



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Samira Regina Guimarães Fraga

**Análise da osteogênese e incorporação óssea em enxertos ósseos
humanos celularizados com células-tronco mesenquimais
para aumento mandibular em ratos**

Rio de Janeiro

2022

Samira Regina Guimarães Fraga

**Análise da osteogênese e incorporação óssea em enxertos ósseos humanos
celularizados com células-tronco mesenquimais para
aumento mandibular em ratos**

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.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Deluiz Martins

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

F811 Fraga, Samira Regina Guimarães.
Análise da osteogênese e incorporação óssea em enxertos ósseos humanos celularizados com células-tronco mesenquimais para aumento mandibular em ratos/ Samira Regina Guimarães Fraga. – 2022.
112 f.

Orientador: Eduardo Muniz Barretto Tinoco.
Coorientador: Daniel Deluiz Martins.
Tese (doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Ossos - Transplante. 2. Aloenxertos. 3. Aumento do rebordo alveolar. 4. Células-tronco mesenquimais. 4. Regeneração óssea. I. Tinoco, Eduardo Muniz Barretto. II. Martins, Daniel Deluiz. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Kárin Cardoso CRB/7 6287

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

Assinatura

Data

Samira Regina Guimarães Fraga

**Análise da osteogênese e incorporação óssea em enxertos ósseos humanos
celularizados com células-tronco mesenquimais para
aumento mandibular em ratos**

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 10 de março de 2022.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Faculdade de Odontologia -UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Deluiz Martins

Faculdade de Odontologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimarães Fischer

Faculdade de Odontologia -UERJ

Prof. Dr. Fabio Ramoa Pires

Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Roberto Prado

Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Danielle Castex Conde

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Sergio Luiz Melo Gonçalves

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Luiz Carlos Pinto Fraga (*in memoriam*) e Claudia Regina Guimarães Fraga, e à minha filha Catarina.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por toda a dedicação e esforço para que eu tivesse uma boa educação, fosse uma boa profissional e conseguisse ser uma mulher independente. Devo a vocês tudo o que me tornei e conquistei ao longo desses anos. Acredito que a única forma de retribuir tudo que fizeram, e ainda fazem por mim, é continuar estudando e lutando por todos os meus objetivos, porque sei que a minha vitória é o maior motivo de alegria na vida de vocês. Meu pai (*in memoriam*), você se foi tão precocemente, enquanto eu ainda carregava Catarina no ventre e nem havia terminado essa tese. Eu já havia escrito este agradecimento e você não teve a oportunidade de ler. Sei que está feliz aí de cima! Obrigada por tudo.

À minha avó Isaura, pelo amor incondicional, pela vida dedicada a nós, por ter me criado e educado, pelas inúmeras orações e velas acesas, pelas noites acordada me esperando dormir, quando eu virava as madrugadas estudando. Atualmente, já não tem tanta consciência de tudo, porém o amor, esse só aumenta e agora está multiplicando! Te amo muito!

Ao Juliano, meu parceiro, companheiro, incentivador e responsável pelo maior presente que ganhei na vida. Obrigada pela melhor quarentena das nossas vidas, pela família que construímos, pelo seu apoio e amizade, e pela benção de Deus em nossas vidas, Catarina. Minha filha, mesmo sem você saber, e antes mesmo de existir, você sempre foi a minha maior motivação para que eu tivesse me dedicado tanto a estudar, passar nos concursos e continuar me aprimorando, para que um dia eu possa te dar tudo aquilo que meus pais me deram. Você tem sido a minha força pra continuar vivendo feliz nesses últimos meses. Amo vocês, minha filha e meu amor!

A minha irmã Larissa, por me incentivar e apoiar sempre, por ser a minha fortaleza em todos os momentos das nossas vidas, nos alegres e no mais triste de todos. Sem você teria sido muito mais difícil.

Ao professor e orientador Dr. Eduardo Tinoco, pelos ensinamentos, por me permitir a vivência do doutorado e ter confiado em mim, ao me aceitar como orientanda.

À professora Dra. Thaís Amadeu, do Laboratório de Patologia e Imuno-histoquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), que mais do que uma professora e coorientadora, foi uma segunda mãe nesse período.

Ao meu coorientador, amigo, dupla da faculdade e afilhado de casamento, Dr. Daniel Deluiz, por ter me incentivado a começar o doutorado, e me ajudado a terminar também! Obrigada pela confiança, pelos ensinamentos, pelo apoio, dedicação e suporte durante esses quatro anos.

À professora Dra. Karin Gonçalves Soares Cunha, chefe da Unidade Integrada de Patologia Especial (UNIPE) da Universidade Federal Fluminense (UFF) e ao técnico do laboratório de Patologia Digital da UNIPE/UFF, Bernardo, pela cortesia no escaneamento das lâminas fotografadas para esta tese.

Aos funcionários da pós-graduação da Faculdade de Odontologia da UERJ (FOUERJ), em especial, à secretária da pós-graduação “tia” Denise, que me alfabetizou aos seis anos de idade e se hoje estou aqui defendendo meu doutorado, também devo a ela por todo o incentivo ao longo desses anos.

Aos professores da pós-graduação da FOUERJ, especialmente os que contribuíram diretamente com a minha formação: Fábio Ramoa, Marília Cantisano, Geraldo Silva-Jr, Carlos Marcelo Figueredo, Ricardo Fischer e Eduardo Veras. Foram ótimos momentos de convívio.

Aos colegas da turma de doutorado, João Canellas, Juliana de Noronha e Monike Santoro, pela troca de experiências, aflições e risadas. Obrigada, turma! Saudades demais de vocês.

Ao aluno Igor, pelo delicioso convívio e por tudo que aprendi com você no laboratório. Obrigada por toda a ajuda nas imunos e nas cirurgias com os ratos. Uma pena a pandemia não ter permitido a finalização do nosso trabalho.

À professora da UFF, amiga e colega de trabalho Dra. Danielle Castex, por incentivar a minha formação, ser meu exemplo profissional e meu ombro amigo, onde chorei muitas vezes, mas também nos divertimos muito.

Aos membros da banca pelo aceite do convite e por serem profissionais da minha extrema admiração.

A todos que de alguma forma participaram dessa minha trajetória. Muito obrigada.

A Deus, por ser a minha força maior, por guiar meus passos, por me fazer superar todos os obstáculos e conseguir chegar até aqui vitoriosamente! Obrigada, Senhor!

RESUMO

FRAGA, Samira Regina Guimarães. **Análise da osteogênese e incorporação óssea em enxertos ósseos humanos celularizados com células-tronco mesenquimais para aumento mandibular em ratos.** 2022. 112 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

O uso de enxerto ósseo alógeno representa uma boa alternativa ao osso autógeno para a reconstrução dos maxilares, pois diminui o tempo e trauma cirúrgico, com ausência de dor e desconforto em um segundo sítio doador, tem uma disponibilidade ilimitada, baixo potencial antigênico e capacidade de osteocondução. No entanto, exibe uma capacidade osteoindutora reduzida, incorporação mais lenta ao osso hospedeiro e maior reabsorção volumétrica. Alguns estudos têm tentado aprimorar os aloenxertos com células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea, resultando em maior volume de neoformação óssea em menor tempo. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de osteogênese e incorporação de enxertos ósseos humanos celularizados com CTMs, enxertados na mandíbula de ratos, e comparar com o uso de enxertos ósseos humanos não-celularizados. Vinte ratos nude foram alocados em dois grupos: o grupo teste recebeu *chips* ósseos humanos celularizados e o grupo controle recebeu as mesmas micropartículas ósseas, porém sem células. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com 4 semanas e os outros cinco, com 8 semanas. Os resultados foram analisados por microtomografia computadorizada (micro-TC), histologia, histomorfometria e imunohistoquímica. Análises por micro-TC demonstraram ganho de volume ósseo significativamente maior no grupo celularizado do que no grupo não-celularizado com 4 semanas ($34,97 \pm 4,97 \text{ mm}^3$ vs $12,43 \pm 2,53 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$) e com 8 semanas ($48,59 \pm 3,99 \text{ mm}^3$ vs $35,18 \pm 4,98 \text{ mm}^3$; $p = 0,002$). A análise histomorfométrica mostrou que a porcentagem de osso neoformado foi significativamente maior no grupo celularizado que no grupo não-celularizado com 4 semanas ($42,48 \pm 5,38\%$ vs $3,96 \pm 2,83\%$; $p < 0,001$) e com 8 semanas ($48,40 \pm 6,75\%$ vs $23,01 \pm 8,48\%$; $p < 0,001$). Os resultados imunohistoquímicos mostraram índices de positividade dos anticorpos anti-OCN, anti-OPN, anti-COL I e anti-TRAP significativamente maiores nos enxertos celularizados do que nos enxertos não-celularizados. Os parâmetros avaliados sugerem que o conteúdo celular presente nos enxertos ósseos para aumento mandibular em ratos promoveu uma formação óssea precoce e eficiente, com uma maior taxa de incorporação e remodelação óssea.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Transplante alogênico. Aumento do rebordo alveolar. Aumento mandibular. Células-tronco mesenquimais. Regeneração óssea.

ABSTRACT

FRAGA, Samira Regina Guimarães. **Analysis of osteogenesis and bone incorporation of human bone grafts cellularized with mesenchymal stem cells for mandibular augmentation in rats.** 2022. 112f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The use of allogeneic bone graft represents a viable alternative to autogenous bone for jaw reconstruction, as it reduces surgical time and trauma, with no pain and discomfort in a second donor site, has unlimited availability, low antigenic potential and ability to osteoconduction. However, it exhibits reduced osteoinductive capacity, slower incorporation into host bone and greater volumetric resorption. Some studies have tried to improve allografts with mesenchymal stem cells (MSCs) from the bone marrow, resulting in a greater volume of new bone formation in a shorter time. The aim of this study was to evaluate the potential for osteogenesis and incorporation of cellularized human bone grafts with MSCs, grafted in the rat mandible, and to compare with the use of non-cellularized human bone grafts. Twenty nude mice were allocated into two groups: the test group received cellularized human bone chips and the control group received the same bone microparticles, but without cells. Five animals from each group were euthanized at 4 weeks and the other five at 8 weeks. The results were analyzed by microcomputed tomography (micro-CT), histology, histomorphometry and immunohistochemistry. Micro-CT analysis showed significantly greater bone volume gain in the cellularized group than in the non-cellularized group at 4 weeks ($34.97 \pm 4.97 \text{ mm}^3$ vs $12.43 \pm 2.53 \text{ mm}^3$; $p < 0.001$) and at 8 weeks ($48.59 \pm 3.99 \text{ mm}^3$ vs $35.18 \pm 4.98 \text{ mm}^3$; $p = 0.002$). The histomorphometric analysis showed that the percentage of newly formed bone was significantly higher in the cellularized group than in the non-cellularized group at 4 weeks ($42.48 \pm 5.38\%$ vs $3.96 \pm 2.83\%$; $p < 0.001$) and at 8 weeks ($48.40 \pm 6.75\%$ vs $23.01 \pm 8.48\%$; $p < 0.001$). The immunohistochemical results showed higher immunoexpression indices of anti-OCN, anti-OPN, anti-COL I and anti-TRAP in cellularized grafts than in acellular grafts. The parameters evaluated suggest that the cellular content present in the bone grafts for mandibular augmentation in rats promoted an early and efficient bone formation, with a higher rate of bone incorporation and remodeling.

Keywords: Bone graft. Allogeneic transplantation. Alveolar ridge augmentation. Mandibular augmentation. Mesenchymal stem cells. Bone regeneration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Trituração manual de fragmentos de vértebras humanas	49
Figura 2 –	Procedimento cirúrgico: aumento do rebordo alveolar em ratos	51
Figura 3 –	Imagem inicial, reconstruída em 3D, da área enxertada na mandíbula	52
Figura 4 –	Imagem de micro-TC identificando ROI ₁ e ROI ₂	53
Figura 5 –	Aspecto macroscópico da peça cirúrgica	54
Figura 6 –	Fotomicrografias representativas dos parâmetros avaliados por meio de histomorfometria	56
Quadro –	Especificações e protocolo de padronização dos anticorpos utilizados	57
Figura 7 –	Associação entre o ganho de volume ósseo (mm ³) e o tipo de enxerto, em cada intervalo de tempo	62
Figura 8 –	Associação entre a densidade mineral óssea (mg/cm ³) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	64
Figura 9 –	Associação entre BV/TV (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	66
Figura 10 –	Características histológicas dos enxertos ósseos celularizados e não-celularizados com 4 e 8 semanas	68
Figura 11 –	Associação entre osso neoformado (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	71
Figura 12 –	Associação entre as partículas remanescentes de enxerto (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	73
Figura 13 –	Associação entre OCN e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	78
Figura 14 –	Associação entre COL I e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	80
Figura 15 –	Associação entre OPN e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	82

Figura 16 – Associação entre TRAP e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo	84
Figura 17 – Expressão imuno-histoquímica de COL-1	85
Figura 18 – Expressão imuno-histoquímica de OCN	86
Figura 19 – Expressão imuno-histoquímica de OPN	86
Figura 20 – Expressão imuno-histoquímica de TRAP	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Análise descritiva das variáveis quantitativas tomográficas por tipo de enxerto	60
Tabela 2 –	Análise descritiva das variáveis quantitativas tomográficas por intervalo de tempo	60
Tabela 3 –	Comparação de médias das variáveis tomográficas entre os enxertos não-celularizado e celularizado no intervalo de tempo '4 semanas'	61
Tabela 4 –	Comparação de médias das variáveis tomográficas entre os enxertos não-celularizado e celularizado no intervalo de tempo '8 semanas'	61
Tabela 5 –	Análise de variância para a variável resposta volume ósseo	63
Tabela 6 –	Análise de variância para a variável resposta densidade mineral óssea	65
Tabela 7 –	Análise de variância para a variável resposta BV/TV	67
Tabela 8 –	Análise descritiva das variáveis quantitativas histomorfométricas por tipo de enxerto	69
Tabela 9 –	Análise descritiva das variáveis quantitativas histomorfométricas por intervalo de tempo	69
Tabela 10 –	Comparação de médias das variáveis histomorfométricas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '4 semanas'	70
Tabela 11 –	Comparação de médias das variáveis histomorfométricas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '8 semanas'	70
Tabela 12 –	Análise de variância para a variável resposta osso neoformado	72
Tabela 13 –	Análise de variância para a variável resposta partículas remanescentes	74
Tabela 14 –	Análise de variância para a variável resposta tecido calcificado	74
Tabela 15 –	Análise descritiva das variáveis quantitativas imuno-histoquímicas por tipo de enxerto	76

Tabela 16 – Análise descritiva das variáveis quantitativas imuno-histoquímicas por intervalo de tempo	76
Tabela 17 – Comparação de médias das variáveis imuno-histoquímicas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo ‘4 semanas’	77
Tabela 18 – Comparação de médias das variáveis imuno-histoquímicas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo ‘8 semanas’	77
Tabela 19 – Análise de variância para a variável resposta OCN	79
Tabela 20 – Análise de variância para a variável resposta COL I	81
Tabela 21 – Análise de variância para a variável resposta OPN	83
Tabela 22 – Análise de variância para a variável resposta TRAP	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
β -TCP	<i>β-fosfato tricálcico</i>
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMPR1B	Receptor de proteína morfogenética óssea 1B
BV/TV	<i>Bone volume/tissue volume</i> (volume ósseo/volume total do tecido)
CaP	Fosfato de cálcio
CD	Classe de diferenciação
c-Met	Receptor do fator de crescimento de hepatócito
CNTFR	Receptor do fator neurotrófico ciliar
COL I	Colágeno tipo I
CP	Concentrado plaquetário
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTM	Célula-tronco mesenquimal
Bfgf	Fator de crescimento básico de fibroblastos
DC	Células dendríticas
DFDBA	<i>Demineralized freeze dried bone allograft</i> (aloenxerto de osso liofilizado desmineralizado)
DMO	Densidade mineral óssea
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
e-PTFE	Politetrafluoroetileno expandido
FDDBA	<i>Freeze dried bone allograft</i> (aloenxerto de osso liofilizado desmineralizado)
FFB	<i>Fresh frozen bone</i> (aloenxerto ósseo fresco ultracongelado)
FOV	<i>field of view</i> (campo de visão)
hTERT	Telomerase
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina e Eosina

HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HLA	Antígeno leucocitário humano
IDO	Indoleamina-2,3-dioxigenase
IFN	Interferon
IGF	Fator de crescimento insulínico
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LIF	Fator inibidor de leucemia
L-PRF	Fibrina rica em plaquetas e leucócitos
L-PRP	Plasma rico em plaquetas e leucócitos
MHC	<i>Main histocompatibility complex</i> (complexo principal de histocompatibilidade)
MIAMI cells	Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells (Células adultas indutíveis de multi-linhagem isoladas da medula óssea)
micro-TC	Microtomografia computadorizada
NK	<i>Natural killer</i>
NTRK3	<i>Receptor neurotrófico tirosina kinase-3</i>
OC	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
PCL	Policaprolactona
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
PEG	Polietilenoglicol
PGA	Ácido poliglicólico
PGE2	Prostaglandina E2
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido polilático-poliglicólico
PRF	Fibrina rica em plaquetas
P-PRF	Fibrina rica em plaqueta pura
PRP	Plasma rico em plaqueta
P-PRP	Plasma rico em plaqueta puro
ROI	<i>Region of interest</i> (região de interesse)
TGF-β	Fator transformador do crescimento beta
Th	<i>T helper</i>

TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Treg	T reguladoras
VEGF	Fator de crescimento epitelial vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1	Reconstrução dos rebordos alveolares com enxertos ósseos .	21
1.1.1	<u>Enxerto ósseo autógeno</u>	21
1.1.2	<u>Enxerto ósseo alógeno</u>	23
1.2	Engenharia de Tecidos	25
1.2.1	<u>Células progenitoras</u>	26
1.2.1.1	Células-tronco mesenquimais	27
1.2.1.2	Células MIAMI	32
1.2.2	<u>Fatores de crescimento</u>	34
1.2.2.1	Fatores osteogênicos	34
1.2.2.2	Fatores angiogênicos	36
1.2.2.3	Concentrados plaquetários	36
1.2.3	<u>Arcabouços tridimensionais</u>	39
1.2.3.1	Enxertos ósseos	40
1.2.3.2	Matrizes	41
1.2.3.3	Materiais Poliméricos	42
1.2.3.4	Arcabouços compostos	43
1.3	Uso de células mesenquimais alógenas	43
2	PROPOSIÇÃO	47
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	Grupos de animais	48
3.2	Obtenção dos enxertos ósseos	48
3.3	Procedimento cirúrgico	49
3.4	Análise de Microtomografia Computadorizada	52
3.5	Técnica Histológica	54
3.6	Análise Histológica	55
3.7	Histomorfometria	55
3.8	Análise imuno-histoquímica	56
3.9	Análise estatística	58

4	RESULTADOS	59
4.1	Avaliação da Microtomografia Computadorizada	59
4.1.1	<u>Análise descritiva</u>	59
4.1.2	<u>Ganho de volume ósseo</u>	61
4.1.3	<u>Densidade mineral óssea (mg/cm³)</u>	63
4.1.4	<u>Fração de volume ósseo (BV/TV)</u>	65
4.2	Avaliação Histológica	67
4.3	Avaliação Histomorfométrica	69
4.3.1	<u>Análise descritiva</u>	69
4.3.2	<u>Osso neoformado</u>	70
4.3.3	<u>Partículas remanescentes do enxerto</u>	72
4.3.4	<u>Tecido calcificado</u>	74
4.4	Avaliação imuno-histoquímica	75
4.4.1	<u>Análise descritiva</u>	75
4.4.2	<u>OCN</u>	77
4.4.3	<u>COL I</u>	79
4.4.4	<u>OPN</u>	81
4.4.5	<u>TRAP</u>	83
5	DISCUSSÃO	88
	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO - Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa	112

INTRODUÇÃO

A utilização de enxertos ósseos é frequentemente necessária para o reparo de defeitos ósseos causados por doenças esqueléticas inflamatórias, tumorais ou congênitas, traumas, e previamente à colocação de implantes dentários, em casos de reabsorção do rebordo alveolar (CONTAR *et al.*, 2009; HOFMANN *et al.*, 2005).

A reabsorção dos rebordos alveolares é uma consequência natural da perda dentária e, comumente, resulta em deformidade óssea em “ponta de faca”, dificultando a colocação e estabilização de implantes dentários (LEONETTI; KOUP, 2003), o que acarreta em altas taxas de falha/insucesso, resultados estéticos insatisfatórios ou redução da sobrevivência dos implantes a longo prazo (JEMT; LEKHOLM, 1995). Dessa forma, a fim de reconstruir o volume ósseo adequado previamente à instalação de implantes, diversos métodos e materiais estão disponíveis para o aumento ósseo da maxila e mandíbula (MISCH, 2017).

O uso de enxertos ósseos autógenos, extra ou intraorais, tem sido vastamente relatado na literatura (ACOCELLA *et al.*, 2010; FARIA *et al.*, 2008; MISCH; DIETSH, 1993; MISCH, 2011; SPIN-NETO *et al.*, 2014) e apresenta altas taxas de sucesso nas reconstruções do osso alveolar (MISCH, 2011; SALEM *et al.*, 2016), devido às suas propriedades de osteogênese, osteoindução e osteocondução, e ausência de antigenicidade e risco de transmissão de doenças. São, portanto, considerados o material padrão ouro para enxertia (KHAN *et al.*, 2005; MISCH *et al.*, 1992).

