O autor, 2020

Tabela 9 - Análise de resultados cortes imunomarcados com Osteopontina, através do teste de comparação estatístico de Mann-Whitney com nível de significância de 5% (P Valor $\leq 0,05$), onde foi considerado a modalidade de tratamento executada.

<i>Teste de comparação entre 2 grupos Mann-Whitney – imuno-histoquímica Osteopontina</i>	<i>Valor de P</i>
Controle vs. G1	<0,001
Controle vs. G2	<0,001
Controle vs. G3	<0,001
Controle vs. G4	<0,001
G1 vs. G2	0,4945
G1 vs. G3	0,4331
G2 vs. G4	0,2317
G3 vs. G4	0,1593

Fonte: O autor, 2020.

Figura 19 – Fotomicrografia das análises dos grupos controle, 1, 2, 3 e 4 histomorfometria do material corados com tricrômico de Masson e marcados pelas técnicas da imunoperoxidase para VEGF e Osteopontina. Barra de calibração com 50 µm.



Fonte: o autor,2020

5 - DISCUSSÃO

Os processos de osseointegração e osteocondução são influenciados por fatores físicos e químicos do material, que inclui o tamanho, a morfologia dos grânulos, a área de superfície e a relação cálcio/fósforo da sua composição.⁶¹ Estas características físico-química dos biomateriais, que inclui porosidade, cristalinidade e tamanho da partícula, influenciam diretamente no comportamento biológico in vivo dos biomateriais após sua utilização.^{9,80,81}

A hidroxiapatita possui boa condutividade celular⁸² e permite uma boa estrutura para a rede de fibrina.⁸³ Essas características tornam a hidroxiapatita sintética e bovina alternativas clínicas ao enxerto ósseo autógeno, utilizados nas cirurgias de enxerto ósseo com excelentes respostas biológicas.^{75,82,84} A hidroxiapatita é utilizada na reconstrução óssea guiada, juntamente com barreiras oclusivas, tela de titânio, membranas de colágeno, entre outras aplicações.⁸⁵ A perfuração cortical do osso receptor, em adição com os substitutos ósseos sintéticos, pode melhorar a angiogênese e aumentar a quantidade de osso recém-formado, principalmente nos estágios iniciais da cicatrização óssea.⁸⁶

O uso de biomateriais compostos com HA / beta-TCP induziu maior formação óssea cortical do que outros biomateriais utilizados como enxerto. A explicação é que a rápida reabsorção do beta-TCP promove melhor vascularização e induz uma formação óssea mais medular. Por outro lado, a baixa reabsorção da hidroxiapatita confere à área regenerada a dureza necessária para a formação óssea mais cortical.^{87,88}

A propriedade osteoindutora do β -TCP recentemente foi relatada em ressecção fibular em humanos após 3 meses de cirurgia, porém existem várias limitações a este estudo, como o n pequeno, o estudo incluir pacientes com apenas acompanhamento de curto prazo, e não ter o grupo controle.¹⁵ O uso de materiais osteoindutores, isto é, materiais capazes de direcionar células-tronco mesenquimais para a linhagem osteogênica foi demonstrado pela primeira vez, e a osteoindução intrínseca, é o resultado da depleção de cálcio e ou fosfato, explicando assim por que não apenas a composição do material (superfície), mas também o volume e

sua arquitetura (por exemplo, porosidade, tamanho do poro) desempenham um papel decisivo neste processo.¹⁶

Comparando a regeneração de defeitos ósseos críticos em calvaria de ratos Sprague Dawley, utilizando xenoenxerto e hidroxiapatita sintética, ambos puros, foi demonstrado não haver diferença estatística entre ambos na neoformação óssea.⁴³

O mesmo foi observado em nosso estudo, onde resultado do grupo 1 regenerado com hidroxiapatita sintética (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil), e do grupo 2 regenerados com hidroxiapatita bovina, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça), não apresentaram diferença estatisticamente significativa na avaliação histomorfométrica (tricroômico de Masson) e imunomarcação (VEGF e Osteopontina).