Entretanto, a necessidade de internação hospitalar e segundo acesso cirúrgico no sítio doador, a disponibilidade óssea limitada, o aumento da morbidade e complicações associadas à coleta do enxerto autógeno, como parestesia, lesões irreversíveis a estruturas nobres, edema excessivo e hemorragias, estimularam a procura crescente por outros materiais de enxerto que substituíssem com sucesso o osso autógeno (VON ARX; HÄFLIGER; CHAPPUIS, 2005).

Nesse contexto, diferentes tipos de substitutos ósseos têm sido testados e o uso de enxerto alógeno tem representado uma boa alternativa para a reconstrução dos defeitos ósseos maxilares (FERRAZ *et al.*, 2015).

Captado de doadores cadáveres ou vivos, o aloenxerto diminui o tempo e trauma cirúrgico, com ausência de dor e desconforto em um segundo sítio doador,

tem uma disponibilidade virtualmente ilimitada de material reconstrutivo, proporciona estruturas similares às do tecido ósseo natural, tem baixo potencial antigênico e característica osteocondutora e, em algumas situações, osteoindutora. Dessa forma, é uma opção viável para a substituição do material autógeno (CONTAR *et al.*, 2009; LEONETTI; KOUP, 2003).

O uso de enxertos ósseos alógenos para reabilitação oral tem sido estudado por mais de duas décadas (MONJE *et al.*, 2014) por fornecer um arcabouço para o osso hospedeiro em regeneração que, eventualmente, substituirá o enxerto por osteocondução (CONTAR *et al.*, 2009; LEONETTI; KOUP, 2003). No entanto, em comparação com os autoenxertos, os aloenxertos exibem uma capacidade osteoindutora reduzida, uma incorporação mais lenta ao osso hospedeiro e maior reabsorção volumétrica (FERNANDES *et al.*, 2014; SPIN-NETO *et al.*, 2013; WAASDORP, 2008).

Devido à capacidade limitada de substituição do osso perdido ou doente, técnicas de engenharia tecidual estão sendo desenvolvidas para tentar incorporar propriedades dos enxertos ósseos autógenos, como osteogênese, aos aloenxertos ósseos (FERNANDES *et al.*, 2014). A engenharia tecidual pode ser usada para regenerar o osso através da combinação de células do corpo com fatores de crescimento e biomateriais que servem de arcabouço (KAIGLER; CIRELLI; GIANNOBILE, 2006). Esta combinação de células, moléculas de sinalização e arcabouço é, muitas vezes, referida como a tríade da engenharia tecidual (MISCH, 2017).

Desse modo, alguns estudos têm tentado aprimorar os aloenxertos com células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea e mostraram maior volume de neoformação óssea em menor tempo (MANGANO *et al.*, 2015; TEE; SUN, 2015).

Em um estudo recente em ratos, foi observado que micropartículas ósseas cadavéricas humanas quando semeadas com CTMs isoladas da medula óssea (ViaGraft®, Vivex Biomedical, Miami, FL) apresentaram propriedades osteogênicas positivas, resultando em uma formação óssea significativamente maior, juntamente com uma taxa de remodelação óssea mais alta e uma melhor incorporação geral, quando comparado às micropartículas ósseas acelulares (DELUIZ *et al.*, 2019).

Como no Brasil não é permitida a comercialização de CTMs, o processamento de tecido ósseo cadavérico preservando seu conteúdo celular poderia ser uma alternativa ao uso do CTMs isoladas. Além disso, seu

processamento é mais simples e tem um menor custo, uma vez que os fragmentos ósseos são processados de forma muito similar ao que já é disponibilizado pelos Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos nacionais, exceto pela preservação das células através de uma solução crioprotetora.

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de osteogênese e incorporação de enxertos ósseos humanos celularizados com CTMs, enxertados na mandíbula de ratos, e comparar com o uso de enxertos ósseos humanos não-celularizados.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Reconstrução dos rebordos alveolares com enxertos ósseos

O uso de implantes dentários para substituição de dentes ausentes tornou-se prática clínica rotineira. Após a perda do dente e a reabsorção do osso alveolar, a arcada dentária edêntula pode, frequentemente, apresentar inadequada disponibilidade óssea para a instalação de implantes (ESPOSITO; ARDEBILI; WORTHINGTON, 2014).

Existem diversos métodos e materiais disponíveis para o aumento ósseo da maxila e mandíbula, previamente à colocação de implantes dentários, como o uso de diferentes biomateriais e agentes biologicamente ativos, distração osteogênica e regeneração óssea guiada (ESPOSITO *et al.*, 2009). A escolha de uma técnica de aumento em particular ou material de enxerto depende de vários fatores, incluindo a região anatômica, grau de atrofia, morfologia do defeito ósseo, tipo de prótese e preferências do dentista ou do paciente (ESPOSITO *et al.*, 2009; MISCH, 2017).

Embora nenhum estudo documente que uma técnica de aumento ósseo é necessariamente superior, o cirurgião deve se esforçar para selecionar um método que ofereça resultados previsíveis para cada situação clínica (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009; ESPOSITO *et al.*, 2009; MISCH, 2017).

1.1.1 Enxerto ósseo autógeno

Dentre as diferentes técnicas propostas ao longo dos anos, a reconstrução óssea com enxertos autógenos *onlay* é o procedimento mais bem documentado e mais versátil, pois pode ser utilizado no tratamento da grande maioria dos defeitos, independe de variáveis como tipo de atrofia e extensão do defeito (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009).

É o material para enxertia óssea considerado como o padrão ouro na literatura, em função de suas vantagens biológicas, quando comparado aos diversos tipos de preenchimento (DEATHERAGE, 2010; SPIN-NETO *et al.*, 2013; SPRINGER *et al.*, 2004; ZOUHARY, 2010). Apresenta alta biocompatibilidade, já que é retirado do próprio indivíduo, além de ausência de transmissão de doenças e de reação imunológica. Também apresenta propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, dadas pelas células viáveis, proteínas morfogenéticas e por seu arcabouço, respectivamente (DEATHERAGE, 2010).

Os enxertos autógenos podem ser coletados de sítios extraorais, como a crista ilíaca, calvária e tibia, ou intraorais, como o ramo e a sínfise mandibulares, do próprio paciente. O sítio doador escolhido é determinado com base no volume ósseo requerido de enxerto (CHIAPASCO; CASENTINI; ZANIBONI, 2009; CHIAPASCO; ZANIBONI; BOISCO, 2006; MISCH; DIETSH, 1993).

Os resultados clínicos são favoráveis e estáveis ao longo do tempo para o osso reconstruído e para os implantes dentários colocados nas áreas reconstruídas. Em sua revisão sistemática, Aloy-Prosper *et al.* (2015) relataram taxas de sobrevivência do implante variando de 96,9% a 100% para aumentos ósseos laterais dos maxilares, com um período médio de acompanhamento de 12-24 meses e, para os aumentos verticais, a taxa de sobrevivência variou de 95,6% após um ano de carregamento a 100% com média de 38 meses pós-carregamento. O sucesso do implante variou de 91,1% com um ano a 89,5% com média de 38 meses após o carregamento (ALOY-PROSPER *et al.*, 2015). Por outro lado, tem sido relatada uma alta taxa de reabsorção óssea nos enxertos autógenos, de 40% ou mais na dimensão vertical (CORDARO, L.; AMADE; CORDARO, M., 2002) e de 60% na direção horizontal (WIDMARK; ANDERSSON; IVANOFF, 1997).

Além disso, o uso de osso autógeno apresenta algumas desvantagens, como disponibilidade óssea limitada, além de poder causar injúrias e morbidade na área doadora, como dor pós-operatória, edema excessivo, sangramento, risco de parestesia, lesões a estruturas nobres e infecção (ARRINGTON *et al.*, 1996; VON ARX; HÄFLIGER; CHAPPUIS, 2005; NKENKE *et al.*, 2002; SITTITAVORNWONG; GUTTA, 2010; TESSIER *et al.*, 2005; ZOUHARY, 2010).

Outras desvantagens, como o custo adicional e a necessidade de hospitalização e anestesia geral para coleta óssea de sítios extraorais têm encorajado os clínicos a buscarem alternativas ao osso autógeno para o aumento

vertical e horizontal do rebordo alveolar (MONJE *et al.*, 2014). Substitutos ósseos, como enxertos alógenos, xenógenos e materiais sintéticos têm sido utilizados. Esses substitutos não possuem capacidade osteogênica, devido à ausência de componentes celulares, e têm reduzida capacidade osteoindutora, oferecendo apenas um arcabouço tridimensional para o sítio receptor, o que requer um maior período de cicatrização (AL-MORAISSEI, 2020).

1.1.2 Enxerto ósseo alógeno

O osso alógeno (ou homólogo), captado de doadores da mesma espécie, vivos ou cadáveres, e estocado em banco de ossos, representa uma alternativa aos enxertos autógenos, pois elimina a necessidade de remoção de tecido ósseo do próprio paciente, diminuindo a morbidade e o tempo cirúrgico, além de sua facilidade de obtenção em grandes quantidades, simplificando o procedimento de reconstrução dos maxilares. Este material mostrou-se, assim, bastante útil para a Odontologia (DEATHERAGE, 2010; SPIN-NETO *et al.*, 2013).

O osso alógeno está disponível na forma de blocos, *chips* ou grânulos (cortical ou medular) (STARCH-JENSEN; DELUIZ; TINOCO, 2020). É tipicamente tratado por congelamento, liofilização, irradiação e outras manipulações, que conferem ao material um menor risco de contaminação (DEATHERAGE, 2010). Tratamentos adicionais com óxido de etileno e radiação gama apresentam efeitos colaterais. A radiação gama tende a diminuir a resistência estrutural do enxerto, enquanto o óxido de etileno afeta a capacidade osteoindutiva (BHATT; ROZENTAL, 2012). Os enxertos mais usados são enxerto liofilizado mineralizado (do inglês, *freeze dried bone allograft* (FDBA)), liofilizado desmineralizado (*demineralized freeze dried bone allograft* (DFDBA)) e fresco congelado (*fresh frozen bone* (FFB)). Cada forma de processamento apresenta características de utilização e propriedades diferentes. Diante do exposto, pode-se afirmar que as propriedades osteocondutoras e osteoindutoras dos enxertos alógenos são dependentes da forma que os mesmos são processados e armazenados (GLOWACKI, 2005).

É importante ressaltar que os aloenxertos apresentam algumas limitações, como a penetração vascular retardada, formação óssea mais lenta, maiores taxas

de reabsorção óssea e a possibilidade de imunogenicidade e transmissão de doenças. Entretanto, sobre este último aspecto, técnicas aprimoradas de triagem, testes e protocolos modernos de processamento dos bancos de ossos reduziram significativamente o risco de infecção. Assim, os aloenxertos são atualmente considerados seguros sob o aspecto imunológico (ZAMBORSKY *et al.*, 2016).

Há cerca de 20 anos, diversos estudos vêm sendo publicados utilizando blocos de osso alógeno com a finalidade de aumento do rebordo alveolar. Muitos deles apresentam um seguimento a curto prazo dos pacientes e análises histológicas e/ou imuno-histoquímicas. Clinicamente, os enxertos parecem se comportar de forma semelhante aos blocos autógenos, apresentando taxas de reabsorção e de sucesso dos implantes compatíveis. Ao avaliar os espécimes removidos após o tempo de incorporação dos enxertos, a maioria dos trabalhos mostra uma vascularização e neoformação óssea com presença de espaços medulares e cortical similares aos encontrados em osso enxertado com material autógeno (ACOCELLA *et al.*, 2012; CONTAR *et al.*, 2009; DELUIZ *et al.*, 2015; DELUIZ *et al.*, 2017; ORSINI *et al.*, 2011). Entretanto, ainda não há evidência suficiente para estabelecer a comparação da eficácia do tratamento com bloco alógeno e autógeno, a longo prazo (STARCH-JENSEN, DELUIZ; TINOCO, 2020).

Considerando a longevidade dos implantes dentários, Monje *et al.* (2014) encontraram, através de revisão sistemática, uma taxa de sobrevivência cumulativa de 96,9% (95% IC: 92,8-98,7%) para implantes instalados em rebordos enxertados com blocos alógenos, levando em consideração a soma de todos os estudos com a avaliação de 228 implantes, em um período médio de acompanhamento de 23,9 meses. Motamedian *et al.* (2016) revisaram sistematicamente 19 estudos com blocos alógenos, nos quais a taxa de sobrevivência dos implantes variou de 95,3% a 100%, num período de 12 a 60 meses e, em quatro estudos, a taxa de sucesso variou de 94,7% a 100%, o que é comparável a outras modalidades de reconstruções ósseas. Chavda e Levin (2018) não encontraram diferença significativa na taxa de sucesso dos implantes entre os diferentes tipos de enxertos analisados (autógeno, xenógeno, alógeno e aloplástico) para aumento do rebordo alveolar. Entretanto, existem diversas limitações nessas revisões, principalmente devido ao escasso número de estudos randomizados, amostras pequenas, metodologia e procedimentos diversos e curtos períodos de acompanhamento (STARCH-JENSEN; DELUIZ; TINOCO, 2020).

Além disso, o aumento do rebordo alveolar com bloco ósseo alogênico parece estar associado com um risco maior de complicações biológicas no sítio receptor, como abertura da linha de incisão, deiscência de tecidos moles, exposição do enxerto e perda parcial ou total do bloco ósseo, o que pode comprometer a sobrevivência do implante a longo prazo (STARCH-JENSEN; DELUIZ; TINOCO, 2020).

1.2 Engenharia de Tecidos

O desenvolvimento do campo da engenharia tecidual tem oferecido subsídios para, eventualmente, substituir a necessidade de coleta de osso autógeno do paciente e as limitações da utilização dos substitutos ósseos. Este método, minimamente invasivo para restaurar e reconstruir órgãos ou tecidos utiliza três ferramentas básicas, formadas por células, fatores de crescimento e/ou arcabouços tridimensionais (IKADA, 2006; KAIGLER; CIRELLI; GIANNOBILE, 2006; MISCH, 2017).

Dessa forma, a engenharia de tecidos visa combinar e entregar os elementos celulares (células progenitoras), extracelulares (arcabouços tridimensionais) e/ou moleculares (fatores de crescimento), envolvidos em processos regenerativos fisiológicos, para aplicações terapêuticas. Especificamente em relação à engenharia de tecido ósseo, geralmente, há a coleta de células osteogênicas de uma fonte autóloga (por exemplo, medula óssea, tecido adiposo), sua manipulação ou amplificação *ex vivo* e combinação com um arcabouço de biomaterial apropriado para implantação *in vivo* (EVANS *et al.*, 2007; ORYAN *et al.*, 2017). Assim, a "tríade" de células osteogênicas, sinais osteoindutivos (fatores de crescimento liberados pelas células) e arcabouços osteocondutores, visa replicar as propriedades do osso autógeno e reduzir a necessidade de sua coleta invasiva (OPPENHEIMER; MESA; BUCHMAN, 2012).

1.2.1 Células progenitoras

As células-tronco podem ser definidas como células indiferenciadas responsáveis pela formação de cada órgão e tecido do corpo humano. Elas têm duas características importantes que as distinguem de outros tipos celulares: capacidade para se renovar indefinidamente, produzindo novas células-tronco, bem como a capacidade de se diferenciar, ao mesmo tempo, em células-filhas especializadas que podem realizar funções específicas (WEISSMAN, 2000).

A origem celular tem uma enorme influência sobre o sucesso da engenharia tecidual. De acordo com as diferentes espécies, as células-tronco podem ser classificadas em autólogas, alógenas e xenógenas. As células autólogas são as mais adequadas para engenharia tecidual, na medida em que sua atividade permanece alta, enquanto as células alogênicas e xenogênicas são imunogênicas e necessitam de uma terapia imunossupressora quando um novo tecido é criado a partir dessas células heterogêneas (IKADA, 2006).

As células-tronco também podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em: células-tronco embrionárias (CTE), quando são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário, e células-tronco adultas (CTA) (THOMSON *et al.*, 1998; VOGEL; 2000). As CTEs são células pluripotentes dotadas de grande plasticidade, uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro*, sob estímulos, além da possibilidade de se diferenciar em todos os tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários (DEB; SARDA, 2008; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001). As CTAs podem ser consideradas populações celulares indiferenciadas mantidas no organismo adulto, onde participam da homeostase tecidual, gerando novas células em resposta ao repovoamento celular fisiológico ou a uma injúria. Considerando que as CTAs são geralmente multipotentes, elas podem formar um número limitado de tipos celulares, restritos aos seus folhetos embrionários (CHIU *et al.*, 1996; ODORICO; KAUFMAN; THOMSON, 2001; WATT; HOGAN, 2000).

Outras células-tronco podem ser obtidas sinteticamente de células somáticas, que são conhecidas como células-tronco de pluripotência induzida, ou pela sigla iPS, do inglês *induced pluripotent stem cells* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

As primeiras CTAs estudadas e, conseqüentemente, as mais bem caracterizadas foram as células hematopoiéticas provenientes da medula óssea. Estas células são capazes de diferenciar-se nos constituintes mieloides e linfoides do sangue e, há muitas décadas, vêm sendo utilizadas com sucesso em transplantes para pacientes com falência medular ou com câncer (HIRAO; ARAI; SUDA, 2004; PROCKOP, 1997; RATAJCZAK *et al.*, 2007).

Mais recentemente, outro tipo de CTA, também constituinte da medula óssea, foi isolado, porém com propriedades diferentes das hematopoiéticas: as células-tronco mesenquimais (CTMs) ou células-tronco estromais (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; SINGER; CAPLAN, 2011).

1.2.1.1 Células-tronco mesenquimais

O primeiro relato das CTMs foi realizado pelo pesquisador russo Friedenstein e seus colaboradores, na década de 1970, que as descreveu como sendo células morfológicamente semelhantes a fibroblastos e com alta capacidade de adesão à superfície plástica (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; PROCKOP, 1997). Vários estudos posteriores relataram a multipotência destas células, ou seja, a capacidade de diferenciarem-se em células derivadas do mesoderma embrionário: osteócitos, condroblastos e adipócitos (BASCIANO *et al.*, 2011; DEANS; MOSELEY, 2000; MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001; PITTENGER *et al.*, 1999).

Para resolver a inconsistência entre as diferentes nomenclaturas adotadas e suas propriedades biológicas, o Comitê de Células-Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional para Terapia Celular, em 2005, recomendou que as células plástico-aderentes, semelhantes a fibroblastos, isoladas da medula óssea e outros tecidos, que eram amplamente conhecidas como 'células-tronco mesenquimais', passassem a ser chamadas de 'células estromais mesenquimais multipotentes'. Enquanto o termo 'célula-tronco mesenquimal' (do inglês, 'mesenchymal stem cell' e sua sigla CTM) deveria ser reservado para um subconjunto destas (ou outras) células que demonstrassem atividade de células-tronco por critérios claramente especificados, relatados posteriormente. O comitê considerou que a sigla CTM (em inglês, MSC) poderia ser usada para ambas as

populações de células, entretanto, relatou ser imperativo que os investigadores definissem, inequivocamente, a sigla em seus trabalhos (HORWITZ *et al.*, 2005).

Em 2006, o mesmo comitê propôs um critério mínimo para caracterização das CTMs humanas: devem ser plástico-aderentes quando mantidas em condições padrões de cultura, expressar os antígenos CD (classe de diferenciação) 73, CD90 e CD105, e não expressar os antígenos CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e o antígeno leucocitário humano (HLA) classe II na sua superfície e, por fim, devem ter o potencial para se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos *in vitro*. Hoje em dia, a maioria dos estudos caracteriza as CTMs humanas derivadas de medula óssea de acordo com esses critérios (DOMINICI *et al.*, 2006). No entanto, restam muitas perguntas não respondidas sobre a verdadeira natureza e a identidade das CTMs, incluindo sua localização, origem e capacidade multipotencial. Já se relatou o isolamento de CTMs humanas a partir de vários tecidos, tais como medula óssea, tecido adiposo, fígado, músculo, fluido amniótico, placenta, sangue do cordão umbilical, sangue periférico e polpa dentária (NARDI; DA SILVA MEIRELLES, 2008; PROCKOP; 1997).

A capacidade das CTMs de se diferenciar em vários tecidos, incluindo ossos, cartilagens, tecido adiposo, vasos sanguíneos, nervos e pele, tem atraído muita atenção para a engenharia de tecido. É interessante notar que as células da medula óssea regeneram apenas o tecido específico para o local onde foram transplantadas, embora a medula óssea possa ter diferentes tipos de células-tronco (IKADA, 2006). Já foram relatadas pelo menos cinco populações de células-tronco não-hematopoiéticas adultas na medula óssea: células progenitoras endoteliais, células-tronco mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes, Células adultas indutíveis de multi-linhagem isoladas da medula óssea (do inglês, *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells* ou células MIAMI) e, mais recentemente, células-tronco muito pequenas semelhantes às embrionárias (RATAJCZAK *et al.*, 2007).