Corroborando com o nosso estudo, foi verificado na pesquisa em alvéolos dentários de coelhos, respostas teciduais semelhantes para os dois biomateriais estudados,⁶⁹ assim como no estudo clínico randomizado RTC com desenho de boca dividida, em humanos, comparando uma nano hidroxiapatita sinterizada pura (NHA) e osso bovino inorgânico (ABB), onde não houve diferença estatisticamente significante.⁸⁹

Em estudo em calvaria de coelhos comparando hidroxiapatita pura e osso xenógeno puro e associado a rhBMP-2 ambos os materiais de substituição óssea (HA / SiO e DBBM) apresentaram uma quantidade semelhante de formação óssea ao longo de 8 semanas, tendo como principal diferença a adição de rhBMP-2, que pode oferecer benefícios adicionais em termos de osso neoformado. As diferenças derivam principalmente do fato de que o HA / SiO parece degradar mais rapidamente com uma taxa de rotatividade mais alta, deixando assim espaço para um pouco mais de formação óssea, enquanto o DBBM parece degradar em uma taxa mais lenta.³⁹ Outros estudos corroboram os mesmos resultados relativos ao maior percentual de material residual do enxerto xenógeno.^{38,47} Resultados promissores em nível de formação óssea foi apresentado em uma cerâmica óssea, (Straumann®) totalmente aloplástica,³⁸ assim como, o uso de “bloco de dentina”, que não apresentaram reações

teciduais no hospedeiro, com uma taxa favorável de reabsorção e formação óssea.⁴⁰

Dentre as técnicas de terapia celular, tais como o aspirado da medula óssea (BMA), o aspirado concentrado de medula óssea (BMAC), concentrado da fração mononuclear da medula óssea (FMMO) e a cultura de células tronco mesenquimais da medula óssea. A mais simples de ser realizada é o aspirado da medula óssea,^{90,91} porém parece ficar aquém das técnicas que envolvam algum tipo de processamento da medula óssea.^{8,18}

Um estudo de boca dividida, em ensaio clínico randomizado, (RTC) o aspirado de medula óssea tibial não concentrado BMA associado ao xenoenxerto (Bio-Oss®; Geistlich Pharma) e o xenoenxerto puro (Bio-Oss®; Geistlich Pharma) ou associado ao aspirado concentrado da medula óssea BMAC, em seios maxilares, concluiu que tanto BMA quanto o BMAC não mostraram ter um impacto evidente na redução de volume, necessitando sempre de mais biomaterial para compensar essa perda de volume.⁵¹ Na avaliação da neoformação óssea precoce com o uso de enxertos xenógenos no seio maxilar, associados ou não ao aspirado de medula óssea concentrado BMAC em humanos, não houve diferença estatística entre os grupos, com nenhum impacto positivo do BMAC, na neoformação óssea associado ao enxerto osso xenógeno.⁴⁹ Porém, resultados diferentes advogando o uso de concentrado de aspirado de medula óssea BMAC em combinação com mineral ósseo bovino BBM, mostraram uma alternativa similar ao osso autógeno,⁵² alcançando melhores resultados clínicos na reabilitação com implantes.⁶⁷

Comparando métodos como o da obtenção de fração mononuclear por intermédio do método Ficoll – Histopaque, e do aspirado concentrado de medula óssea pelo método que aplica BMAC, associados a um biomaterial de origem bovina a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa, sugerindo que o sistema BMAC é efetivo, e um método mais prático para a aplicação clínica do que o Ficoll.⁴⁷ Resultados semelhantes foram observados no estudo de boca dividida. no qual o aumento do seio com o uso do método BMAC foi comparado com o método convencional, que envolve a mistura de biomateriais com osso autógeno.⁹² Porém em estudo de regeneração óssea realizado, com defeitos ósseos críticos bilaterais constatou-se que o uso da fração mononuclear da medula óssea FMMO associado à biomaterial xenógeno mostrou resultado positivo de porcentagem óssea

neoformada, e quando comparado ao biomaterial sozinho, apresentou aproximadamente metade de formação óssea verificada no osso autógeno,¹⁸ sendo comparada ao potencial osteogênico das células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da medula purificada, apesar da FMMO conter inicialmente muito menos células progenitoras de origem mesenquimal. Estes resultados sugerem novas abordagens para o tratamento de defeitos ósseos, e em particular nos casos em que uma vascularização robusta é necessária para promover a cicatrização.⁹³

Em nosso trabalho utilizamos a FMMO nos grupos 3 e 4, onde respectivamente a hidroxiapatita sintética (Alobone poros Osseocon Biomateriais Ltda., Rio de Janeiro/RJ, Brasil), e a hidroxiapatita bovina, Bio-Oss Small (Bio-Oss® Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça) foram enriquecidas com a FMMO. Ambos os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significativa na avaliação histomorfométrica (dos cortes corados com tricrômico de Masson) e imunomarcados (VEGF e Osteopontina), tanto entre eles, quanto comparada com o uso de biomateriais puros, usados nos grupos 1 e 2.

Em relação ao tecido adiposo, um estudo pioneiro em humanos usando preparações de células-tronco adiposas autólogas recém-isoladas (a fração vascular estromal [SVF] do tecido adiposo) aplicada em um procedimento cirúrgico de uma etapa, na cirurgia de levantamento de seio maxilar, com uma cerâmica de fosfato de cálcio (CaP) demonstrou um efeito adicional positivo,⁵⁸ assim como defeitos tratados com células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSCs) mostraram um aumento significativo na área de regeneração óssea após 3 meses de cicatrização.⁶⁰ Porém, na comparação entre a capacidade de formação óssea rápida de células-tronco derivadas do tecido adiposo (ADMSCs) e células-tronco da medula óssea (BMSCs), a BMSCs promoveu rápida e melhor regeneração óssea durante toda ao período de observação.⁹⁴ Mostrando ainda, que múltiplas inoculações de BMSCs em arcabouços de beta tricálcio fosfato (B-TCP) com quitosan aumentariam a formação e reconstrução de novo osso, com uma eficácia maior, do que a inoculação única, e a viabilidade celular também foi maior quando foi inoculado três vezes. Além disso, uma única inoculação com alta dose de células gera uma grande perda dessas células.²⁴

O plasma rico em plaquetas (PRP) com a aplicação local na regeneração óssea em defeitos cranianos em coelhos, mostrou melhoras significativamente da cicatrização em 4 semanas.⁹⁵ Quando associado com o osso bovino também mostrou possuir resultados favoráveis na regeneração óssea de defeitos críticos comparado com o coágulo.⁹⁶

A associação da CTMs com PRF mostrou resultados favoráveis. O PRF, devido à sua rica rede de fibrina e ao conteúdo de fatores de crescimento, é capaz de fornecer suporte e nutrição para o crescimento, proliferação e diferenciação de CTMs e, assim, aumentar significativamente a capacidade osteogênica da CTM in vitro e in vivo.⁹⁷ O mesmo foi observado com fator de crescimento concentrado (CGF), um biomaterial rico em leucócitos e rico em plaquetas (L-PRF), denominado "concentrado de plaquetas de segunda, e um extrato de CGF, combinado com células tronco da medula óssea (CTMs), promoveram a proliferação, maturação osteogênica e mineralização de células-tronco mesenquimais in vitro, e a terapia combinada com CGF e CTMs, surtiu excelente cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico in vivo.²² Porém, em recente metá-análise onde foi avaliada as evidências da utilização da engenharia tecidual com o uso de CTMs, foi rejeitada a hipótese em termos de resultados histomorfométrico, de ganhos ósseos e redução nas perdas de implantes na maxila atrófica.⁹⁸

Até o momento, não há consenso sobre a melhor metodologia para o uso das células tronco mesenquimais CTMs. Embora as culturas celulares possam aumentar o número de células osteogênicas, não foi observado o aumento do potencial osteogênico ao usar a técnica de cultura de células em comparação à medula óssea fresca.^{99,100} A cultura de células-tronco tem muito mais desvantagens, em comparação com a fração mononuclear ou medula óssea fresca. Essas deficiências incluem: custo, tempo necessário entre a colheita e o transplante, risco de contaminação e falta de concordância em relação ao número de células necessárias.¹⁰¹ Além de intercorrência relativa ao potencial de crescimento ósseo descontrolado, com obstrução dos forames, fusões vertebrais e compressão de raízes dos nervos, com o aumento do risco de complicações e eventos adversos para pacientes que a recebem, em cirurgias de coluna. Esse risco de eventos adversos associados ao rhBMP-2 é de 10 a 50 vezes as estimativas originais relatadas nas publicações revisadas por pares patrocinadas pela indústria.¹⁰²

CONCLUSÃO

Com os limites deste estudo, tanto a hidroxiapatita sintética quanto a hidroxiapatita bovina enriquecidas com fração mononuclear da medula óssea, demonstraram não influenciar a regeneração de defeitos ósseos críticos quando comparados ao uso desses biomateriais isoladamente. No entanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar esses resultados.