As células da medula óssea são relativamente fáceis de se coletar e expandir, e como podem se diferenciar em virtualmente qualquer tipo de célula, quando exposta a um conjunto certo de condições, elas poderiam se tornar uma "célula-tronco universal" (PITTENGER *et al.*, 2002).

Além do seu fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação, produção de fatores de crescimento e citocinas, outro motivo para as CTMs terem se tornado

foco de atenção terapêutica é devido ao seu potencial imunomodulatório (SHI; LIU; WANG, 2011; WAN *et al.*, 2008).

Com o objetivo de entender os mecanismos envolvidos na ação imunossupressora mediada pelas CTMs, Aggarwal e Pittenger (2005) isolaram várias populações de células imunes, as co-cultivaram com CTMs humanas de doadores diferentes (alógenas) e avaliaram as alterações no perfil de secreção de citocinas por essas células. O estudo foi realizado usando populações de CTMs e de células mononucleares do sangue periférico humano (hPBMCs) de doadores com HLA-incompatíveis. Os resultados mostraram que, quando CTMs estão presentes em um ambiente inflamatório (como aquele criado artificialmente pela ativação de células dendríticas (DCs), macrófagos, células *natural killer* (NK) ou células T, usando vários estímulos), elas podem alterar o resultado da resposta imune em andamento, ao inibir duas das citocinas pró-inflamatórias mais importantes, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ), e aumentar a expressão de citocinas supressoras, incluindo interleucina-10 (IL-10), resultando assim em uma mudança de um ambiente pró-inflamatório para um ambiente de células anti-inflamatórias ou tolerantes. Também foi observado que os inibidores da síntese de prostaglandina E2 (PGE2) suavizaram os efeitos supressores gerais das CTMs, sugerindo que PGE2 pode ser responsável por muitos dos efeitos imunomoduladores mediados por CTMs *in vitro*. Os autores sugeriram que a imunomodulação mediada por CTM pode ser um componente ativo na modulação da inflamação, promovendo indução de tolerância e redução de complicações do transplante, como rejeição e Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

Acredita-se que a secreção de uma gama de moléculas bioativas solúveis é o principal mecanismo pelo qual as CTMs alcançam seu efeito terapêutico (WANG *et al.*, 2014). Este mecanismo pode ser dividido em seis ações principais: imunomodulação, antiapoptose, angiogênese, suporte ao crescimento e diferenciação de células-tronco e progenitoras locais, anti-fibrótico e quimioatração. Embora o número de moléculas conhecidas por mediar a ação parácrina das CTMs aumente a cada dia, a seguir serão resumidos apenas alguns fatores secretados por culturas de CTM. Os efeitos imunomoduladores das CTMs consistem na inibição da proliferação de linfócitos T CD8 + e CD4 + e células NK, supressão da produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos, inibição da maturação de células dendríticas

(DCs) e estimulação da proliferação de células T reguladoras (Treg). A secreção de PGE₂, antígeno leucocitário humano G5 (HLA-G5), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator inibidor de leucemia (LIF) e a interleucina-10 (IL-10) contribuem para esse efeito. As CTMs também limitam a apoptose, e as principais moléculas bioativas responsáveis por esse processo são HGF, TGF- β , fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento insulínico 1 (IGF-1), stanniocalcina 1 e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). As CTMs estimulam a angiogênese local por secreção de moléculas da matriz extracelular, VEGF, IGF-1, proteína de biossíntese de fosfatidilinositol-glicano classe F (PIGF), proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e IL-6. Também estimulam a mitose de células progenitoras locais ou células-tronco por secreção do fator de célula-tronco (SCF), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), fator derivado de células estromais 1 (SDF-1), LIF e angiopoietina 1. Além disso, HGF e bFGF (e possivelmente adrenomedulina) produzidos por CTMs contribuem para a inibição de fibrose causada por isquemia. Além disso, um grupo de pelo menos 15 quimiocinas produzidas por CTMs (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL20, CCL26, CX3CL1, CXCL5, CXCL11, CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL10 e CXCL12) podem induzir a migração de leucócitos para a área lesada, o que é importante para a manutenção normal do tecido (CAPLAN; CORREA, 2011; SINGER; CAPLAN, 2011).

Entretanto, praticamente todas as informações sobre a produção de citocinas por CTMs humanas são derivadas de células cultivadas e é difícil correlacionar os resultados dos ensaios *in vitro* com o papel de cada citocina *in vivo* (CAPLAN; CORREA, 2011).

Além dessa imunomodulação, as CTMs expressam pequenas quantidades de complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I) em sua superfície e níveis negligenciáveis de MHC classe II (MHC-II) e/ou não expressão de MHC-II e de moléculas co-estimulatórias, como CD40, CD80 (ou B7-1) ou CD86 (ou B7-2), desse modo, o contato celular parece não ser o principal mecanismo de ação imunomoduladora das CTMs (ANKRUM; ONG; KARP, 2014; CAPLAN, 2009; LE BLANC *et al.*, 2003). Curiosamente, após estimulação com IFN- γ , as CTMs aumentam a expressão de MHC-II, mas ainda assim, a maioria dos estudos não

observou a ativação de células T *naive* inclusive por CTMs pré-ativadas (CHINNADURAI *et al.*, 2014; OH *et al.*, 2008).

Le Blanc *et al.* (2003), em experimentos de co-cultura celular, observaram que CTMs indiferenciadas e CTMs diferenciadas em tecido adiposo, osso e cartilagem expressavam antígenos leucocitários humanos (HLA) classe I, mas não HLA classe II e que as células não são inerentemente imunogênicas. Além disso, verificaram que as CTMs indiferenciadas e diferenciadas apresentavam um efeito imunomodulador em linfócitos alógenos, inibindo a sua proliferação. Esse efeito foi ainda aumentado após o tratamento com IFN- γ . Quando CTMs indiferenciadas foram expostas ao IFN- γ , mais de 90% das CTMs expressaram HLA classe II. No entanto, apesar da expressão de HLA classe II induzida por IFN- γ , as CTMs foram incapazes de estimular as células T. Esses achados indicaram que CTMs diferenciadas e indiferenciadas não induzem respostas alorreativas de proliferação de linfócitos e têm efeitos imunossupressores, podendo ser transplantadas entre indivíduos com HLA incompatíveis, sem risco de rejeição. As CTMs diferenciadas ao longo da linhagem osteogênica mostraram ser os moduladores mais potentes de uma resposta imune (LE BLANC *et al.*, 2003).

Dessa forma, quando combinadas com fatores de crescimento e citocinas, que promovem a diferenciação, e adequados arcabouços ou veículos para transferência a um tecido em particular, as CTMs parecem ser a célula ideal para o desenvolvimento da regeneração tecidual terapêutica e engenharia tecidual. Além disso, nenhum outro tipo celular imprevisível ou indesejado foi detectado entre as CTMs humanas diferenciadas (IKADA, 2006).

No entanto, em muitos casos, o número de células-tronco colhidas não é suficiente para aplicações clínicas. É preciso multiplicar as células coletadas em cultura. Isso é um desafio porque sua capacidade proliferativa geralmente não é muito alta, já que o número de passagens na expansão *in vitro* não deve exceder cinco (LY, 2011) e, eventualmente, pode ocorrer desdiferenciação durante a proliferação das células-tronco (IKADA, 2006).

1.2.1.2 Células MIAMI

D'Ippolito *et al.* (2004) isolaram uma nova e distinta população de células humanas multipotentes, não descritas anteriormente, presentes nas células estromais da medula óssea humana. Combinaram condições de cultura específicas, incluindo substrato de matriz extracelular, tensão de oxigênio, fatores de crescimento e vitaminas, densidade celular e co-cultura de células, projetadas para se assemelhar ao microambiente *in vivo* no qual esperavam encontrar células mais primitivas (D'IPPOLITO *et al.*, 2004).

Essas células, obtidas da medula óssea inteira de corpos vertebrais (T1-L5) de doadores cadáveres do sexo masculino e feminino, que morreram de lesão traumática fatal (faixa etária; 3 a 72 anos), foram mantidas *in vitro* sem alterações detectáveis em seu perfil molecular característico, e puderam ser expandidas para mais de 50 duplicações da população celular e diferenciadas em células da linhagem mesodérmica, bem como em células com características de linhagens neuroectodérmicas e endodérmicas. Essas células foram chamadas de células adultas indutíveis de multi-linhagem isoladas da medula óssea ou células MIAMI (D'IPPOLITO *et al.*, 2004).

As colônias derivadas de uma única célula foram definidas molecularmente pela expressão da seguinte combinação de marcadores: CD29, CD49e, CD63, CD81, CD90, CD122, CD164 e receptor do fator neurotrófico ciliar (CNTFR), receptor do fator de crescimento de hepatócito (c-Met), receptor neurotrófico tirosina kinase-3 (NTRK3) e receptor de proteína morfogenética óssea 1B (BMPR1B). Além disso, essas células foram negativas para CD36, ICAM-1 (CD54), N-CAM (CD56), CD 109, CD34, CD45, CD117 (cKit) e HLA classes I e II. Os marcadores de células-tronco embrionárias Oct-4, Rex-1 e Telomerase (hTERT) foram expressos em todas as culturas examinadas (D'IPPOLITO *et al.*, 2004, 2006).

Dessa forma, as células MIAMI expressam marcadores encontrados em células-tronco embrionárias (Oct-4 e Rex-1) e parecem estar equipadas para responder a sinais que levam à diferenciação para diversas linhagens. As células MIAMI podem ser diferenciadas em células que expressam marcadores exclusivos para osteoblastos formadores de osso, condrócitos formadores de cartilagem e

adipócitos formadores de gordura e em células com características neurais imaturas (D'IPPOLITO *et al.*, 2004).

Os autores concluíram que os corpos vertebrais cadavéricos são excelente fonte de material para o isolamento de células primitivas da medula óssea com amplo potencial proliferativo e de diferenciação. Além disso, seus estudos preliminares indicaram que as células MIAMI podem ser facilmente isoladas do sangue periférico e aspirados da crista ilíaca, sendo uma grande promessa na medicina reparadora para o tratamento de doenças degenerativas ou hereditárias, já que estão livres das preocupações éticas levantadas pelo uso de células-tronco embrionárias (D'IPPOLITO *et al.*, 2004).

Rahnemai-Azar *et al.* (2011) realizaram estudo em modelo murino com isquemia crítica dos membros posteriores e observaram que a injeção de células MIAMI no músculo adutor, ao longo da região isquêmica, promoveu a formação de vasos sanguíneos e reduziu a inflamação e a necrose no tecido isquêmico. Já em 2017, esse mesmo grupo de pesquisa publicou um estudo no qual as células MIAMI foram incorporadas a uma construção bioinspirada, feita de duas camadas de nanofibras eletrofiadas de gelatina do tipo B, e enxertadas no membro isquêmico de modelo de camundongo. Demonstraram que esta construção semeada com células MIAMI resultou em uma ampla gama de resultados positivos, com uma recuperação quase total do fluxo sanguíneo no membro lesado, limitando assim a extensão da isquemia e necrose. Observaram que a recuperação funcional do membro foi maior quando as células MIAMI foram combinadas com a construção bioinspirada, em comparação com as células MIAMI sozinhas ou a construção na ausência de células. Os autores observaram que o uso dessa construção semeado com células MIAMI também evitou a infiltração de tecido adiposo intermuscular, com algumas evidências claras de regeneração das fibras musculares (GRAU-MONGE *et al.*, 2017).

Tally *et al.* (2018) publicaram uma série de casos em humanos, no qual 75 pacientes receberam enxerto ósseo alógeno viável (ViaGraft®, Vivex Biomedical, Marietta, Georgia), utilizando células MIAMI, para fusão intervertebral lombar transforaminal minimamente invasiva. No total, 96% dos pacientes alcançaram fusão sólida num período de acompanhamento de 12 meses. Não houve complicações perioperatórias ou latentes e nenhuma transfusão nos 75 pacientes. Apesar de este trabalho apresentar a limitação de ser um estudo retrospectivo e não randomizado,

os autores concluíram que a alta taxa de fusão sem complicações suporta a segurança e eficácia do ViaGraft® para o tratamento de fusão lombar.

1.2.2 Fatores de crescimento

Há uma série de proteínas que desempenham um papel fundamental na proliferação e diferenciação de células. Essas proteínas são secretadas endogenamente no corpo por células próprias (autócrinas) ou como resultado da comunicação com células circundantes (parácrinas). Essas proteínas são chamadas de fatores de crescimento celular ou simplesmente fatores de crescimento (IKADA, 2006).

Fatores de crescimento são moléculas de sinalização solúveis que controlam uma ampla variedade de respostas celulares pela ligação específica de receptores transmembrana com células-alvo (LEE; SILVA; MOONEY, 2011). A resposta biológica final, provocada a partir de um fator de crescimento, depende da identidade do fator de crescimento e da célula-alvo, número de células, tipo de receptor e outros eventos sinalizadores. Portanto, o componente crítico, ao se planejar um sistema controlado de entrega de fármacos, é a seleção apropriada de um único ou uma combinação de fatores de crescimento, a fim de maximizar o reparo tecidual (LEE; SHIN, 2007).

Os fatores de crescimento que frequentemente têm sido aplicados à engenharia tecidual incluem proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF ou FGF-2), VEGF, TGF- β (IKADA, 2006) e IGF (LEE; SHIN, 2007).

1.2.2.1 Fatores osteogênicos

Fatores transformadores do crescimento- β (TGF- β) e BMPs são membros de uma grande família de morfogenes, conhecida como superfamília TGF- β (MUNDY, 1996). A análise biológica e as técnicas de clonagem identificaram várias proteínas

dentro da superfamília TGF- β implicadas em múltiplas funções biológicas do osso fraturado, possivelmente estimulando o recrutamento e a proliferação de células mesenquimais, sua diferenciação em osteoblastos e / ou condrócitos e produção de matriz extracelular (CELESTE *et al.*, 1990; ERLEBACHER *et al.*, 1998; KINGSLEY, 1994; WOZNEY *et al.*, 1988).

TGF- β são proteínas secretadas por diversos tipos celulares, incluindo células presentes no tecido ósseo (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e condrócitos e são armazenadas na matriz osteoide e nas plaquetas em forma latente (inativa) (BOSTROM; ASNIS, 1998; MOHAN; BAYLINK, 1991).

O TGF- β é um potente estimulador quimiotático de CTMs, aumentando a proliferação de CTMs, pré-osteoblastos, condrócitos e osteoblastos. O TGF- β inicia a sinalização para a síntese de BMP em células osteoprogenitoras e inibe a ativação de osteoclastos e estimula a apoptose de osteoclastos. O TGF- β e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) que são liberados pelas plaquetas ativadas nos estágios iniciais da consolidação de uma fratura induzem a migração, ativação e proliferação de CTMs juntamente com angiogênese e reações inflamatórias. O potencial osteoindutivo do TGF- β , no entanto, é limitado e tem mostrado vários efeitos colaterais, limitando assim seu uso clínico para regeneração óssea além de aumentar a proliferação de CTMs (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005; PELISSIER *et al.*, 2004).

As BMPs são produzidas por células osteoprogenitoras, células mesenquimais, osteoblastos e condrócitos e residem principalmente na matriz óssea extracelular. Elas têm como alvo células mesenquimais, células osteoprogenitoras e osteoblastos. As BMPs induzem uma cascata resultando em quimiotaxia; proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em condrócitos e osteoblastos, bem como de osteoprogenitores em osteoblastos; angiogênese; e síntese controlada de matriz extracelular (BESSA; CASAL; REIS, 2008). Baixos níveis de BMPs irão, por sua vez, promover a diferenciação de CTMs em adipócitos. As BMPs desempenham outros papéis no processo de cicatrização, como estimular a síntese e secreção de novo osso e fatores de crescimento angiogênicos, ativando diretamente as células endoteliais para a angiogênese e regulando a formação de calosidades (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

Dentre as BMPs, BMP-2, BMP-4 e BMP-7 são as moléculas osteogênicas mais extensamente estudadas por terem demonstrado capacidade de induzir

formação óssea e cartilaginosa *in vivo* (BOSTROM *et al.*, 1995; COOK *et al.*, 1998; ISHIDOU *et al.*, 1995; WELCH *et al.*, 1998).

1.2.2.2 Fatores angiogênicos

A vascularização desempenha um papel importante para o transporte de oxigênio, nutrientes, fatores de crescimento e células circulantes, sendo essencial para a formação e homeostase do osso (BRANDI; COLLIN-OSDOBY, 2006; KANCZLER; OREFFO, 2008). A angiogênese é regulada por moléculas solúveis, como o VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (BRANDI; COLLIN-OSDOBY, 2006). A pesquisa óssea com fatores angiogênicos tem se concentrado principalmente no papel do VEGF na neovascularização e no recrutamento, sobrevivência e atividade das células formadoras de osso (GERBER; FERRARA, 2000; HSIONG; MOONEY, 2006). Verificou-se que a administração de VEGF aumenta a densidade dos vasos sanguíneos e estimula a regeneração óssea leve em defeitos ósseos de tamanho crítico em coelhos (GEIGER *et al.*, 2005; KLEINHEINZ *et al.*, 2005) e em ratos (KAIGLER *et al.*, 2006; LEACH *et al.*, 2006; STREET *et al.*, 2002; TARKKA *et al.*, 2003). Portanto, a aplicação combinada de VEGF com outros fatores de crescimento osteoindutivos pode aumentar sinergicamente a formação óssea e a consolidação da fratura (HUANG *et al.*, 2005; KEMPEN *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2002, 2005).

1.2.2.3 Concentrados plaquetários

Fatores de crescimento autógenos estão presentes em grandes quantidades em plaquetas e são obtidos por meio da centrifugação simples e rápida de sangue total autólogo coletado do paciente. Diferentes conceitos e métodos de preparação foram desenvolvidos, que variam no conteúdo de plaquetas, leucócitos e fibrina e,

portanto, a condição de aplicação (líquido vs. gel) (ANITUA, 1999; DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; MARX *et al.*, 1998).

Os concentrados plaquetários (CPs) contêm uma combinação dos seguintes fatores de crescimento: PDGF-BB, TGF- β , b-FGF, VEGF, EGF, IGF-I. A concentração pode variar entre os pacientes e de acordo com o método de produção (FRÉCHETTE; MARTINEAU; GAGNON, 2005; MAZZUCCO *et al.*, 2009; WEIBRICH *et al.*, 2003). Os fatores de crescimento estão contidos nos grânulos alfa das plaquetas e podem ser liberados após ativação com cloreto de cálcio, trombina alógena ou por fibrina autóloga, dependendo da técnica de preparação (DOHAN EHRENFEST; RASMUSSEN; ALBREKTSSON, 2009; MAZZUCCO *et al.*, 2009; SCHLIEPHAKE, 2015).

Os CPs compreendem propriedades bioativas essenciais para promover o processo de cicatrização (BASTAMI; KHOJASTEH, 2016; SAADOUN; TOUATI, 2007) remodelação e proteção óssea (CHOUKROUN *et al.*, 2006; DEL CORSO; ETIENNE, 2009; SIMONPIERI *et al.*, 2009). Isso levou ao notável interesse e aumento em sua aplicação como um novo adjuvante terapêutico em odontologia e cirurgia oral, seja como o único material de preenchimento ou em combinação com outros materiais substitutos ósseos (KIRAN; MUKUNDA; TILAK RAJ, 2011; SONNLEITNER; HUEMER; SULLIVAN, 2000; TOZUM; DEMIRALP, 2003). No entanto, apesar das observações clínicas promissoras, sua eficácia geral permanece em debate até hoje. As principais razões incluem: resultados clínicos contraditórios, literatura insuficiente de alta qualidade baseada em evidências e má identificação das características dos produtos finais (e protocolos de preparação) usados em estudos de pesquisa; junto com - até recentemente - uma falta de nomenclatura adequada para tipificar esses concentrados (DAMSAZ *et al.*, 2020).

Em recente revisão sistemática, realizada por Stähli, Strauss e Gruber (2018), foram incluídos somente dois estudos clínicos randomizados (ESKAN *et al.*, 2014; TORRES *et al.*, 2010) que realizaram aumento do rebordo alveolar com plasma rico em plaqueta (PRP) (com um total de 62 pacientes). Ambos apresentaram resultados melhores com o uso de PRP, como o aumento da largura da crista marginal, uma maior porcentagem de osso vital, maior ganho de altura e largura óssea e menor exposição da tela de titânio. Porém, a falta de dados detalhados em ambos os trabalhos impediu uma abrangente comparação dos resultados. Além disso, devido

ao pequeno número de estudos e às diferentes abordagens cirúrgicas utilizadas, os autores tiveram dificuldade em gerar recomendações clínicas.

Dessa forma, as limitações para a avaliação da eficácia do PRP incluem as diferentes técnicas, protocolos e kits comerciais existentes, que geram diferentes produtos finais, com diferentes concentrações e composições plaquetárias (ANITUA *et al.*, 2013). Entre essas diferenças está a inclusão ou não de leucócitos no produto final do PRP, já que pode ser dividido em dois grupos principais: plasma rico em plaquetas puro sem leucócitos (P-PRP) e plasma rico em plaquetas e leucócitos (L-PRP) (MAGALON *et al.*, 2016). Além disso, a necessidade de um grande volume de sangue e o uso de trombina xenogênica também têm sido relatados como limitações importantes para o uso de PRP em ambientes clínicos e não hospitalares (MARX *et al.*, 1998).