REFERÊNCIAS

1. Pelegrine, A ; Aloise, A; Sorgi E. Células tronco em Implantodontia. São Paulo: Editora Napoleão LTDA; 2013. 1–244 p.
2. Willenbacher M, Al-Nawas B, Berres M, Kämmerer PW, Schiegnitz E. The Effects of Alveolar Ridge Preservation: A Meta-Analysis. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016;18(6):1248–68.
3. Sapata VM, Llanos AH, Cesar Neto JB, Jung RE, Thoma DS, Hämmerle CHF, et al. Deproteinized bovine bone mineral is non-inferior to deproteinized bovine bone mineral with 10% collagen in maintaining the soft tissue contour post-extraction: A randomized trial. *Clin Oral Implants Res.* 2020;31(3):294–301.
4. Araújo MG, da Silva JCC, de Mendonça AF, Lindhe J. Ridge alterations following grafting of fresh extraction sockets in man: A randomized clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):407–12.
5. Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: What can we learn? *Periodontol 2000.* 2015;68(1):122–34.
6. Lee J-E, Heo S-J, Koak J-Y, Kim S-K, Han C-H. Bone regeneration with rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells and bone graft materials. *Int J Oral Maxillofac Implants [Internet].* 2012;27(6):1389–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23189288>
7. Vignoletti F, Matesanz P, Rodrigo D, Figuero E, Martin C, Sanz M. Surgical protocols for ridge preservation after tooth extraction. A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(SUPPL. 5):22–38.
8. 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 Implants Res.* 2014;25(5):567–72.
9. CONZ MB, GRANJEIRO JM SG. Physicochemical Characterization of six Commercial Hydroxyapatites for Medical-Dental Applications as Bone Graft. *J Appl Oral Sci.* 2005;13 (2):((2):):136-40.
10. Coelho de Faria A, Chiantia F, Teixeira M, Aloise A, Pelegrine A. Comparative Study Between Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and from

- Adipose Tissue, Associated with Xenograft, in Appositional Reconstructions: Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016 Nov;31(6):e155–61.
11. Misch CE. *Implantes Dentais Contemporâneo. 3 a EDIÇÃO*. Rio de Janeiro: Mosby Elsevier; 2008. 3\1089.
 12. Buser D. *Regeneração Óssea Guiada na Implantodontia. 2 edição*. São Paulo: Quintessence Editora LTDA; 2010. 1–261 p.
 13. URBAN I. *Aumento Vertical e horizontal do rebordo. 1 Edição*. Rui Santos, editor. São Paulo: Quintessence Publishing Brasil; 2017. 1–389 p.
 14. Mazzone R, Duque Neto H, Nascimento F. *Enxerto Ósseo em Implantodontia. 1 Edição*. São Paulo: Editora Napoleão LTDA; 2012. 1–573 p.
 15. Ariizumi T, Kawashima H, Hatano H, Yamagishi T, Oike N. Osteoinduction and Osteoconduction with Porous Beta-Tricalcium Phosphate Implanted after Fibular Resection in Humans. *J Biomater an nanobiotechnology*. 2019;10(10):159–73.
 16. Bohner M, Miron RJ. A proposed mechanism for material-induced heterotopic ossification. *Mater Today [Internet]*. 2019;22(February):132–41. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2018.10.036>
 17. Pereira LDV. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Cienc e Saude Coletiva*. 2008;13(1):7–14.
 18. Oliveira R, Pelegri A, Aloise A, Ferreira L. Xenograft Impregnated with Bone Marrow Mononuclear Fraction for Appositional Bone Regeneration in Rabbit Calvaria: A Clinical and Histomorphometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014 Jul;29(4):962–8.
 19. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, et al. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;105(5):14–24.
 20. Ito K, Yamada Y, Nakamura S, Ueda M. Osteogenic potential of effective bone engineering using dental pulp stem cells, bone marrow stem cells, and periosteal cells for osseointegration of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants [Internet]*. 2011;26(5):947–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22010075>

21. Katagiri W, Kawai T, Osugi M, Sugimura-wakayama Y, Sakaguchi K. Angiogenesis in newly regenerated bone by secretomes of human mesenchymal stem cells. 2017;
22. Honda H, Tamai N. Bone tissue engineering with bone marrow-derived stromal cells integrated with concentrated growth factor in *Rattus norvegicus* calvaria defect model. *J Artif Organ*. 2013;
23. Wang XI, Li G, Guo JIA, Yang LEI, Liu Y, Sun Q, et al. Hybrid composites of mesenchymal stem cell sheets , hydroxyapatite , and platelet - rich fibrin granules for bone regeneration in a rabbit calvarial critical - size defect model. *Exp Ther Med* 13. 2017;13:1891–9.
24. Cheng G, Li Z, Xing X, Li D-Q, Li Z-B. Multiple Inoculations of Bone Marrow Stromal Cells into Beta-Tricalcium Phosphate/Chitosan Scaffolds Enhances the Formation and Reconstruction of New Bone. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(1):204–15.
25. Maglione M, Salvador E, Ruaro ME, Melato M, Tromba G, Angerame D, et al. Bone regeneration with adipose derived stem cells in a rabbit model. *J Biomed Res*. 2019;33(1):38–45.
26. Zimmermann A, Pelegrine A, Peruzzo D, Martinez E, de Mello e Oliveira R, Aloise A, et al. Adipose Mesenchymal Stem Cells Associated with Xenograft in a Guided Bone Regeneration Model: A Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(6):1415–22.
27. Pelegrine AA, Da Costa CES, Sendyk WR, Gromatzky 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(3):171–84.
28. De Oliveira E Silva M, Pelegrine AA, Alves Pinheiro Da Silva A, Manhães Júnior LR, De Mello E Oliveira R, Gaiba França S, et al. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: A tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Biomater*. 2012;2012.
29. Pelegrine AA, Da Costa CES, Correa MEP, Marques JFC. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(5):535–42.
30. Takeda Y, Katsutoshi K, Matsuzaka K, Inoue T. The Effect of Concentrated Growth Factor on Rat Bone Marrow Cells In Vitro and on Calvarial Bone