Fibrina rica em plaqueta pura (P-PRF) e fibrina rica em plaquetas e leucócitos (L-PRF) são concentrados plaquetários autólogos, de segunda geração, coletados no pré-operatório imediato e produzidos sem manipulação bioquímica do sangue. A fibrina rica em plaquetas (PRF) pode ser descrita como um material semelhante a um gel de fibrina, que é polimerizado lentamente e é fortemente abundante em fatores de crescimento, plaquetas, leucócitos (quase metade do sangue inicial coletado) e linfócitos, coletado após a centrifugação simples e rápida (~10 min) de sangue (10 mL), em tubos sem anticoagulante, trombina bovina, aditivos ou qualquer outro agente gelificante, isto é, sob concentrações naturalmente fisiológicas de trombina autóloga (DOHAN EHRENFEST *et al.*, 2009). O "coágulo" resultante é estável, resiliente, forte, adesivo e maleável, que pode ser facilmente cortado e/ou adaptado em diferentes defeitos anatômicos: misturado com material de enxerto ósseo, aplicado como material de preenchimento de forma direta, ou mesmo compactado em uma membrana de fibrina mais forte. Além dessa facilidade clínica de uso e manuseio, os subprodutos de PRF fornecem propriedades bioquímicas atraentes, como características hemostáticas, angiogênicas, osteogênicas, antiinflamatórias, antimicrobianas, inibidoras da dor e cicatrizantes, tornando as PRFs, pelo menos, desejáveis e revolucionárias (DAMSAZ *et al.*, 2020; DEL CORSO *et al.*, 2012).

Damsaz *et al.* (2020) realizaram uma revisão sistemática a fim de avaliar a efetividade de L-PRF para aumento do seio maxilar e não encontraram nenhuma vantagem ou desvantagem na aplicação de preparações de PRF e seus

subprodutos em combinação com materiais de enxerto ósseo. Segundo os autores, o uso de enxertos ósseos permanece muito mais previsível do que o uso de L-PRF sozinho, em particular. A combinação de ambos os “biomateriais”, no entanto, poderia avançar ou acelerar a cicatrização e o tempo de inserção do implante dentário. Entretanto, na elevação do seio nasal e no tratamento da membrana de Schneider, a formação de osso maduro permaneceu inconclusiva.

As preparações de L-PRF tendem a funcionar mais como biomateriais biologicamente ativos, arcabouços e/ou matrizes (plataformas) para células autólogas e liberação e entrega do fator de crescimento. Portanto, devem ser consideradas uma preparação de “tecido vivo” para regeneração tecidual guiada natural, em vez de apenas um adjuvante cirúrgico “rico em fator de crescimento” (DAMSAZ *et al.*, 2020).

Canellas *et al.* (2019) e Damsaz *et al.* (2020) concluíram, em suas revisões sistemáticas, que mais estudos randomizados são necessários, utilizando protocolos padronizados e com baixo risco de viés, a fim de comprovar os efeitos benéficos das PRFs nas diversas intervenções cirúrgicas orais.

1.2.3 Arcabouços tridimensionais

A maioria dos tecidos e órgãos de grande porte, com forma tridimensional distinta, exigirá suporte para sua formação a partir de células. O suporte é chamado em inglês de *scaffold*, podendo ser traduzido como arcabouço, molde ou matriz extracelular artificial. A principal função do arcabouço é semelhante àquela da matriz extracelular natural, que auxilia na proliferação, diferenciação e biossíntese de células. Além disso, um arcabouço colocado no local da regeneração impedirá que células não desejadas invadam o local de ação (IKADA, 2006).

Para cumprir as funções de um arcabouço ósseo em engenharia de tecido, o mesmo deve atender a uma série de requisitos: ser bioinerte, biocompatível, bioativo e biodegradável com propriedades mecânicas adequadas. Além disso, o biomaterial também deve ser capaz de resistir à esterilização para prevenir infecções e estar interligado e demonstrar porosidade controlada (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014). O biomaterial deve ser 90% poroso com

diâmetro adequado do poro (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEES; RAMIREZ-VICK, 2014), ter microporos interconectados, de modo que várias células possam ser semeadas, migrem para o interior e proliferem, e deve ser abastecido por quantidades suficientes de nutrientes. Os microporos promovem formação vascular e possibilita o transporte de resíduos. Isso é importante para a sobrevivência das células dentro do arcabouço. A cinética de absorção de arcabouço também é fundamental e depende do tecido a ser regenerado. A degradação do biomaterial do arcabouço ósseo deve ser relativamente lenta, uma vez que tem que manter a resistência mecânica até que a regeneração tecidual esteja concluída (MURPHY *et al.*, 2013)

Os numerosos e diferentes tipos de arcabouços foram classificados predominantemente de acordo com as características intrínsecas dos biomateriais e alocados em macrogrupos (HENCH; POLAK, 2002).

Cecacarelli *et al.* (2017) publicaram uma revisão com os principais tipos de arcabouços utilizados e os dividiram, resumidamente, em enxertos ósseos, matrizes, materiais poliméricos e arcabouços compostos, como apresentamos a seguir.

1.2.3.1 Enxertos ósseos

Os diferentes tipos de enxertos ósseos (autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos) podem ser utilizados como arcabouços, sendo os autógenos considerados o padrão-ouro dentre todos os enxertos, por terem as características fundamentais de osteogênese, osteocondução e osteoindução (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEES; RAMIREZ-VICK, 2014).

Os aloenxertos, derivados de doadores da mesma espécie (geralmente de bancos de ossos), perdem muitas de suas características durante o longo e caro processo de esterilização e descelularização. Embora esses processos sejam necessários para minimizar a rejeição ou a transmissão de doenças, eles privam o osso de suas propriedades osteogênicas, tornando-o uma estrutura simples e vazia. Esses enxertos podem ainda ser classificados como aloenxerto de osso liofilizado (*freeze-dried bone allograft* (FDBA)) e aloenxerto de osso liofilizado desmineralizado

(*demineralized freeze-dried bone allograft* (DFDBA)) (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY, 2001).

Devido aos seus altos custos de fabricação e aumento da taxa de reabsorção, esses tipos de enxertos são limitados aos pequenos e médios defeitos (PILIPCHUK *et al.*, 2015).

Os xenoenxertos, obtidos principalmente de bovinos, suínos e equinos, são uma alternativa mais barata aos aloenxertos, mas passam por procedimentos de esterilização semelhantes. Vários estudos têm demonstrado que esses materiais fornecem suporte e sobrevivência semelhantes aos dos enxertos ósseos autólogos, mas sem as propriedades osteogênicas. O osso bovino desproteinado em grânulos ou blocos esterilizados é um exemplo de xenoenxerto comumente usado para regeneração óssea (AICHELMANN-REIDY; YUKNA, 1998; MANFRO *et al.*, 2014).

Vários enxertos aloplásticos, como β -fosfato tricálcico (β -TCP), biocerâmicas e hidroxiapatita (HA), têm sido usados para regeneração óssea. Eles podem ser fabricados com custos menores em comparação com os biomateriais heterólogos; entretanto, sua reabsorção nem sempre é ideal. Embora a reabsorção inadequada não cause problemas na enxertia óssea para prótese muco-sustentada, na enxertia pré-implante, o material enxertado residual pode prejudicar a osseointegração (CECCARELLI *et al.*, 2017).

1.2.3.2 Matrizes

Uma matriz é definida como uma estrutura microscópica inserida no corpo para dar forma a uma estrutura macroscópica e organizada. As matrizes são divididas em matrizes orgânicas e inorgânicas (CECCARELLI *et al.*, 2017).

As matrizes orgânicas incluem o colágeno tipo I - a proteína mais abundante nos tecidos humanos e animais, necessária para a manutenção estrutural dos tecidos. O colágeno também foi incluído no grupo de materiais poliméricos. Todas as matrizes inorgânicas têm características comuns, como fragilidade, nenhuma suscetibilidade à corrosão, pequena resistência à fadiga, ausência de qualquer resposta inflamatória induzida e não possui as propriedades de osteogênese e indução óssea (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

HA e fosfato de cálcio (CaP) são as matrizes inorgânicas comumente usadas (CECCARELLI *et al.*, 2017).

1.2.3.3 Materiais Poliméricos

Os materiais poliméricos são classificados como polímeros naturais e sintéticos. Os polímeros naturais são de origem orgânica e o polímero orgânico mais representativo é o colágeno. O colágeno é usado na regeneração óssea e periodontal, geralmente em combinação com outros materiais de enxerto, como HA e β -TCP (CECCARELLI *et al.*, 2017). Outros polímeros orgânicos usados, menos frequentemente para regeneração óssea, incluem alginato, ácido hialurônico, quitosana e hidrogel (POLO-CORRALES; LATORRE-ESTEVEZ; RAMIREZ-VICK, 2014).

Os polímeros sintéticos são fabricados industrialmente a partir de fontes inorgânicas. Eles são classificados como polímeros absorvíveis e não absorvíveis. Os poliésteres reabsorvíveis são predominantes entre os polímeros sintéticos. Eles incluem ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido polilático-poliglicólico (PLGA), polietilenoglicol (PEG), PEG com PLGA (PEG-PLGA) e policaprolactona (PCL) (PILIPCHUK *et al.*, 2015).

O polímero não absorvível mais usado na regeneração óssea é o politetrafluoroetileno expandido (e-PTFE). Este polímero é utilizado na forma de uma membrana para recobrir enxertos ósseos e é utilizado como barreira entre o material do enxerto e os tecidos moles do retalho, a fim de inibir o início precoce da formação de fibroblastos derivados da gengiva, que poderiam provocar a formação de tecido cicatricial antes da proliferação de osteoblastos. O e-PTFE é comumente ancorado com pinos absorvíveis metálicos ou sintéticos e subsequentemente removido antes da colocação do implante (SIMION *et al.*, 1997).

1.2.3.4 Arcabouços compostos (ou compósitos)

É possível combinar alguns desses materiais para melhorar suas características mecânicas e osteocondutivas. Os arcabouços contendo HA reforçado com colágeno foram desenvolvidos para superar as limitações de resistência mecânica do colágeno e estimular a diferenciação das células do estroma *in vitro* e *in vivo* (KANE *et al.*, 2015). Embora a combinação de diferentes materiais geralmente seja conveniente, é essencial que o *design* desses arcabouços compostos seja preciso para otimizar os resultados, minimizar as desvantagens de cada material e aumentar as propriedades vantajosas (CECCARELLI *et al.*, 2017).

Arcabouços enriquecidos com HA tiveram os melhores resultados em cirurgia maxilofacial (KIM *et al.*, 2006). Em particular, diferentes formulações de colágeno enriquecidas com nano-HA foram criadas para aumentar a migração e a diferenciação de células progenitoras envolvidas na regeneração óssea (KANE *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

A literatura sugere que não foi possível desenvolver o arcabouço “perfeito” para a regeneração óssea maxilar. No entanto, a combinação de diferentes biomateriais representa a meta para futuros estudos de engenharia tecidual e ensaios clínicos em Odontologia (CECCARELLI *et al.*, 2017).

Estudos recentes têm mostrado que o uso de arcabouços compostos suplementados com CTMs é um procedimento seguro com resultados previsíveis de sucesso. Na verdade, vários estudos demonstraram uma boa interação entre estruturas orgânicas ou inorgânicas e células-tronco adultas *in vitro* (CECCARELLI *et al.*, 2017; MANGANO *et al.*, 2015).

1.3 Uso de células mesenquimais alógenas

O uso de CTMs autólogas em um ambiente clínico mostra várias limitações, uma vez que seu isolamento está associado à morbidade do sítio doador, além de sua dificuldade de obtenção em alguns pacientes, como pessoas idosas e/ou com

doenças sistêmicas, nas quais as CTMs mostram uma funcionalidade reduzida, em termos de seu potencial de proliferação e/ou diferenciação (DUFRANE, 2017) Além disso, a extração de auto-CTMs é demorada, tornando difícil usá-las prontamente, principalmente para tratar casos de doenças agudas, como acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (ZHANG *et al.*, 2015).

Nesse contexto, a utilização de CTMs alogênicas, comercialmente disponíveis, jovens e saudáveis representa uma vantagem terapêutica e podem ser uma atraente fonte de células universais (HALM *et al.*, 2021), já que estão prontamente disponíveis, podendo ser administradas imediatamente, além da sua produção comercial poder garantir o controle de qualidade e reduzir o custo das terapias celulares. Portanto, as CTMs alógenas são alternativas promissoras às CTMs autógenas, com vantagens em relação ao tempo, custo e garantia de qualidade (ZHANG *et al.*, 2015).

No entanto, a rejeição imunológica é ainda uma limitação importante e controversa para o uso clínico de CTMs alogênicas (HALM *et al.*, 2021). Enquanto a maioria dos estudos mostra que a aplicação de CTMs alogênicas é segura (LE BLANC *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2013), outros apresentam evidências claras que as CTMs podem, de fato, provocar aloimunidade e até mesmo estimular a rejeição do enxerto (DEUSE *et al.*, 2011; NAUTA *et al.*, 2006; SEIFERT *et al.*, 2012). Embora as alo-CTMs não sejam tão imunogênicas quanto os outros tipos de células alógenas, como os fibroblastos HLA-incompatíveis ou células-tronco hematopoiéticas, que provocam uma rejeição rápida em hospedeiros imunocompetentes, Ankrum, Ong e Karp (2014) não consideram apropriado conceituar as CTMs como imunoprivilegiadas porque elas provocam uma resposta imune humoral e celular *in vivo*. Em vez disso, sugerem que as CTMs devem ser consideradas "evasivas imunologicamente". O tempo e a gravidade da rejeição de CTMs parecem ser fortemente dependentes do contexto e ditados por um equilíbrio entre a expressão de fatores imunogênicos e imunossupressores pelas CTMs (ANKRUM; ONG; KARP, 2014).

Apesar disso, estudos têm sido realizados relatando a segurança e eficácia no uso de CTMs alogênicas, sem que qualquer evento adverso importante tenha sido associado à sua administração (DARVEAU *et al.*, 2021; GRAU-MONGE *et al.*, 2017; RAHNEMAI-AZAR *et al.*, 2011).

Mangano *et al.* (2015) realizaram uma revisão sistemática com 39 estudos (18 estudos em animais e 21 em humanos) para avaliar a efetividade do uso de CTMs, para aumento de seio maxilar, associado com diferentes materiais de arcabouço. Os resultados demonstraram um efeito positivo das células-tronco na regeneração óssea, quando comparadas com o uso de arcabouços sem células. Os autores sugeriram que o uso de células-tronco semeadas em materiais de suporte apropriados ditará avanços na regeneração óssea: como consequência, as melhorias nas estratégias terapêuticas atuais dependerão de inovações na ciência dos materiais. Recomendaram também a busca por arcabouços adequados para as CTMs, com taxa de reabsorção e superfície osteocondutora adequadas, sobre os quais possa ocorrer nova formação óssea.

Deluiz *et al.* (2019) utilizaram um modelo animal murino (ratos nude atímicos) para avaliação das propriedades osteogênicas de micropartículas ósseas provenientes de cadáveres humanos e semeadas com CTMs derivadas da medula óssea humana (células MIAMI), comercialmente disponíveis, enxertadas para aumento ósseo mandibular, e compararam com micropartículas ósseas não-celularizadas. A análise por microtomografia computadorizada (micro-TC) demonstrou que o conteúdo celular no biomaterial aumentou o volume da neoformação óssea e promoveu remodelação mais rápida das micropartículas ósseas. O grupo celularizado alcançou maior ganho de volume ósseo em relação ao grupo de micropartículas ósseas sem células. Análises histológicas confirmaram a maior taxa de remodelação óssea e a maior fração de osso neoformado dentro da área do enxerto quando as micropartículas ósseas foram combinadas com CTMs. Nenhuma célula inflamatória foi observada em nenhum grupo. A análise imunohistoquímica mostrou que o grupo enxertado com biomaterial celularizado apresentou significativamente mais células positivas para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e osteocalcina (OCN) em quatro semanas, em comparação com o grupo não-celularizado, demonstrando assim maior atividade de remodelação no tempo mais adiantado (quatro semanas). As células humanas enxertadas permaneceram viáveis e foram detectadas até pelo menos oito semanas, conforme observado usando o anticorpo antimitocôndria específico humano. Os autores sugeriram que este biomaterial celularizado (ViaGraft®, Vivex Biomedical, Miami, FL), disponível para compra no mercado norte-americano em quantidade ilimitada pode, portanto, representar um avanço significativo no campo do aumento ósseo

mandibular por proporcionar um maior volume de neoformação óssea em um tempo menor.

Wofford *et al.* (2020) realizaram um estudo com CTMs humanas derivadas de tecido adiposo, semeadas em Gelfoam®, e implantadas em um defeito ósseo alveolar maxilar em ratos, a fim de avaliar a consolidação e regeneração ósseas *in vivo*. As CTMs humanas foram aderidas, proliferaram e distribuídas uniformemente, e foram submetidas a diferenciação osteogênica em Gelfoam®. Os dados confirmaram que Gelfoam®, um biomaterial clínico comumente utilizado, pode ser usado como um arcabouço para fixação de células e um veículo de entrega para implantar CTMs *in vivo*. Análises histomorfométricas do osso coletado de ratos tratados com CTMs humanas mostraram aumento estatisticamente significativo no colágeno/formação óssea inicial, com células positivas para marcadores osteogênicos e angiogênicos no local do defeito. Este padrão foi visível com quatro semanas após o tratamento. Os autores concluíram que as CTMs humanas, implantadas xenogenicamente, têm potencial de cicatrizar defeitos ósseos alveolares em ratos, quando entregues e contidas no local da lesão óssea por meio de um arcabouço bioinerte.

Pelo exposto acima, pôde-se observar que a relativa disponibilidade e facilidade de coleta de CTMs, tanto derivadas da medula óssea, quanto de outros tecidos, juntamente com seu potencial osteogênico, observado quando aplicado e mantido dentro de um defeito ósseo, apresentam um aditivo bioativo promissor à engenharia de tecido ósseo. A aplicação de tais plataformas de materiais baseados em células, portanto, oferece uma abordagem viável e eficaz para a restauração clínica de defeitos ósseos orais e maxilofaciais (WOFFORD *et al.*, 2020). A fusão entre essas disciplinas, pesquisa com células-tronco e engenharia de arcabouços, desenhará o futuro da medicina regenerativa (MANGANO *et al.*, 2015).

2 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo incluíram:

a) Objetivo primário

- avaliar o potencial osteogênico e a incorporação óssea de enxertos ósseos humanos celularizados com CTMs para aumento mandibular em ratos;

b) Objetivos secundários

- avaliar parâmetros micro-tomográficos dos enxertos ósseos humanos celularizados e comparar com um controle não-celularizado,
- quantificar, por meio de análise histológica e histomorfométrica, o osso neoformado, as partículas remanescentes e o tecido calcificado total dos enxertos ósseos humanos celularizados e comparar com um controle não-celularizado,
- avaliar a expressão imuno-histoquímica de marcadores de formação e remodelação óssea dos enxertos ósseos humanos celularizados e comparar com um controle não-celularizado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Grupos de animais

Este estudo foi aprovado pela *Institutional Animal Care and Use Comitee* (IACUC) da Universidade de Miami e todos os métodos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos relevantes.