- Healing In Vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(5):1187–96.
31. Tsuchiya S, Hara K, Ikeno M, Okamoto Y, Hibi H, Ueda M. Rat Bone Marrow Stromal Cell–Conditioned Medium Promotes Early Osseointegration of Titanium Implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(5):1360–9.
 32. Veis A, Koungias K, Tsirlis A, Parisis N, Papadopoulou C, Romanos GE. Evaluation of the osteogenic potential in experimental defects, with and without bone marrow, in the rabbit tibia: a pilot study. *Int J Oral Maxillofac Implants* [Internet]. 2009;24(6):1054–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20162109>
 33. Houshmand B, Behnia H, Khoshzaban A, Morad G, Behrouzi G, Dashti SG, et al. Osteoblastic Differentiation of Human Stem Cells Derived from Bone Marrow and Periodontal Ligament Under the Effect of Enamel Matrix Derivative and Transforming Growth Factor-Beta. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(6):e440–50.
 34. Shao J, Zhang W, Yang T. Using mesenchymal stem cells as a therapy for bone regeneration and repairing. *Biol Res*. 2015;1–7.
 35. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2012;56(3):151–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.06.001>
 36. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2012;56(4):229–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.10.001>
 37. Sadeghi R, Najafi M, Semyari H, Mashhadiabbas F. Histologische und histomorphometrische Evaluierung der Knochenregeneration mit nanokristallinem Hydroxylapatit und mit humanem gefriergetrocknetem Knochen: Eine experimentelle Studie am Kaninchenmodell. *J Orofac Orthop*. 2017;78(2):144–52.
 38. Takauti CAY, Futema F, De Brito Junior RB, Abrahao AC, Costa C, Queiroz CS. Assessment of Bone Healing in Rabbit Calvaria grafted with three different Biomaterials. *Braz Dent J*. 2014;25(5):379–84.
 39. Thoma DS, Kruse A, Ghayor C, Jung RE, Weber FE. Bone augmentation using a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute materials with and without recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(5):592–8.

40. Andrade C, Camino J, Nally M, Quirynen M, Martínez B, Pinto N. Combining autologous particulate dentin, L-PRF, and fibrinogen to create a matrix for predictable ridge preservation: a pilot clinical study. *Clin Oral Investig*. 2019;
41. Benic GI, Thoma DS, Muñoz F, Sanz Martin I, Jung RE, Hämmerle CHF. Guided bone regeneration of peri-implant defects with particulated and block xenogenic bone substitutes. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(5):567–76.
42. Maréchal M, Eyckmans J, Schrooten J, Schepers E, Luyten FP, van Steenberghe D. Bone Augmentation With Autologous Periosteal Cells and Two Different Calcium Phosphate Scaffolds Under an Occlusive Titanium Barrier: An Experimental Study in Rabbits. *J Periodontol*. 2008;79(5):896–904.
43. Kim R-W, Kim J-H, Moon S-Y. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2016;38(1):2–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40902-016-0072-2>
44. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Nicoli Aldini N, Cordioli G. Role of Intramarrow Penetration in Osseous Repair: A Pilot Study in the Rabbit Calvaria. *J Periodontol*. 1999;70(12):1501–10.
45. Teixeira, L J C; Anjos C A; Soares, MM; Vidigal Jr, GM, Conz M. Cultura de células na Implantologia Oral : revisão da literatura Cells culture in Oral Implantology : review of literature. *ImplantNews*. 2009;6(5):479–83.
46. Stumbras A, Martynas DDS, Krukis M, Januzis SDSG, Juodzbaly G. Regenerative bone potential after sinus floor elevation using various bone graft materials : a systematic review. *Oral Surg*. 2019;50(7):548–58.
47. Duttenhoefer F, Hieber SF, Stricker A, Schmelzeisen R, Gutwald R, Sauerbier S. Follow-Up of Implant Survival Comparing Ficoll and Bone Marrow Aspirate Concentrate Methods for Hard Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells in Humans. *Biores Open Access*. 2014;3(2):75–6.
48. Aloise A, Pelegrine A, Zimmermann A, de Mello e Oliveira R, Ferreira L. Repair of Critical-Size Bone Defects Using Bone Marrow Stem Cells or Autogenous Bone With or Without Collagen Membrane: A Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(1):208–15.
49. Wildburger A, Payer M, Jakse N, Strunk D, Etchard-Liechtenstein N, Sauerbier S. Impact of autogenous concentrated bone marrow aspirate on bone regeneration after sinus floor augmentation with a bovine bone substitute - a split-mouth pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(10):1175–81.

50. Rickert D, Vissink A, Slot WJ, Sauerbier S, Meijer HJA, Raghoobar GM. Maxillary sinus floor elevation surgery with BioOss® mixed with a bone marrow concentrate or autogenous bone: Test of principle on implant survival and clinical performance. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2014;43(2):243–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2013.09.006>
51. 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. *COIR*. 2014;25:221–5.
52. Sununliganon L, Peng L, Singhatanadgit W, Cheung LK. Osteogenic efficacy of bone marrow concentrate in rabbit maxillary sinus grafting. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. 2014;42(8):1753–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2014.06.011>
53. Ting M, Afshar P, Adhami A, Braid SM, Suzuki JB. Maxillary sinus augmentation using chairside bone marrow aspirate concentrates for implant site development: a systematic review of histomorphometric studies. *Int J Implant Dent*. 2018;4(1).
54. Muench LN, Kia C, Otto A, Mehl J, Baldino JB, Cote MP, et al. The effect of a single consecutive volume aspiration on concentrated bone marrow from the proximal humerus for clinical application. *BMC Musculoskelet Disord*. 2019;20(1):1–8.
55. Hernigou P, Desroches A, Queinnec S, Flouzat Lachaniette CH, Poignard A, Allain J, et al. Morbidity of graft harvesting versus bone marrow aspiration in cell regenerative therapy. *Int Orthop*. 2014;38(9):1855–60.
56. Noda M, Ishijima M, Takamoto M, Tsuji K, Nifuji A. [Bone regeneration and Mesenchymal stem cells]. *Clin Calcium*. 2002;12(2):187–92.
57. Pelegrine AA, Teixeira ML, Sperandio M, Almada TS, Kahnberg KE, Pasquali PJ, et al. Can bone marrow aspirate concentrate change the mineralization pattern of the anterior maxilla treated with xenografts ? A preliminary study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(1):21–6.
58. Prins, JH; Schulten, EAJM; TenBruggenkate , CM; Nulend, JK; Helder M. Bone Regeneration Using the Freshly Isolated Autologous Stromal Vascular Fraction of Adipose Tissue in Combination With Calcium Phosphate Ceramics. *Tissue Eng Regen Med*. 2016;5(5):1–13.

59. Nakamura T, Shirakata Y, Shinohara Y, Miron RJ, Hasegawa-Nakamura K, Fujioka-Kobayashi M, et al. Comparison of the effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and -9 on bone formation in rat calvarial critical-size defects. *Clin Oral Investig*. 2017;21(9):2671–9.
60. Alvira-gonzález J, Sánchez-garcés MSMÀ, Sánchez CM, Gay-escoda C. Assessment of Bone Regeneration Using Adipose-Derived Stem Cells in Critical-Size Alveolar Ridge Defects : An Experimental Study in a Dog Model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2016;31(1):8–13.
61. Van Der Stok J, Van Lieshout EMM, El-Massoudi Y, Van Kralingen GH, Patka P. Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. *Acta Biomater* [Internet]. 2011;7(2):739–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.035>
62. Costain DJ, Crawford RW. Fresh-frozen vs . irradiated allograft bone in orthopaedic reconstructive surgery. 2009;40:1260–4.
63. Giannoudis P V., Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:20–7.
64. Teng F, Wei L, Yu D, Deng L, Zheng Y, Lin H, et al. Vertical bone augmentation with simultaneous implantation using deproteinized bovine bone block functionalized with a slow delivery of BMP-2. *Clin Oral Implants Res*. 2019;(September):1–14.
65. Pasquali PJ, Teixeira ML, Oliveira TA De, De Macedo LGS, Aloise AC, Pelegrine AA. Maxillary Sinus Augmentation Combining Bio-Oss with the Bone Marrow Aspirate Concentrate: A Histomorphometric Study in Humans. *Int J Biomater*. 2015;2015.
66. Wildburger A, Payer M, Jakse N, Strunk D, Etchard-Liechtenstein N, Sauerbier S. Impact of autogenous concentrated bone marrow aspirate on bone regeneration after sinus floor augmentation with a bovine bone substitute - a split-mouth pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(10):1175–81.
67. Sauerbier S, Giessenhagen B, Gutwerk W, Rauch P, Xavier SP, Oshima T, et al. Bone Marrow Aspirate Concentrate Used with Bovine Bone Mineral to Reconstruct Vertical and Horizontal Mandibular Defects: Report of Two Techniques. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2013;28(5):e310–4.
68. Zhang W, Zhang X, Wang S, Xu L, Zhang M, Wang G, et al. Comparison of the Use of Adipose Tissue – Derived and Bone Marrow – Derived Stem Cells for