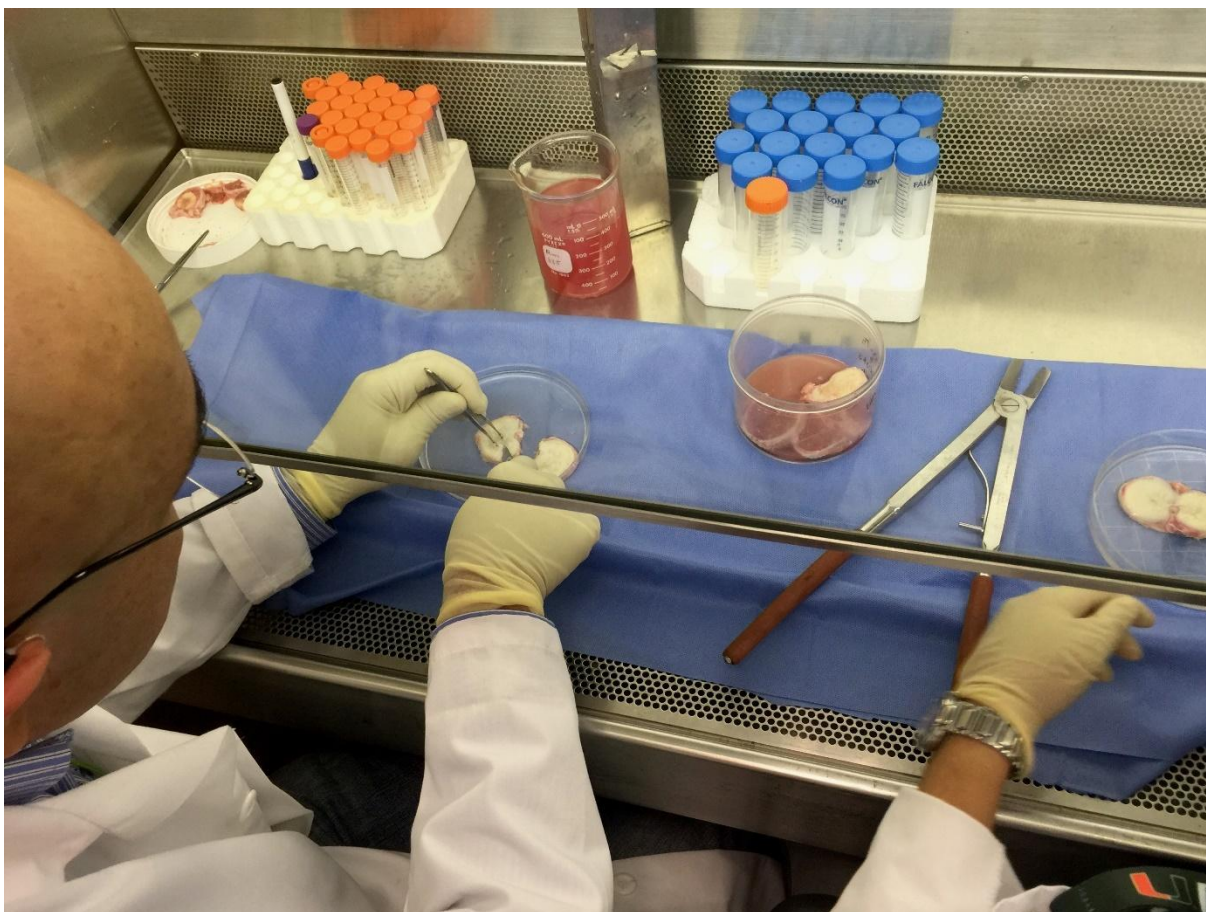
Vinte ratos nude atômicos (NTac: NIH-Foxn1rnu, fêmeas, 10 semanas de idade, pesando 150-200 g) foram usados neste estudo. A análise do poder e os cálculos do tamanho da amostra foram realizados usando o software G * Power 3.0. A análise do poder da amostra foi realizada usando análise de variância (ANOVA) de um fator em um projeto piloto, incluindo 4 grupos independentes com $\alpha = 0,05$, um efeito de 0,85 e um tamanho de amostra de 20 animais (para todos os grupos), resultando em um poder $> 0,80$. Os 20 animais foram alocados em dois grupos diferentes com 10 ratos: o grupo teste, que recebeu enxerto ósseo humano celularizado, e o grupo controle, que recebeu as mesmas micropartículas ósseas, porém sem células. Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados com 4 semanas e os outros cinco, com 8 semanas.

3.2 Obtenção dos enxertos ósseos

Fragments de vértebras humanas frescas do Banco de Tecidos da Universidade de Miami foram captados de doadores cadáveres e triturados em um triturador ósseo manual (Figura 1), de forma a produzir *chips* ósseos de tamanhos visualmente uniformes (0,5 a 1mm de diâmetro). Os *chips* ósseos foram, então, lavados com solução salina estéril e ultracongelados a -80°C , imersos em meio crioprotetor 0,001% DMSO (dimetilsulfóxido), a fim de preservar as CTMs (grupo teste ou grupo celularizado). Exatamente os mesmos *chips* ósseos, porém

hidratados com *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) e ultracongelados a -80°C, foram utilizados como grupo controle (grupo não-celularizado). A consistência macromorfológica, textura e aparência de ambos os materiais após a preparação eram indistinguíveis.

Figura 1 – Trituração manual de fragmentos de vértebras humanas



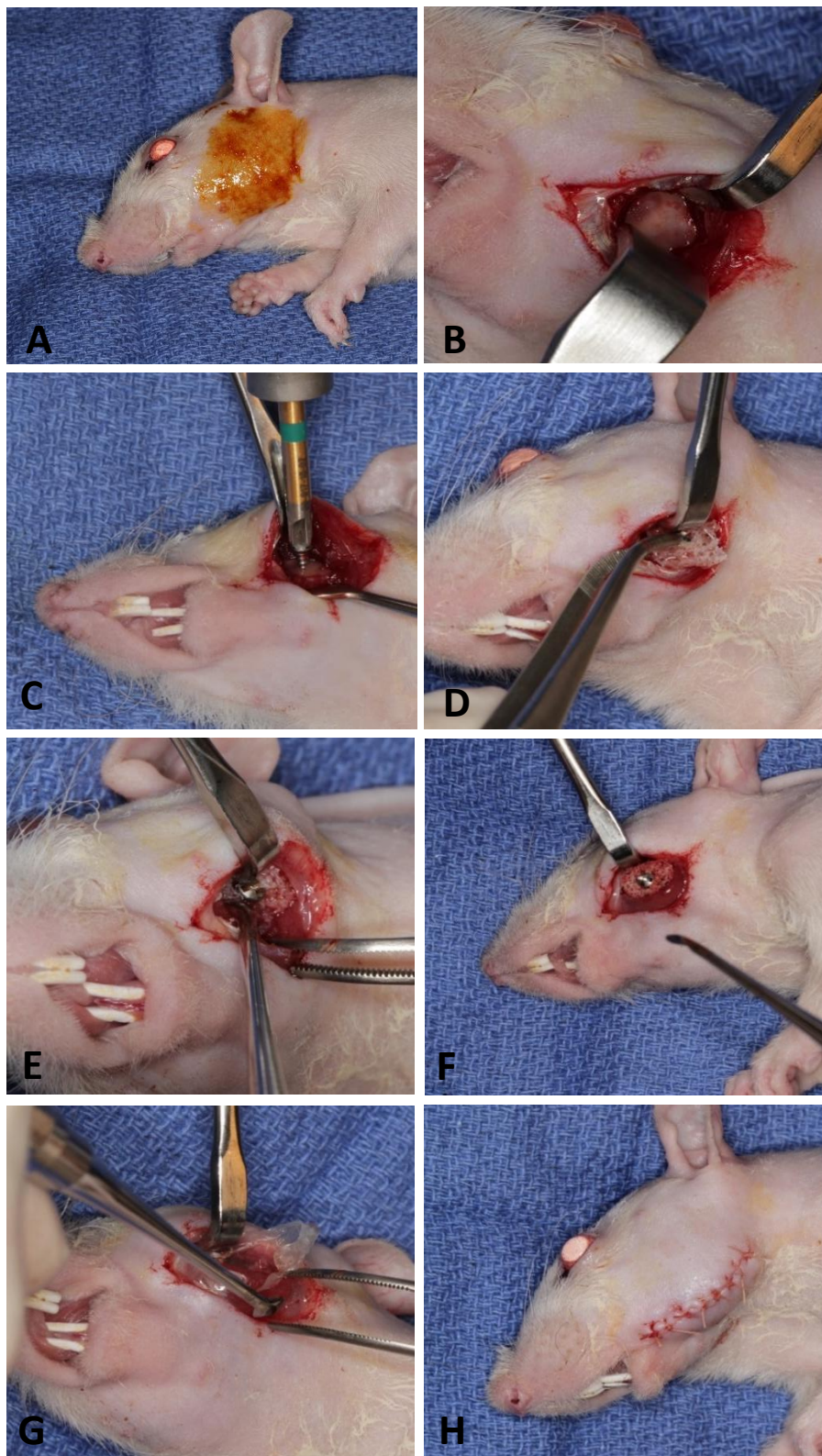
Fonte: Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Daniel Deluiz.

3.3 Procedimento cirúrgico

Todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo cirurgião oral (Figura 2). Os ratos foram anestesiados com isoflurano e então colocados em uma almofada térmica a 37 °C. Uma pomada oftalmológica (Puralube® Vet Ointment) foi aplicada nos olhos para evitar o ressecamento. Anti-sepsia da região submandibular foi feita

com aplicação tópica de iodo polivinilpirrolidona (Figura 2, legenda A). A abordagem cirúrgica submandibular foi realizada com uma incisão linear envolvendo as camadas cutânea e subcutânea expondo o músculo masséter. O músculo foi incisado ao longo da borda submandibular com cuidado para não lesar o nervo facial. Um retalho, incluindo o músculo e o periósteo, foi levantado expondo o aspecto lateral da mandíbula do rato, criando assim uma bolsa embaixo do masséter. O leito hospedeiro foi mantido intacto para evitar fratura ou osso insuficiente para estabilizar o parafuso de titânio (Figura 2, legenda B). Um microparafuso de titânio de 4,0 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro (KLS Martin, Tuttlingen, Alemanha) foi fixado na face lateral da mandíbula para manter o espaço e estabilizar o enxerto com a técnica da tenda (MARX *et al.*, 2002) (Figura 2, legenda C). 0,1 cc do material (*chips* ósseos celularizados ou não- celularizados) foi então colocado ao redor e sobre o topo do parafuso (Figura 2, legendas D, E, F). A quantidade de material (0,1cc) foi escolhida para preencher completamente o vazio entre o osso e o músculo elevado e então coberto com uma membrana amniótica reabsorvível (Cygnus Solo®, Vivex Biomedical Inc.) (Figura 2, legenda G). As cirurgias seguiram a mesma padronização de estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DELUIZ *et al.*, 2019). O fechamento da ferida cirúrgica foi feito no músculo e por planos cutâneos com fio de sutura Vicryl 5–0 (Figura 2, legenda H). A antibioticoterapia foi realizada com uma dose única de gentamicina (5,0 mg / kg IM) e para controle da dor foi administrada buprenorfina (0,1 mg / kg SC) uma vez antes da cirurgia e durante 3 dias após. Os ratos receberam uma dieta mole no pós-operatório por 3 dias e depois receberam ração padrão. A água foi fornecida *ad libitum*.

Figura 2 - Procedimento cirúrgico: aumento do rebordo alveolar em ratos

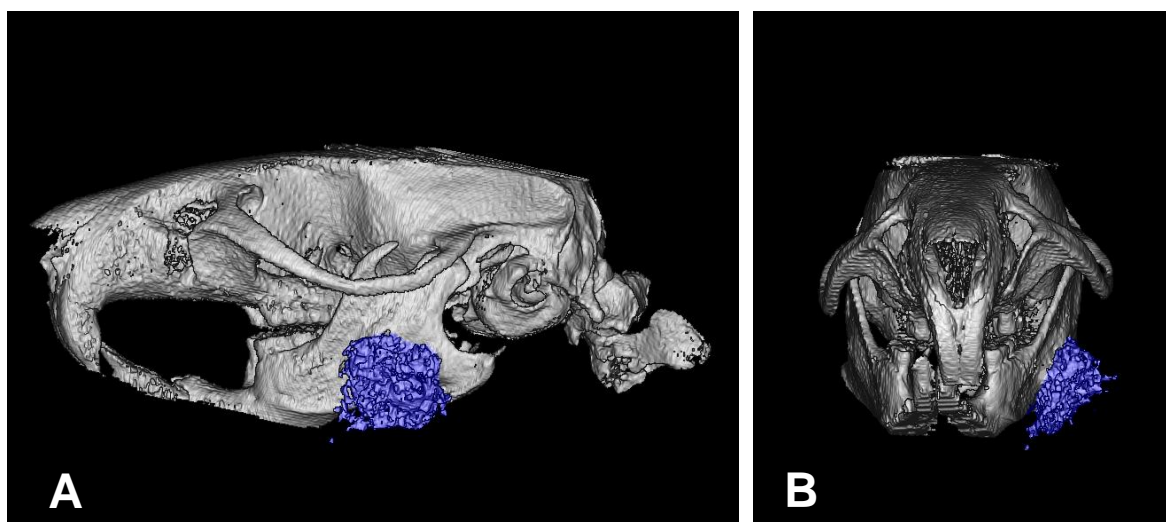


Legenda: A) Anti-sepsia com aplicação tópica de iodo polivinilpirrolidona. B) Acesso cirúrgico submandibular. C) Fixação de microparafuso de titânio. D, E, F) Inserção dos *chips* ósseos ao redor do parafuso. G) Inserção de membrana amniótica reabsorvível. H) Fechamento da ferida cirúrgica.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

A Figura 3 mostra uma micro-TC realizada dois dias após a cirurgia para representar a estrutura inicial do enxerto. Para fins ilustrativos, uma imagem foi reconstruída em um software de modelagem 3D, VoximOsteo (IVS Technology GmbH, Chemnitz, Alemanha). Os animais foram eutanasiados com 4 (n=10) e 8 (n=10) semanas após a cirurgia, usando inalação de CO₂ e decapitados. Cada cabeça/amostra recebeu um número de referência para cegar o examinador para as análises.

Figura 3 - Imagem inicial, reconstruída em 3D, da área enxertada na mandíbula



Legenda: A) Vista lateral do crânio de um animal do estudo, mostrando em azul a área enxertada na mandíbula. B) Vista frontal.

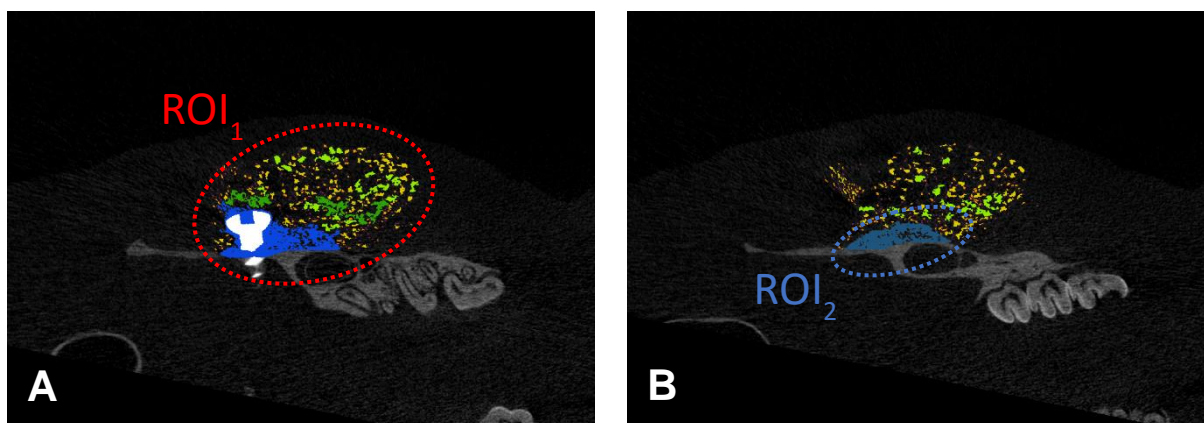
Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

3.4 Análise de Microtomografia Computadorizada

As cabeças dos animais foram escaneadas usando um aparelho de micro-TC Bruker (SkyScan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica). Os parâmetros de imagem foram: filtro de alumínio de 1 mm, exposição de 71 ms, 65 kV, 385 μ A, tamanho de pixel de 18 μ m e 0,70 ° de etapa de rotação. As imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (Bruker) com 30% de correção de endurecimento de feixe (*beam hardening correction*). As análises foram realizadas pelo mesmo investigador apresentando índice Kappa de reprodutibilidade intraexaminador de 0,90. A

identificação do animal foi mascarada do investigador. Todos os parâmetros foram alinhados com a mesma orientação (lado lateral da mandíbula alinhado horizontalmente e parafuso de titânio alinhado verticalmente) usando o software DataViewer (Bruker). Uma região de interesse ou *region of interest* (ROI) que compreende toda a área enxertada (formação calcificada homogênea em torno do parafuso de titânio mais micropartículas espalhadas resultantes do excesso de material), excluindo a mandíbula e o parafuso de titânio, foi selecionada nas imagens reconstruídas (ROI₁) usando o software CTAnalyser (Bruker) (linha pontilhada vermelha na Figura 4, legenda A). Para evitar a análise do excesso de material que não participava do aumento ósseo, uma nova região dentro da ROI₁ foi selecionada, ROI₂ (em azul na Figura 4, legenda B). ROI₂ foi definido de uma maneira padronizada para todas as amostras usando um limite da Unidade Hounsfield (entre +200 e +2000 HU). Este limiar incluiu a área visualmente incorporada (formação calcificada homogênea em torno do parafuso de titânio) e excluiu as partículas em excesso e o parafuso das medições. Os parâmetros avaliados no ROI₂ foram: ganho de volume ósseo, densidade mineral óssea (DMO) e volume ósseo/volume total tecidual (do inglês, *bone volume/tissue volume*, BV/TV).

Figura 4 - Imagem de micro-TC identificando ROI₁ e ROI₂



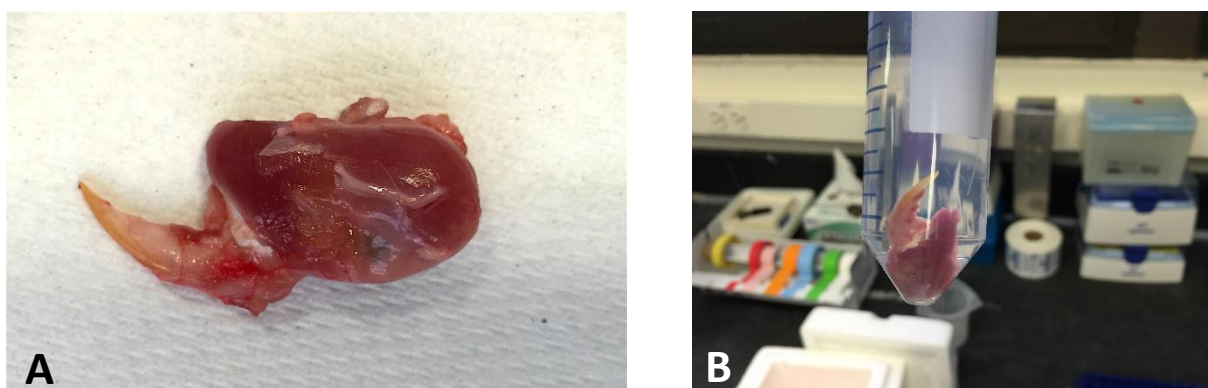
Legenda: A) Linha pontilhada em vermelho identificando a ROI₁, que compreende toda a área enxertada, excluindo-se a mandíbula e o parafuso de titânio; B) Região em azul identificando a ROI₂, região dentro da ROI₁, com exclusão do excesso de material não incorporado.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

3.5 Técnica Histológica

Imediatamente após a análise de micro-TC, as mandíbulas (lado esquerdo) foram removidas cirurgicamente (Figura 5, legenda A) junto com o tecido circundante e fixados com formalina tamponada neutra a 10% por 1 semana (Figura 5, legenda B). Os parafusos de titânio foram removidos tomando cuidado para não danificar as áreas enxertadas. As amostras foram descalcificadas com a solução descalcificante Cal-Ex (Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) por 3 dias, enxaguadas em água destilada, desidratadas em banhos crescentes de álcool etílico (70%, 90%, 100% I e 100% II), diafanizado em xileno (3 banhos) e impregnadas em 2 banhos de parafina à 56°C e incluídos em parafina.

Figura 5 – Aspecto macroscópico da peça cirúrgica



Legenda: A) Macroscopia da peça cirúrgica (lado esquerdo da mandíbula). B) Fixação em formol tamponado a 10%.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

Os blocos de parafina foram então cortados em uma espessura de 3 μm e, em seguida, os cortes obtidos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson para avaliação histológica e histomorfométrica. Para isso, as amostras foram desparafinizadas e deixadas em hematoxilina de Weigert por 10 minutos, fucsina por 4 minutos, ácido fosfomolibdico por 5 minutos e em azul de anilina por 5 minutos. Lavagens com água destilada foram feitas antes de cada mudança de solução.

3.6 Análise Histológica

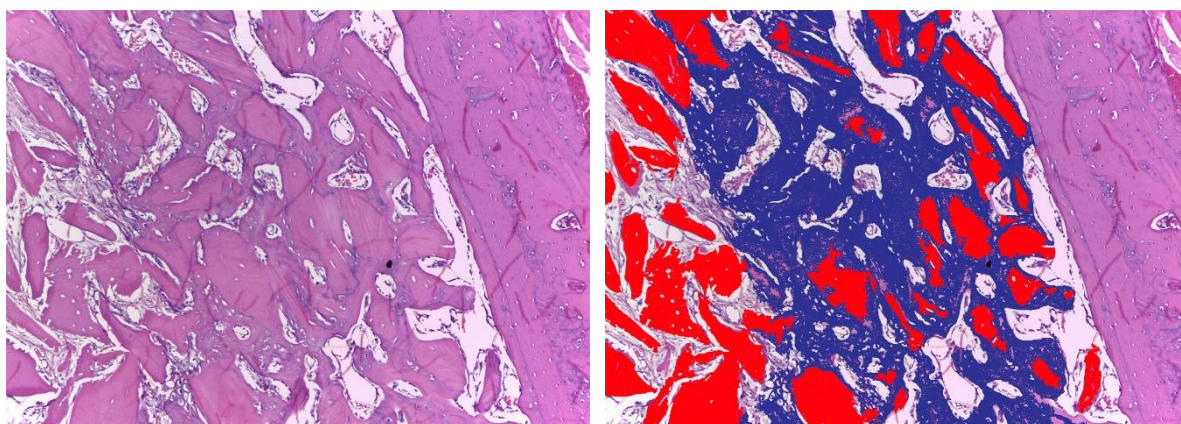
A análise histológica foi descritiva, feita por meio da avaliação das lâminas coradas em HE e Tricrômio de Masson em microscópio óptico Nikon Eclipse 90i.