- Rapid Bone Regeneration. *J Dent Res*. 2013;92(12):1136–41.
69. Machado, R B; Vidigal Jr, G M; Noleri, A B; Conz MB. Análise histomorfométrica de dois diferentes biomateriais instalados em alvéolos de coelhos Histomorphometric evaluation of two different biomaterials applied to the rabbit extraction socket model. *ImplantNews*. 2012;9(6a-PBA):75–80.
70. C J, Basílio JLE, ; Vieira MVSMHLJ. Análise Histológica de Levantamento de Seio Maxilar Utilizando Biomaterial Xenógeno Versus Sintético + L-Prf (Fibrina Rica em Plaquetas e Leucócitos). *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2018;3(1):25–9.
71. Costa, NMF; Melo , BR; Brito, RT; Fernandes G V O; Bernardo, V G ; Fonseca, E C; Conz M, Soares GAGJ. Quality and Intensity of the Tissue Response to Two Synthetic Granular Hydroxyapatite Implanted in Critical Defects of Rat Calvaria. *Mater Res*. 2009;12(2):245–51.
72. Dingal PCDP, Discher DE. Material control of stem cell differentiation : challenges in. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2014;28:46–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.11.003>
73. Leventis Minas, , George Agrogiannis , Peter Fairbairn , Orestis Vasiliadis , Danai Papavasileiou , Evangelia Theodoropoulou RH and DK. Evaluation of an In Situ Hardening β -Tricalcium.pdf. *Dent J*. 2018;6(27):2–11.
74. Bohner M. Calcium orthophosphates in medicine : from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 2000;31((supl 4)):37–47.
75. Piattelli M, Gian DDS, Favero A, Scarano A, Orsini DDSG, Piattelli DDSA. Bone Reactions to Anorganic Bovine Bone (Bio-Oss) Used in Sinus Augmentation Procedures : A Histologic Long-Term Report of 20 Cases in Humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(6):835–40.
76. Jung RE, Ha CHF, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12 – 14 years. *COIR*. 2013;24:1065–73.
77. Motta N, Costa DF, Melo BR, Tavares R, Vicentis G, Fernandes DO, et al. Techniques to study cellular response in critical size bone defect healing on rat calvaria treated with hydroxyapatite implants. *Key Eng Mater*. 2009;398:285–8.
78. CFO. Entidades de Fiscalização do Resolução CFO 157 , 8 de junho 2915. *DOU*. 2015;(126):89.
79. ANVISA. Resolução de diretoria Colegiada - RDC 338 de 20 de fevereiro de

2020. *DOU*. 2019;38:69.
80. Dalapicula, S S ; ; Vidigal Jr , G M; Conz MEC. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas . Uma revisão crítica. *Implant News*. 2006;3(5):487–91.
 81. Conz MB ;Campos C N ; Serrão SD , SoaresG A ; Vidigal Jr GM. Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. *ImplantNews*. 2010;7(4):541–6.
 82. Luo Z, Zhang Q, Zhang Z. Performance of coralline hydroxyapatite in sinus floor augmentation : a retrospective study. *Clin Oral Invest*. 2013;
 83. Sadeghi M, Bakhshandeh B, Mehdi M. Functional synergy of anti-mir221 and nanohydroxyapatite scaffold in bone tissue engineering of rat skull. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(132):1–8.
 84. Donizeti M, Soeiro L, Nunes DS, Victor R, Oliveira D, Andrade L, et al. Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss Ò) induces osteocalcin , RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *J Cranio-Maxillofacial Surg [Internet]*. 2012;40(8):e315–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2012.01.014>
 85. Salehi M, Somayeh MN. Regeneration of sciatic nerve crush injury by a hydroxyapatite nanoparticle-containing collagen type I hydrogel. *J Physiol Sci*. 2017;
 86. Sang-Hwa Lee, Pil Lim H-JY, Purpose: The Influence of Cortical Perforation on Guided Bone Regeneration Using Synthetic Bone Substitutes: A Study of Rabbit Cranial Defects. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):464–71.
 87. Brum I, Carvalho, J J; Pires J, Carvalho, MAA; Santos L, Elias C. Nanosized hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate composite : Physico - Chemical, Cytotoxicity, morphological properties and in vivo trial. *Sci Rep*. 2019;9:1–10.
 88. Kojima S, Nakamura H, Lee S, Nagata F, Kato K. Hydroxyapatite Formation on Self-Assembling Peptides with Di ffering Secondary Structures and Their Selective Adsorption for Proteins. *Int J Mol Sci Artic*. 2019;20:1–13.
 89. Stacchi C, Lombardi T, Oreglia F, Alberghini Maltoni A, Traini T. Histologic and Histomorphometric Comparison between Sintered Nanohydroxyapatite and Anorganic Bovine Xenograft in Maxillary Sinus Grafting: A Split-Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *Biomed Res Int*. 2017;1–10.
 90. Sakai S, Mishima H, Ishii T, Akaogi H, Uemura T, Ochiai N. Technical note

- Concentration of bone marrow aspirate for osteo- genic repair using simple centrifugal methods. *Acta Orthop*. 2008;79(3):445–8.
91. Yoshioka T, Mishima H. Concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation treatment for corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Int Orthop*. 2011;35:823–9.
 92. Sauerbier S, Rickert D, Gutwald R, Nagursky H, Oshima T, Xavier SP, 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 Eng - Part A*. 2011;17(17–18):2187–97.
 93. Wise JK, Alford AI, Goldstein SA, Stegemann JP. Comparison of uncultured marrow mononuclear cells and culture-expanded mesenchymal stem cells in 3d collagen-chitosan microbeads for orthopedic tissue engineering. *Tissue Eng - Part A*. 2014;20(1–2):210–24.
 94. Zhang W, Zhang X, Wang S, xu L, Zhang M, Wang G, et al. Comparison of the Use of Adipose Tissue–Derived and Bone Marrow–Derived Stem Cells for Rapid Bone Regeneration. *J Dent Res*. 2013;92(12):1136–41.
 95. Torres J, Tresguerres I, Tamimi F, Clemente C, Niembro E, Blanco L. Influence of platelet-rich plasma on bone regeneration: A histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2007;22(4):563–8.
 96. Torres J, Tamimi F, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Blanco L, et al. Effect of combining platelet-rich plasma with anorganic bovine bone on vertical bone regeneration: early healing assessment in rabbit calvariae. *Int J Oral Maxillofac Implants [Internet]*. 2010;25(1):123–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20209194>
 97. Wang Z, Weng Y, Lu S, Zong C, Qiu J, Liu Y, et al. Osteoblastic mesenchymal stem cell sheet combined with Choukroun platelet-rich fibrin induces bone formation at an ectopic site. *J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials*. 2014;00B(00):1–13.
 98. Al-Moraissi E, Oginni F, Holkom M, Mohamed A, Al-Sharani H. Tissue-Engineered Bone Using Mesenchymal Stem Cells Versus Conventional Bone Grafts in the Regeneration of Maxillary Alveolar Bone: A Systematic Review and Meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2020;35(1):79–90.
 99. Krzymanski G, Kalczak M, The WW. The use of bone-marrow- derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects : an

- experimental study. *IntJOral Maxillofac Surg* . 1997;26:55–60.
100. Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Marsh DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute , JAX TM , in association with autologous osteogenic cells and growth factors ☆. *Bone*. 2007;40:939–47.
 101. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci*. 2004;30:169–74.
 102. Carragee EJ, Hurwitz EL, Weiner BK. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery : emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* [Internet]. 2011;11(6):471–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2011.04.023>

ANEXO – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética.



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag Instituto
de Biologia
Roberto
Alcantara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da fração mononuclear de origem medular na regeneração óssea em defeitos críticos na calvária de Ratos Sprague Dawley", registrada com o nº 016/2018, sob a responsabilidade de Jorge José de Carvalho - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da UERJ, em reunião de 27/03/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	27/03/2022
Espécie/linhagem/raça	Rato Sprague Dawley
Nº de animais	52
Peso/Idade	400 g / 90 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