3.7 Histomorfometria

A avaliação histomorfométrica foi realizada por um único investigador treinado cego usando 4 imagens capturadas da lâmina corada em HE de cada amostra (o suficiente para cobrir toda a área enxertada), com objetiva de 10x usando o Software ImageJ (NIH). O investigador foi previamente testado para reprodutibilidade intraexaminador apresentando um índice Kappa de 0,80.

Os parâmetros avaliados foram: osso neoformado, partículas remanescentes do enxerto e tecido calcificado total. O osso neoformado bem como os remanescentes de enxerto não incorporados foram identificados visualmente nas imagens e marcados com a ferramenta de seleção do software. Erros na seleção automática foram verificados e corrigidos manualmente. As áreas definidas como osso neoformado foram então coloridas em azul, enquanto as áreas não incorporadas dos enxertos ósseos foram coloridas em vermelho (Figura 6). A rotulagem de cores (azul e vermelho) permitiu que as seleções fossem mais facilmente distinguíveis. O tecido calcificado total foi a soma das duas áreas (osso neoformado e partículas remanescentes do enxerto). A quantidade de cada parâmetro foi calculada como uma porcentagem de toda a área de superfície da imagem (excluindo o osso cortical, quando este aparecia na imagem) e tirada a média dos 4 campos para cada amostra.

Figura 6 – Fotomicrografias representativas dos parâmetros avaliados por meio de histomorfometria



Legenda: A) Corte histológico da área do enxerto corado em HE. B) Osso neoformado foi colorido pelo Software Image J de azul e áreas não incorporadas de vermelho.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

3.8 Análise imuno-histoquímica

Foram realizadas reações imuno-histoquímicas utilizando os seguintes anticorpos primários para avaliar a neoformação óssea: anti-OCN (Osteocalcina, marcador de osteoblastos, diluição 1:200), anti-OPN (Osteopontina, marcador de osteoblastos, diluição 1:100) e anti-COL I (Colágeno tipo I, marcador de colágeno tipo I, diluição 1:100). Para avaliar a remodelação dos enxertos ósseos foi utilizado anti-TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato, marcador de osteoclastos, diluição 1:200). As especificações e os protocolos utilizados para os anticorpos estudados estão descritos a seguir no Quadro.

Quadro - Especificações e protocolo de padronização dos anticorpos utilizados

Anticorpos	Especificações	Clone/ Código catálogo	Fornecedor	Recuperação antigênica	Diluição/ tempo	Anticorpo secundário	DAB
Anti-OCN	Policlonal de coelho anti-OCN humana, de rato e camundongo	AB10911	Millipore, Massachusetts, EUA	Tampão pH6 Banho-maria	1:200 60 min	HRP-DAB	5 min
Anti-OPN	Monoclonal de camundongo Anti-OPN humana, de rato e camundongo	AKm2A1 sc21742	Santa Cruz Biotechnology, Inc	Tampão pH6 Banho-maria	1:100 60 min	HRP-DAB	5 min
Anti-COL I	Monoclonal de camundongo Anti-COL I humano, de rato, coelho, vaca, porco e veado	COL-I ab90395	Abcam, Massachusetts, EUA	Tampão pH6 Banho-maria	1:100 60 min	HRP-DAB	5 min
Anti-TRAP	Monoclonal de coelho Anti-TRAP humana, de rato e camundongo	EPR15556 ab191406	Abcam, Massachusetts, EUA	Tampão pH6 Banho-maria	1:200 60 min	HRP-DAB	5 min

Legenda: Osteocalcina (OCN); Osteopontina (OPN); Colágeno tipo I (COL I); Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Fonte: A autora, 2022.

Para a realização das reações imuno-histoquímicas, os cortes foram inicialmente desparafinizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool absoluto, 90°, 70° e submetidos à recuperação antigênica utilizando solução tamponada de citrato de sódio 10 mM pH 6.0, em banho maria a 90°C, por 20 minutos. A inativação da peroxidase endógena foi realizada por meio da imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 10 minutos e foi seguida da incubação dos cortes com os anticorpos primários em câmara úmida, em temperatura ambiente, por 60 minutos. Controles negativos (omissão dos anticorpos primários) foram incluídos em todas as reações, segundo as orientações dos fabricantes. Após a incubação com os anticorpos primários, os cortes foram incubados com os anticorpos secundários de um sistema imunoenzimático de detecção de antígenos livre de biotina (Reveal Polyvalent HRP-DAB detection system, SPD-125, Spring Biosciences, California, Estados Unidos). As reações foram visualizadas com auxílio do cromógeno diaminobenzidina (Reveal Polyvalent HRP-DAB detection system, SPD-125, Spring Biosciences, California, Estados Unidos), contracoloração com hematoxilina e montagem das lamínulas com entellan.

Todas as lâminas derivadas das reações imuno-histoquímicas foram avaliadas sob microscopia de campo claro. Imagens de 10 campos de visão de cada lâmina (cobrindo a área enxertada inteira) foram capturadas com uma ampliação de 40x e analisadas no Software ImageJ. Para quantificar a área, em pixel, positiva para os anticorpos anti-OCN, anti-OPN e anti-COL I foi determinado no software um intervalo de intensidade de coloração considerado positivo. Abaixo desse intervalo de cor, foi considerado negativo. Para o anticorpo anti-TRAP, a quantificação de positividade foi feita pela contagem do número de células positivas. A área positiva ou o número de células positivas foram calculados dentro de cada campo e o cálculo da média dos 10 campos foi feita para a amostra correspondente. A contagem média de células/área para cada grupo foi comparada entre grupos.

3.9 Análise estatística

Os resultados foram divididos em: análise descritiva, comparação entre o grupo teste e o grupo controle em cada intervalo de tempo e ANOVA de dois fatores.

As análises dos dados foram realizadas no programa IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 23, 2015. O nível de significância utilizado em todo estudo foi de 5% ($p < 0,05$).

Foi realizado o teste t de Student de amostras independentes para verificar a diferença nas variáveis estudadas entre os dois tipos de enxerto (acelular e celularizado) em 2 intervalos de tempo (4 semanas e 8 semanas). Por meio do teste de Kolmogorov Smirnov foi verificada a não rejeição da pressuposição de normalidade da distribuição, por isso foi empregado um teste paramétrico.

Foi utilizada a ANOVA de dois fatores para avaliar o efeito do tipo de enxerto e o efeito do tempo, além da interação entre ambos, em todas as variáveis estudadas. Para verificar os pressupostos da análise, foi avaliada a distribuição dos erros padronizados pelos testes de normalidade de Kolmogorov Smirnov (com correção de Lilliefors) e de Shapiro-Wilk, além da avaliação do Gráfico Q-Q Normal. Após a análise de resíduos, não houve rejeição significativa da pressuposição de normalidade da distribuição dos dados por nenhuma variável do estudo, validando o teste paramétrico empregado.

4 RESULTADOS

Todos os animais suportaram bem os procedimentos cirúrgicos e o pós-operatório transcorreu sem maiores complicações. Sinais de infecções que comprometessem as análises histológicas, imuno-histoquímicas e tomográficas estavam ausentes.

4.1 Avaliação da Microtomografia Computadorizada

4.1.1 Análise descritiva

As variáveis quantitativas analisadas por micro-TC foram apresentadas por meio das medidas descritivas média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e amplitude interquartil por tipo de enxerto (Tabela 1) e por intervalo de tempo (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise descritiva das variáveis quantitativas tomográficas por tipo de enxerto

	Volume (mm ³)		DMO (mg/cm ³)		BV/TV (%)	
	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado
n	10	10	10	10	10	10
Média	23,80	41,78	0,64	0,63	49,14	41,71
Mediana	21,26	41,51	0,65	0,62	47,21	41,84
Desvio padrão	12,55	8,34	0,08	0,04	16,32	6,39
Mínimo	8,37	27,39	0,55	0,58	25,31	32,34
Máximo	39,85	53,31	0,77	0,72	77,50	50,09
Intervalo interquartil	23,28	13,19	0,14	0,07	24,57	12,90

Legenda: Número de animais na amostra (n); densidade mineral óssea (DMO); fração volume ósseo/volume total (BV/TV).

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 2 - Análise descritiva das variáveis quantitativas tomográficas por intervalo de tempo

	Volume (mm ³)		DMO (mg/cm ³)		BV/TV (%)	
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas
n	10	10	10	10	10	10
Média	0,64	0,63	49,14	41,71	0,64	0,63
Mediana	0,65	0,62	47,21	41,84	0,65	0,62
Desvio padrão	0,08	0,04	16,32	6,39	0,08	0,04
Mínimo	0,55	0,58	25,31	32,34	0,55	0,58
Máximo	0,77	0,72	77,50	50,09	0,77	0,72
Intervalo interquartil	0,14	0,07	24,57	12,90	0,14	0,07

Legenda: Número de animais na amostra (n); densidade mineral óssea (DMO); fração volume ósseo/volume total (BV/TV).

Fonte: A autora, 2022.

4.1.2 Ganho de volume ósseo

Em relação ao ganho de volume ósseo, quando comparados os dois grupos (celularizado e não-celularizado), em cada intervalo de tempo, observou-se que, com 4 semanas, a média do ganho de volume ósseo no grupo celularizado ($34,97 \pm 4,97 \text{ mm}^3$) foi significativamente maior ($p < 0,001$) que a média do grupo não-celularizado ($12,43 \pm 2,53 \text{ mm}^3$). Com 8 semanas, também houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,002$) entre as médias do grupo celularizado ($48,59 \pm 3,99 \text{ mm}^3$) e não-celularizado ($35,18 \pm 4,98 \text{ mm}^3$), o que pode ser observado nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 7.

Tabela 3 - Comparação de médias das variáveis tomográficas entre os enxertos não-celularizado e celularizado no intervalo de tempo '4 semanas'

	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Volume (mm^3)	12,43	2,53	34,97	4,97	<0,001
DMO (mg/cm^3)	0,71	0,04	0,62	0,06	0,032
BV/TV (%)	63,22	8,55	46,25	4,36	0,004

Legenda: densidade mineral óssea (DMO); fração volume ósseo/volume total (BV/TV).

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 4 - Comparação de médias das variáveis tomográficas entre os enxertos não-celularizado e celularizado no intervalo de tempo '8 semanas'

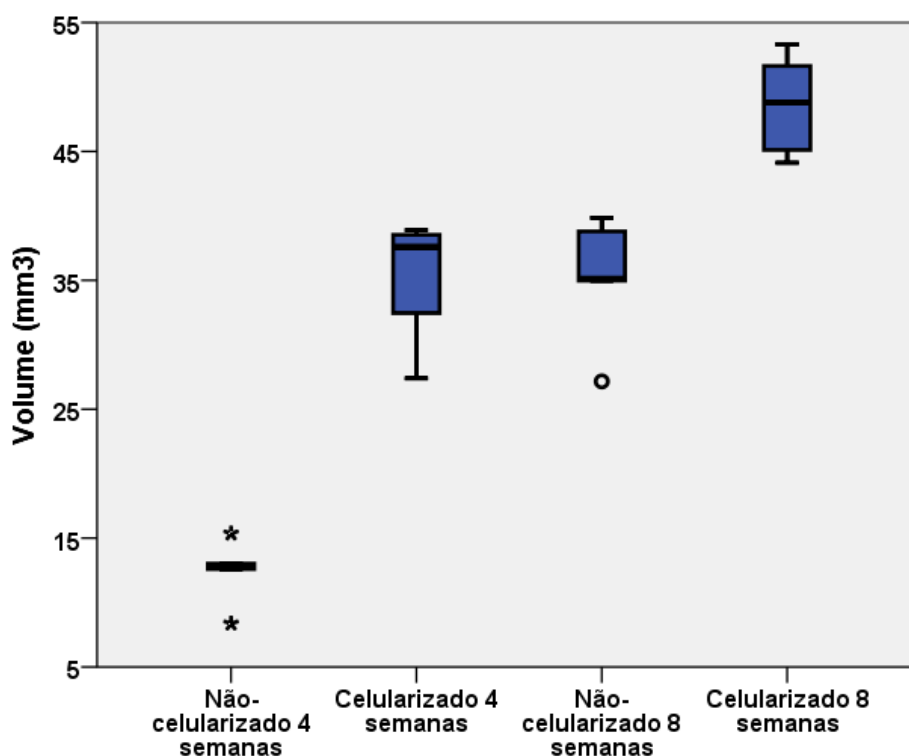
	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Volume (mm^3)	35,18	4,98	48,59	3,99	0,002
DMO (mg/cm^3)	0,58	0,04	0,63	0,03	0,025
BV/TV (%)	35,06	5,51	37,17	4,63	0,530

Legenda: densidade mineral óssea (DMO); fração volume ósseo/volume total (BV/TV).

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 7 - Associação entre o ganho de volume ósseo (mm^3) e o tipo de enxerto, em cada intervalo de tempo



Fonte: A autora, 2022.

A ANOVA de dois fatores indicou que o tempo, o tipo de enxerto e a interação entre ambos foram significativamente associados ao ganho de volume ósseo. Enxertos celularizados ($41,78 \pm 8,34 \text{ mm}^3$) apresentaram volumes significativamente maiores ($p < 0,001$) que os enxertos não-celularizados ($23,80 \pm 12,55 \text{ mm}^3$), assim como os enxertos com 8 semanas ($41,88 \pm 8,25 \text{ mm}^3$) apresentaram volumes maiores ($p < 0,001$) que os de 4 semanas ($23,70 \pm 12,45 \text{ mm}^3$). A interação entre ambos também foi significativa ($p = 0,028$). O valor do R^2 ajustado foi 0,907, ou seja, 90,7% da variável resposta volume é explicado pelos fatores avaliados (tipo de enxerto e tempo), conforme os dados apresentados nas Tabelas 1, 2 e 5.

Tabela 5 - Análise de variância para a variável resposta volume ósseo

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	3373434,000	3	1124,478	62,666	<0,001
Intercepto	21506,961	1	21506,961	1198,556	<0,001
Intervalo de tempo	1653,107	1	1653,107	92,126	<0,001
Enxerto	1616,222	1	1616,222	90,070	<0,001
Intervalo de tempo * Enxerto	104,105	1	104,105	5,802	0,028
Erro	287,105	16	17,944		
Total	25167,501	20			
Total corrigido	3660,539	19			

Legenda: Graus de liberdade (gl); teste F (F).

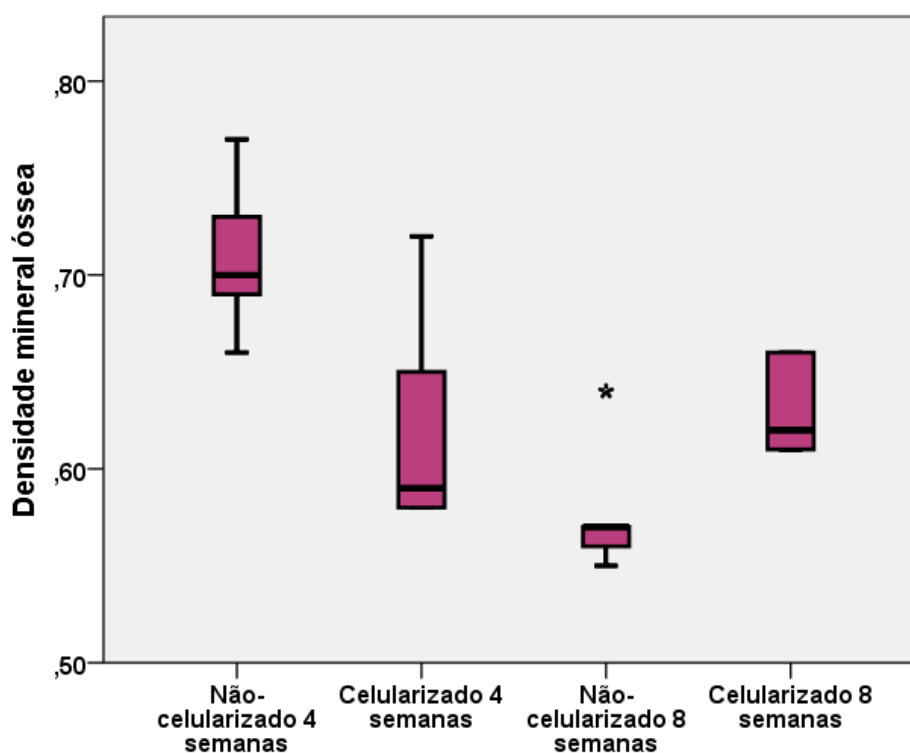
Nota:* Análise de variância de dois fatores; R quadrado= 0,922 (R quadrado ajustado= 0,907).

Fonte: A autora, 2022.

4.1.3 Densidade mineral óssea (mg/cm³)

Com relação à DMO com 4 semanas, o grupo não-celularizado (média= 0,71 ± 0,04 mg/cm³) apresentou valores significativamente maiores (p=0,032) que o grupo celularizado (média= 0,62 ± 0,06 mg/cm³). Já com 8 semanas, o grupo celularizado (média: 0,63 ± 0,03 mg/cm³) apresentou valores significativamente maiores (p=0,025) que o grupo não-celularizado (média: 0,58 ± 0,04 mg/cm³), conforme Tabelas 3 e 4 e Figura 8.

Figura 8 - Associação entre a densidade mineral óssea (mg/cm^3) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Fonte: A autora, 2022.

De acordo com os resultados da ANOVA de dois fatores, mostrados na Tabela 6, o tempo foi significativamente associado à DMO. Enxertos com tempo de 4 semanas ($0,67 \pm 0,07\text{mg}/\text{cm}^3$) apresentaram DMO significativamente maior ($p=0,005$) que os enxertos de 8 semanas ($0,61 \pm 0,04\text{mg}/\text{cm}^3$). A interação entre o tempo e o tipo de enxerto também foi significativa ($p=0,002$), o que significa que o efeito do tempo deve ser avaliado em conjunto com o tipo de enxerto. O valor do R^2 ajustado foi 0,603, ou seja, 60,3% da variável resposta DMO é explicado pelos fatores avaliados (tempo e associação entre tempo e tipo de enxerto).

Tabela 6 - Análise de variância para a variável resposta densidade mineral óssea

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	0,045	3	0,015	8,086	0,002
Intercepto	8,090	1	8,090	4361,143	<0,001
Intervalo de tempo	0,019	1	0,019	10,361	0,005
Enxerto	0,001	1	0,001	0,690	0,418
Intervalo de tempo * Enxerto	0,024	1	0,024	13,208	0,002
Erro	0,030	16	0,002		
Total	8,165	20			
Total corrigido	0,075	19			

Legenda: Graus de liberdade (gl); teste F (F).

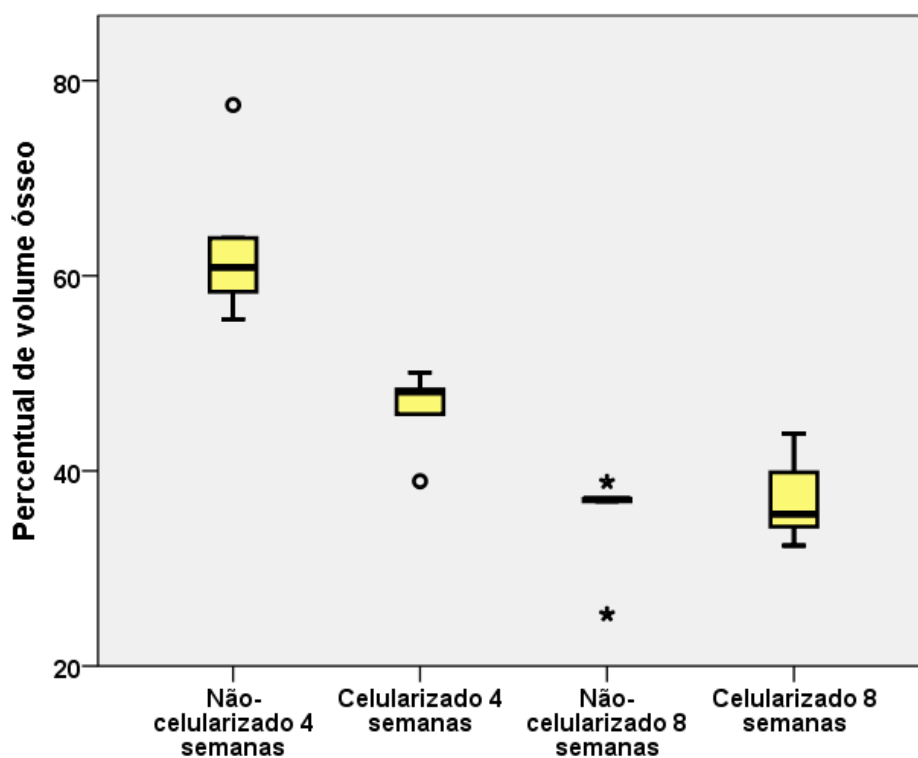
Nota: * Análise de variância de dois fatores; R quadrado= 0,603 (R quadrado ajustado= 0,528).

Fonte: A autora, 2022.

4.1.4 Fração de volume ósseo (BV/TV)

Com 4 semanas, a média do grupo não-celularizado foi de $63,22 \pm 8,55$ % e a média do grupo celularizado foi $46,25 \pm 4,36$ %. O teste-t para duas amostras independentes indicou valores significativamente maiores ($p=0,004$) para o grupo não-celularizado. Entretanto, com 8 semanas, os grupos celularizados e não-celularizados não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) (Tabelas 3 e 4 e Figura 9).

Figura 9 - Associação entre BV/TV (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Fonte: A autora, 2022.

Baseado na Tabela 7, pôde-se observar que o tempo ($p < 0,001$), o tipo de enxerto ($p = 0,014$) e a interação entre eles ($p = 0,003$) foram significativamente associados a BV/TV. Enxertos 4 semanas ($54,74 \pm 11,00\%$) apresentaram maior BV/TV que os com 8 semanas ($36,11 \pm 4,92\%$), assim como os enxertos não-celularizados ($49,14 \pm 16,32\%$) apresentaram BV/TV significativamente maior que os enxertos celularizados ($41,71 \pm 6,39\%$). O valor do R^2 ajustado foi 0,775, ou seja, 77,5% da variável resposta BV/TV é explicado pelos fatores avaliados (tempo e tipo de enxerto).

Tabela 7 - Análise de variância para a variável resposta BV/TV

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p</i> valor*
Modelo corrigido	2465392,000	3	821,797	22,845	<0,001
Intercepto	41268,613	1	41268,613	1147,209	<0,001
Intervalo de tempo	1734,267	1	1734,267	48,210	<0,001
Enxerto	275,876	1	275,876	7,669	0,014
Intervalo de tempo * Enxerto	455,249	1	455,249	12,655	0,003
Erro	575,569	16	35,973		
Total	44309,573	20			
Total corrigido	3040,960	19			

Legenda: fração volume ósseo/volume total (BV/TV); Graus de liberdade (gl); teste F (F).

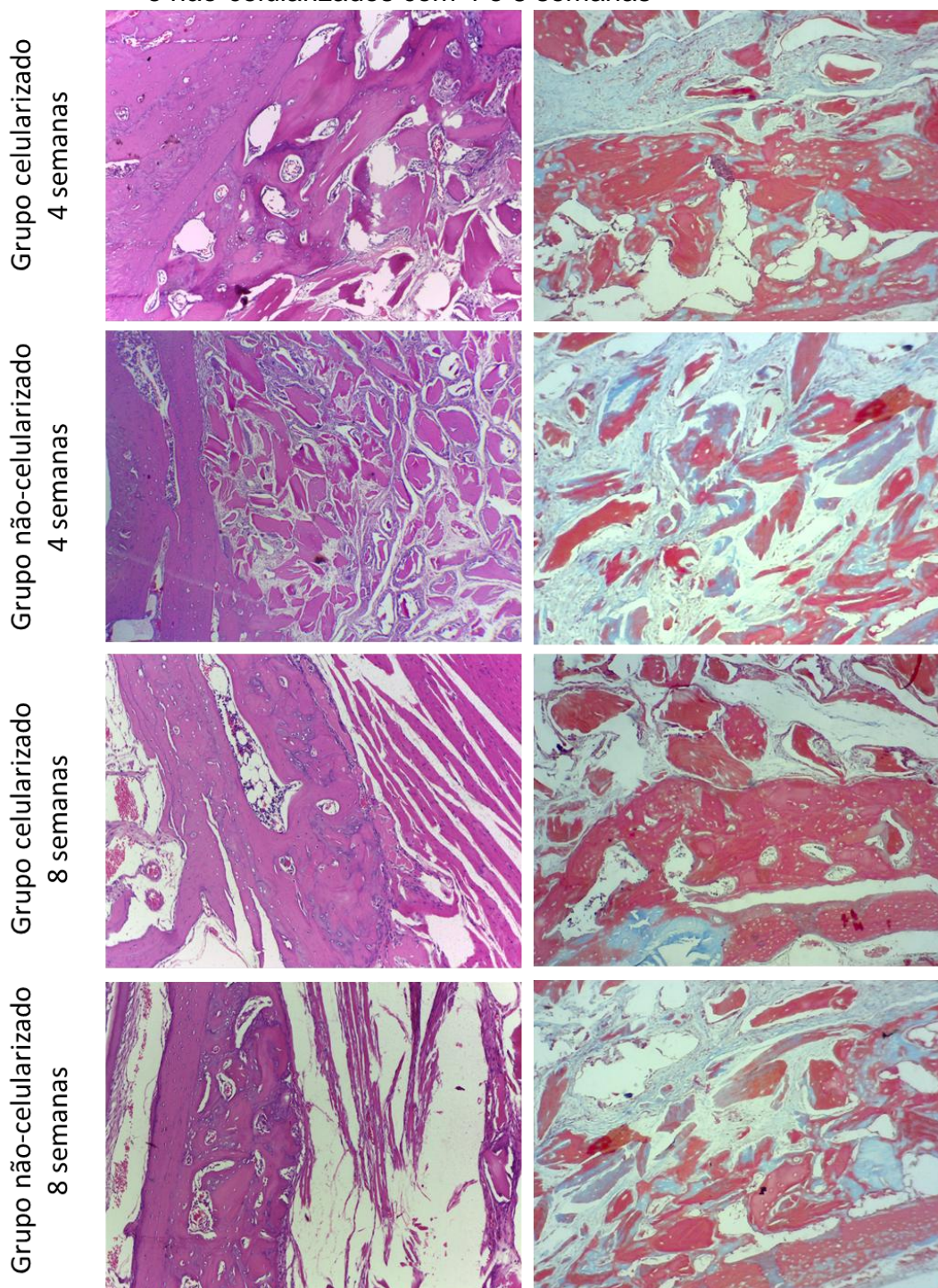
Nota: * Análise de variância de dois fatores; R quadrado= 0,811 (R quadrado ajustado= 0,775).

Fonte: A autora, 2022.

4.2 Avaliação Histológica

A análise histológica demonstrou maior remodelação óssea e formação de osso novo no grupo celularizado. Osteoclastos foram observados perto da interface entre o osso hospedeiro e o enxerto, bem como ao redor dos *chips* ósseos do enxerto e osteoblastos foram evidentes revestindo as bordas dos enxertos. Com 4 semanas, a deposição de matriz óssea e células semelhantes a fibroblastos são observadas em torno dos *chips* ósseos do grupo celularizado, enquanto as partículas do enxerto permanecem em grande parte não incorporados no grupo não-celularizado e em menor quantidade no grupo celularizado. No grupo acelular, com 8 semanas, observa-se deposição de tecido ósseo ao redor das partículas do enxerto, que ainda não estão completamente substituídas. Em oposição, osso maduro junto com tecido ósseo neoformado é observado no grupo celularizado com 8 semanas, em que as micropartículas foram quase completamente substituídas. Osteócitos foram observados aprisionados no tecido calcificado predominantemente no grupo com células. A incorporação do material e o osso hospedeiro consistiram em uma unidade de bloco sólida no grupo celularizado com 8 semanas. Ausência de células inflamatórias e presença de vasos sanguíneos também foram observados (Figura 10).

Figura 10 - Características histológicas dos enxertos ósseos celularizados e não-celularizados com 4 e 8 semanas



Legenda: Coluna da esquerda: coloração por Hematoxilina e Eosina; coluna da direita: coloração de Tricrômio de Masson. Com 4 semanas, a deposição de matriz óssea e células semelhantes a fibroblastos são observadas em torno dos *chips* ósseos no grupo celularizado, enquanto as partículas do enxerto permanecem em grande parte não incorporados no grupo não-celularizado. Com 8 semanas, observa-se osso maduro junto com osso neoformado no grupo celularizado, com os *chips* ósseos quase completamente substituídos. No grupo controle, observa-se deposição de tecido ósseo ao redor das partículas do enxerto, que ainda não estão completamente substituídas. Todas: 10x.

Fonte: A autora, 2022.

4.3 Avaliação Histomorfométrica

4.3.1 Análise descritiva

As variáveis quantitativas histomorfométricas foram apresentadas por meio das medidas descritivas média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e amplitude interquartil por tipo de enxerto (Tabela 8) e intervalo de tempo (Tabela 9).

Tabela 8 - Análise descritiva das variáveis quantitativas histomorfométricas por tipo de enxerto

	Osso Neoformado (%)		Partículas remanescentes (%)		Tecido Calcificado (%)	
	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado
n	10	10	10	10	10	10
Média	13,49	45,44	34,24	24,98	48,43	50,52
Mediana	11,88	46,28	35,36	22,55	44,31	50,54
Desvio padrão	11,67	6,55	17,74	19,41	13,10	5,88
Mínimo	1,82	36,40	8,37	3,22	35,35	37,95
Máximo	34,25	55,00	64,66	59,02	73,38	57,02
Intervalo interquartil	20,52	11,78	30,63	34,52	22,39	8,45

Legenda: Número de animais na amostra (n).

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 9 - Análise descritiva das variáveis quantitativas histomorfométricas por intervalo de tempo

	Osso Neoformado (%)		Partículas remanescentes (%)		Tecido Calcificado (%)	
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas
n	10	10	10	10	10	10
Média	23,22	35,70	44,71	14,50	52,07	46,87
Mediana	22,56	35,83	41,55	11,57	51,16	48,05
Desvio padrão	20,70	15,21	10,93	10,61	11,14	8,34
Mínimo	1,82	15,04	30,43	3,22	36,31	35,35
Máximo	50,50	55,00	64,66	37,11	73,38	58,19
Intervalo interquartil	39,31	30,37	16,24	15,43	14,96	17,30

Legenda: Número de animais na amostra (n).

Fonte: A autora, 2022.

4.3.2 Osso neoformado

A porcentagem de osso neoformado dentro da área enxertada foi significativamente maior no grupo celularizado que no grupo não-celularizado com 4 semanas ($42,48 \pm 5,38\%$ vs $3,96 \pm 2,83\%$, respectivamente; $p < 0,001$) e com 8 semanas ($48,40 \pm 6,75\%$ vs $23,01 \pm 8,48\%$, respectivamente; $p = 0,001$), conforme podemos observar nas Tabelas 10 e 11 e Figura 11.

Tabela 10 - Comparação de médias das variáveis histomorfométricas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '4 semanas'

	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Osso neoformado (%)	3,96	2,83	42,48	5,38	<0,001
Partículas remanescentes (%)	47,54	11,67	41,88	10,61	0,445
Tecido calcificado (%)	52,91	15,90	51,22	4,96	0,826

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

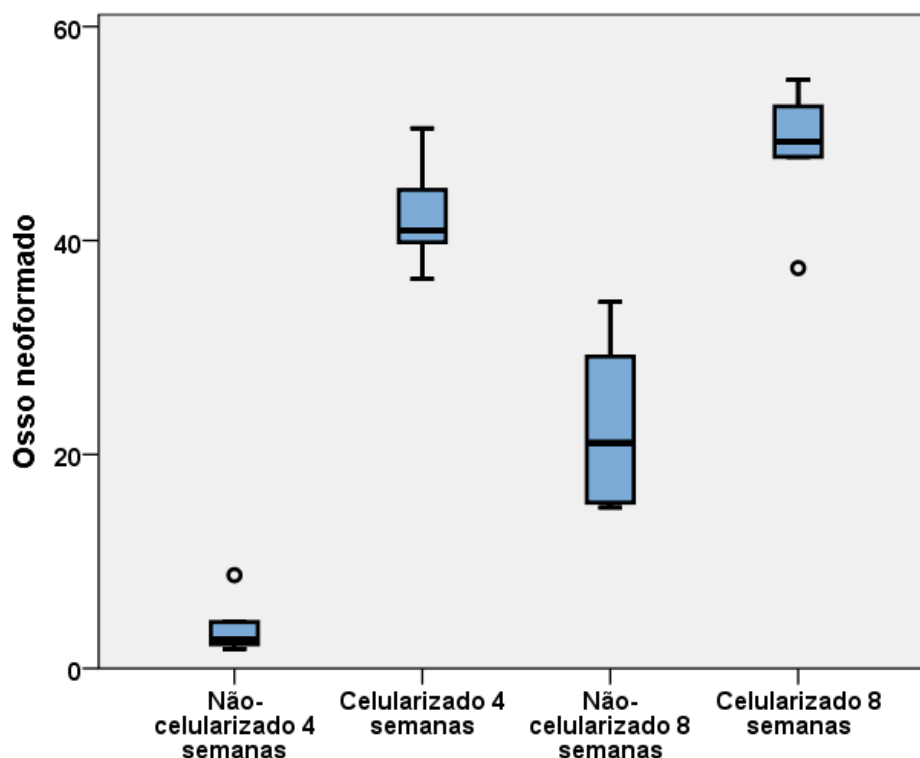
Tabela 11 - Comparação de médias das variáveis histomorfométricas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '8 semanas'

	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Osso neoformado (%)	23,01	8,48	48,40	6,75	0,001
Partículas remanescentes (%)	20,93	11,37	8,07	4,55	0,047
Tecido calcificado (%)	43,94	9,10	49,81	7,21	0,291

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 11 - Associação entre osso neoformado (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Fonte: A autora, 2022.

Pôde-se observar através do teste ANOVA (Tabela 12) que o tempo ($p < 0,001$), o tipo de enxerto ($p < 0,001$), assim como a interação entre eles ($p = 0,031$) foram significativamente associados ao osso neoformado. Enxertos com 8 semanas ($35,70 \pm 15,21\%$) apresentaram maior porcentagem de osso neoformado que os com 4 semanas ($23,22 \pm 20,70\%$). E enxertos celularizados ($45,44 \pm 6,55\%$) apresentaram porcentagem de osso neoformado significativamente maior que os enxertos não-celularizados ($13,49 \pm 11,67\%$). O valor do R^2 ajustado foi 0,891, ou seja, 89,1% da variável resposta osso novo é explicado pelos fatores avaliados (tipo de enxerto e tempo).

Tabela 12 - Análise de variância para a variável resposta osso neoformado

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	p valor*
Modelo corrigido	6099,895	3	2033,298	52,668	<0,001
Intercepto	17361,780	1	17361,780	449,716	<0,001
Intervalo de tempo	779,014	1	779,014	20,179	<0,001
Enxerto	5105,706	1	5105,706	132,251	<0,001
Intervalo de tempo * Enxerto	215,175	1	215,175	5,574	0,031
Erro	617,697	16	38,606		
Total	24079,371	20			
Total corrigido	6717,592	19			

Legenda: Graus de liberdade (gl); teste F (F).

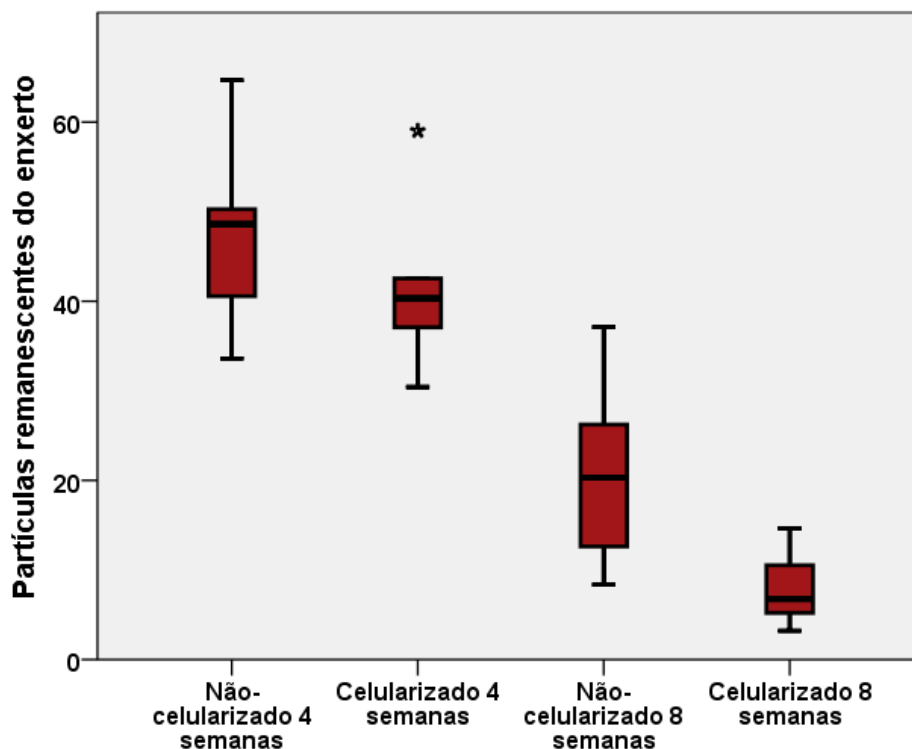
Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,908 (R quadrado ajustado= 0,891).

Fonte: A autora, 2022.

4.3.3 Partículas remanescentes do enxerto

Em relação à percentagem de partículas remanescentes do enxerto, não houve diferença estatística entre os grupos celularizado e não-celularizado com 4 semanas ($41,88 \pm 10,61\%$ vs $47,54 \pm 11,67$, respectivamente; $p=0,445$). Já com 8 semanas, o grupo celularizado apresentou uma percentagem de remanescentes do enxerto significativamente menor que o grupo não-celularizado ($8,07 \pm 4,55\%$ vs $20,93 \pm 11,37\%$, respectivamente; $p= 0,047$) (Tabelas 10 e 11 e Figura 12).

Figura 12 - Associação entre as partículas remanescentes de enxerto (%) e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Fonte: A autora, 2022.

Observou-se na Tabela 13 que apenas o tempo ($p < 0,001$) foi significativamente associado à fração de partículas remanescentes do enxerto. Enxertos com 4 semanas ($44,71 \pm 10,93\%$) apresentaram uma porcentagem significativamente maior que os enxertos com 8 semanas ($14,50 \pm 10,61\%$). O valor do R^2 ajustado foi 0,715, ou seja, 71,5% da variável resposta remanescentes de enxerto é explicado pelo tempo após a enxertia.

Tabela 13 - Análise de variância para a variável resposta partículas remanescentes

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	5056,484	3	1685,495	16,906	<0,001
Intercepto	17531,548	1	17531,548	175,851	<0,001
Intervalo de tempo	4563,190	1	4563,190	45,771	<0,001
Enxerto	428,562	1	428,562	4,299	0,055
Intervalo de tempo * Enxerto	64,732	1	64,732	0,649	0,432
Erro	1595,129	16	99,696		
Total	24183,162	20			
Total corrigido	6651,613	19			

Legenda: Graus de liberdade (gl); teste F (F).

Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,760 (R quadrado ajustado= 0,715).

Fonte: A autora, 2022.

4.3.4 Tecido calcificado

Observa-se na Tabelas 10, 11 e 14 que não houve diferença estatística entre os grupos celularizado e não-celularizado em cada intervalo, assim como nenhuma variável (tempo, tipo de enxerto e a interação entre eles) foi significativamente associada à porcentagem de tecido calcificado.

Tabela 14 - Análise de variância para a variável resposta tecido calcificado

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	228322,000	3	76,107	0,738	0,544
Intercepto	48945,618	1	48945,618	474,911	<0,001
Intervalo de tempo	134,888	1	134,888	1,309	0,269
Enxerto	21,841	1	21,841	0,212	0,651
Intervalo de tempo * Enxerto	71,593	1	71,593	0,695	0,417
Erro	1649,002	16	103,063		
Total	50822,942	20			
Total corrigido	1877,324	19			

Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,122 (R quadrado ajustado= -0,043).

Fonte: A autora, 2022.

4.4 Avaliação imuno-histoquímica

4.4.1 Análise descritiva

As variáveis quantitativas imuno-histoquímicas foram apresentadas por meio das medidas descritivas média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo e amplitude interquartil por tipo de enxerto (Tabela 15) e por intervalo de tempo (Tabela 16).

Tabela 15 - Análise descritiva das variáveis quantitativas imuno-histoquímicas por tipo de enxerto

	OCN		COL I		OPN		TRAP	
	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado	Enxerto não-celularizado	Enxerto celularizado
n	10	10	10	10	10	10	10	10
Média	151,59	230,49	252,09	319,20	150,86	251,73	1,06	1,99
Mediana	151,03	234,59	276,75	325,49	163,19	250,06	0,90	2,08
Desvio padrão	29,23	56,34	67,07	34,40	33,70	42,64	0,38	0,50
Mínimo	86,29	126,95	133,35	265,69	107,79	195,91	0,60	1,10
Máximo	190,56	302,72	315,73	375,25	201,16	304,23	1,90	2,68
Intervalo interquartil	25,09	81,93	106,54	48,92	62,51	89,79	0,53	0,77

Legenda: Osteocalcina (OCN); Colágeno tipo I (COL I); Osteopontina (OPN); Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 16 - Análise descritiva das variáveis quantitativas imuno-histoquímicas por intervalo de tempo

	OCN		COL I		OPN		TRAP	
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas
n	10	10	10	10	10	10	10	10
Média	165,14	216,95	263,64	307,66	170,08	232,52	1,51	1,54
Mediana	148,83	209,87	267,38	311,35	180,80	228,83	1,35	1,51
Desvio padrão	54,72	54,78	81,99	19,65	52,74	60,49	0,56	0,75
Mínimo	86,29	150,96	133,35	275,09	107,79	161,04	0,80	0,60
Máximo	278,30	302,72	375,25	330,51	243,63	304,23	2,28	2,68
Intervalo interquartil	78,17	108,67	139,97	33,69	96,74	119,33	1,08	1,28

Legenda: Osteocalcina (OCN); Colágeno tipo I (COL I); Osteopontina (OPN); Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Fonte: A autora, 2022.

4.4.2 OCN

A imunomarcção para o anticorpo anti-OCN foi significativamente maior ($p < 0,001$) no grupo celularizado ($263,78 \pm 30,28$) do que no grupo não-celularizado ($170,12 \pm 18,82$) apenas com 8 semanas (Tabela 17 e 18 e Figura 13).

Tabela 17 - Comparação de médias das variáveis imuno-histoquímicas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '4 semanas'

	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
OCN	133,06	26,65	197,21	58,78	0,057
COL I	208,29	70,71	318,98	49,68	0,021
OPN	124,39	23,49	215,77	22,10	<0,001
TRAP	1,10	0,25	1,92	0,47	0,009

Legenda: Osteocalcina (OCN); Colágeno tipo I (COL 1); Osteopontina (OPN); Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Tabela 18 - Comparação de médias das variáveis imuno-histoquímicas entre os enxertos não-celularizados e celularizados no intervalo de tempo '8 semanas'

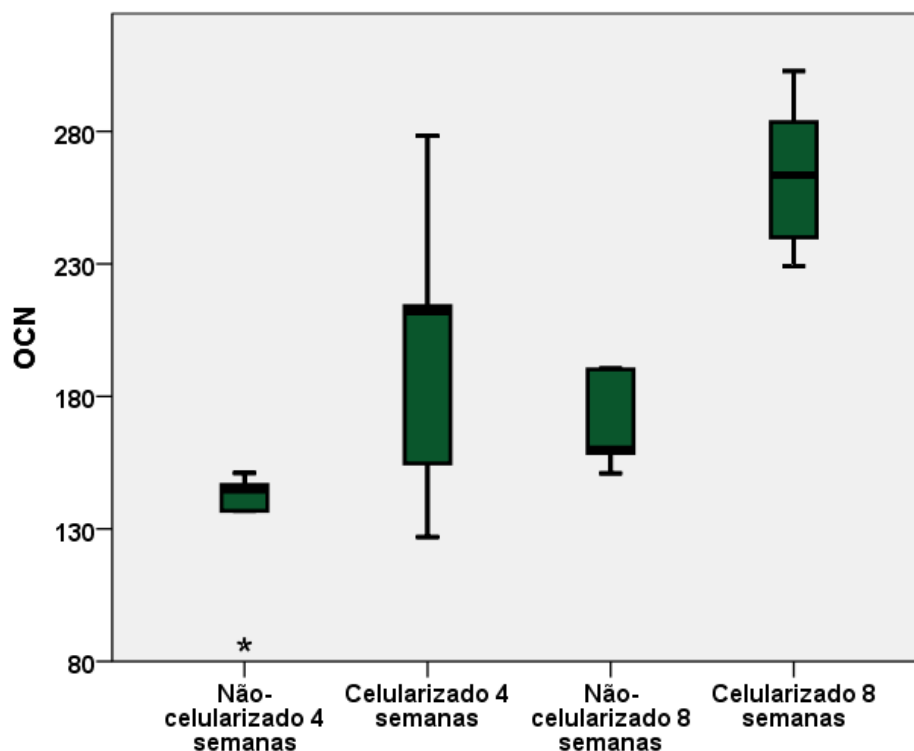
	Enxerto não-celularizado		Enxerto celularizado		<i>p valor*</i>
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
OCN	170,12	18,82	263,78	30,28	<0,001
COL I	295,88	18,09	319,43	13,96	0,050
OPN	177,34	15,86	287,70	19,22	<0,001
TRAP	1,02	0,51	2,06	0,57	0,016

Legenda: Osteocalcina (OCN); Colágeno tipo I (COL 1); Osteopontina (OPN); Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Nota: * Teste t de amostras independentes.

Fonte: A autora, 2022.

Figura 13 - Associação entre OCN e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Legenda: Osteocalcina (OCN).

Fonte: A autora, 2022.

Observou-se na Tabela 19 que o tempo e o tipo de enxerto foram significativamente associados à expressão da proteína OCN. Enxertos com 8 ($216,95 \pm 54,78$) semanas apresentaram expressão de OCN significativamente maior ($p= 0,006$) do que aqueles com 4 semanas ($165,14 \pm 54,72$). Em relação ao tipo de enxerto, enxertos celularizados ($230,49 \pm 56,34$) apresentaram imunoexpressão de OCN significativamente maior ($p<0,001$) que os enxertos não-celularizados ($151,59 \pm 29,23$). O valor do R^2 ajustado foi 0,617, ou seja, 61,7% da variável resposta OCN é explicado pelos fatores avaliados (tipo de enxerto e intervalo de tempo).

Tabela 19 - Análise de variância para a variável resposta OCN

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	45638324,000	3	15212,775	11,193	<0,001
Intercepto	729952,378	1	729952,378	537,071	<0,001
Intervalo de tempo	13422,935	1	13422,935	9,876	0,006
Enxerto	31126,839	1	31126,839	22,902	<0,001
Intervalo de tempo * Enxerto	1088,550	1	1088,550	0,801	0,384
Erro	21746,166	16	1359,135		
Total	797336,868	20			
Total corrigido	67384,490	19			

Legenda: Osteocalcina (OCN); Graus de liberdade (gl); teste F (F).

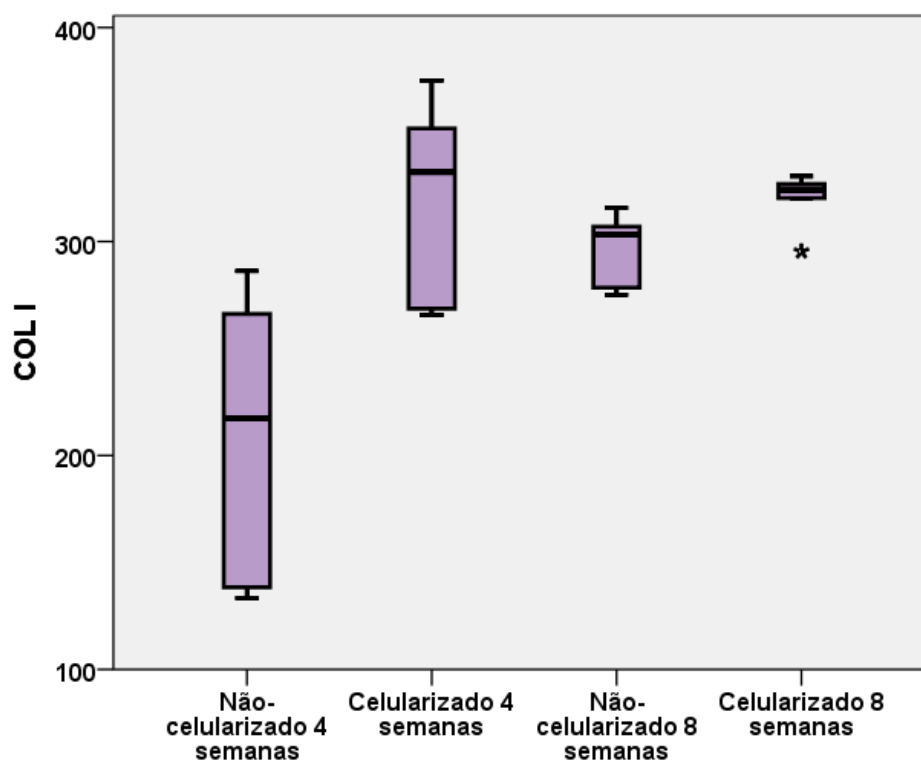
Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,677 (R quadrado ajustado= 0,617).

Fonte: A autora, 2022.

4.4.3 COL I

A imunomarcção para anti-COL I foi significativamente maior no grupo celularizado do que no grupo não-celularizado com 4 semanas ($318,98 \pm 49,68$ vs $208,29 \pm 70,71$, respectivamente; $p=0,021$) e com 8 semanas ($319,43 \pm 13,96$ vs $295,88 \pm 18,09$, respectivamente; $p= 0,050$) (Tabelas 17 e 18 e Figura 14).

Figura 14 - Associação entre COL I e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Legenda: Colágeno tipo I (COL 1).

Fonte: A autora, 2022.

Pôde-se observar na Tabela 20 que o intervalo de tempo (0,043), o tipo de enxerto (0,004), assim como a interação entre eles (0,045) foram significativamente associados à expressão de COL I. Enxertos com 8 ($307,66 \pm 19,65$) semanas apresentaram expressão de COL I significativamente maior do que aqueles com 4 semanas ($263,64 \pm 81,99$). Em relação ao tipo de enxerto, enxertos celularizados ($319,20 \pm 34,40$) apresentaram imunoexpressão de COL I significativamente maior ($p < 0,001$) que os enxertos não-celularizados ($252,09 \pm 67,07$). O valor do R^2 ajustado foi 0,485, ou seja, 48,5% da variável resposta COL I é explicado pelos fatores avaliados (tipo de enxerto e intervalo de tempo).

Tabela 20 - Análise de variância para a variável resposta COL I

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p valor*</i>
Modelo corrigido	41705732,000	3	13901,911	6,960	0,003
Intercepto	1631867,033	1	1631867,033	817,018	<0,001
Intervalo de tempo	9689,242	1	9689,242	4,851	0,043
Enxerto	22523,458	1	22523,458	11,277	0,004
Intervalo de tempo * Enxerto	9493,032	1	9493,032	4,753	0,045
Erro	31957,532	16	1997,346		
Total	1705530,298	20			
Total corrigido	73663,264	19			

Legenda: Colágeno tipo I (COL 1); Graus de liberdade (gl); teste F (F).

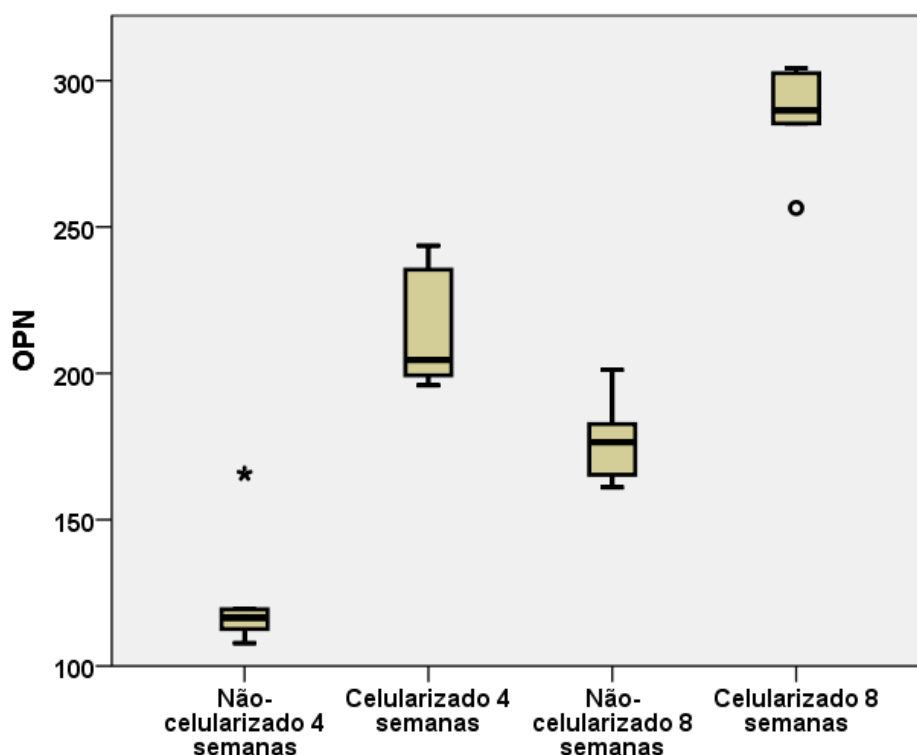
Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,566 (R quadrado ajustado= 0,485).

Fonte: A autora, 2022.

4.4.4 OPN

A imunomarcção para anti-OPN foi significativamente maior no grupo celularizado do que no grupo não-celularizado com 4 semanas ($315,77 \pm 22,10$ vs $124,39 \pm 23,49$, respectivamente; $p < 0,001$) e com 8 semanas ($287,70 \pm 19,22$ vs $177,34 \pm 15,86$, respectivamente; $p < 0,001$) (Tabelas 17 e 18 e Figura 15).

Figura 15 - Associação entre OPN e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Legenda: Osteopontina (OPN).
Fonte: A autora, 2022.

Observou-se que o intervalo de tempo ($p < 0,001$) e o tipo de enxerto ($p < 0,001$) foram significativamente associados à expressão de OPN (Tabela 21). Enxertos com 8 semanas ($232,52 \pm 60,49$) apresentaram expressão de OPN significativamente maior do que aqueles com 4 semanas ($170,08 \pm 42,74$). Em relação ao tipo de enxerto, enxertos celularizados ($251,73 \pm 42,64$) apresentaram imunoexpressão de OPN significativamente maior ($p < 0,001$) que os enxertos não-celularizados ($150,86 \pm 33,70$). O valor do R^2 ajustado foi 0,898, ou seja, 89,8% da variável resposta OPN é explicado pelos fatores avaliados (tipo de enxerto e tempo).

Tabela 21 - Análise de variância para a variável resposta OPN

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p</i> valor*
Modelo corrigido	70817853,000	3	23605,951	56,824	<0,001
Intercepto	810417,696	1	810417,696	1950,843	<0,001
Intervalo de tempo	19493,768	1	19493,768	46,926	<0,001
Enxerto	50873,785	1	50873,785	122,464	<0,001
Intervalo de tempo * Enxerto	450,301	1	450,301	1,084	0,313
Erro	6646,707	16	415,419		
Total	887882,256	20			
Total corrigido	77464,560	19			

Legenda: Osteopontina (OPN); Graus de liberdade (gl); teste F (F).

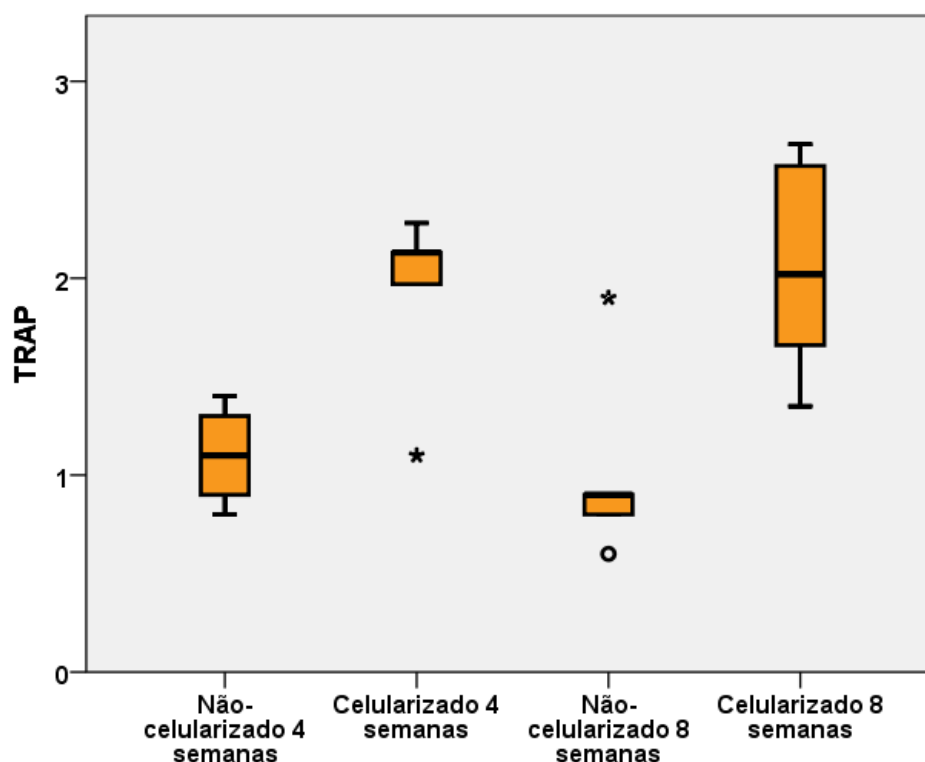
Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,914 (R quadrado ajustado= 0,898).

Fonte: A autora, 2022.

4.4.5 TRAP

A imunomarcção do anticorpo anti-TRAP foi significativamente maior no grupo celularizado, em ambos os intervalos de tempo. Com 4 semanas, o valor médio de positividade para o anticorpo anti-TRAP no grupo celularizado ($1,92 \pm 0,47$) foi significativamente maior ($p=0,009$) que no grupo não-celularizado ($1,10 \pm 0,25$). Assim como com 8 semanas, a média de positividade para o grupo celularizado ($2,06 \pm 0,57$) foi significativamente maior ($p= 0,016$) do que no grupo não-celularizado ($1,02 \pm 0,51$) (Tabelas 17 e 18 e Figura 16).

Figura 16 - Associação entre TRAP e o tipo de enxerto em cada intervalo de tempo



Legenda: Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Fonte: A autora, 2022.

Quando realizado o teste ANOVA de dois fatores, foi verificado que apenas o tipo de enxerto ($p < 0,001$) foi significativamente associado à imunoposição de TRAP. Enxertos celularizados ($1,99 \pm 0,50$) apresentaram positividade para o anticorpo anti-TRAP significativamente maior que os enxertos não-celularizados ($1,06 \pm 0,38$). O valor do R^2 ajustado foi 0,473, ou seja, 47,3% da variável resposta TRAP é explicado pelo tipo de enxerto (Tabela 22).

Tabela 22 - Análise de variância para a variável resposta TRAP

	Soma de quadrados tipo III	gl	Quadrado médio	F	<i>p</i> valor*
Modelo corrigido	4376,000	3	1,459	6,686	0,004
Intercepto	46,482	1	46,482	213,049	<0,001
Intervalo de tempo	0,004	1	0,004	0,017	0,899
Enxerto	4,315	1	4,315	19,779	<0,001
Intervalo de tempo * Enxerto	0,057	1	0,057	0,262	0,615
Erro	3,491	16	0,218		
Total	54,349	20			
Total corrigido	7,867	19			

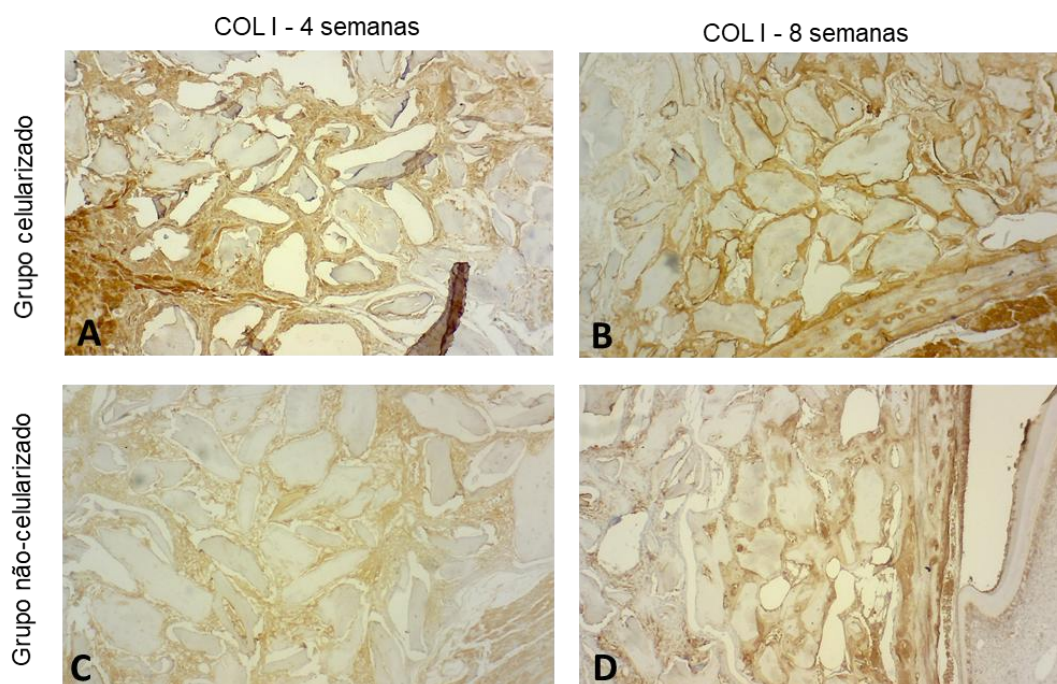
Legenda: Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP); Graus de liberdade (gl); teste F (F).

Nota: * Análise de variância de dois fatores. R quadrado= 0,556 (R quadrado ajustado= 0,473).

Fonte: A autora, 2022.

As Figuras 17, 18, 19 e 20 mostram exemplos da expressão imuno-histoquímica de COL-1, OCN, OPN e TRAP nos grupos celularizado e não-celularizado, com 4 e 8 semanas.

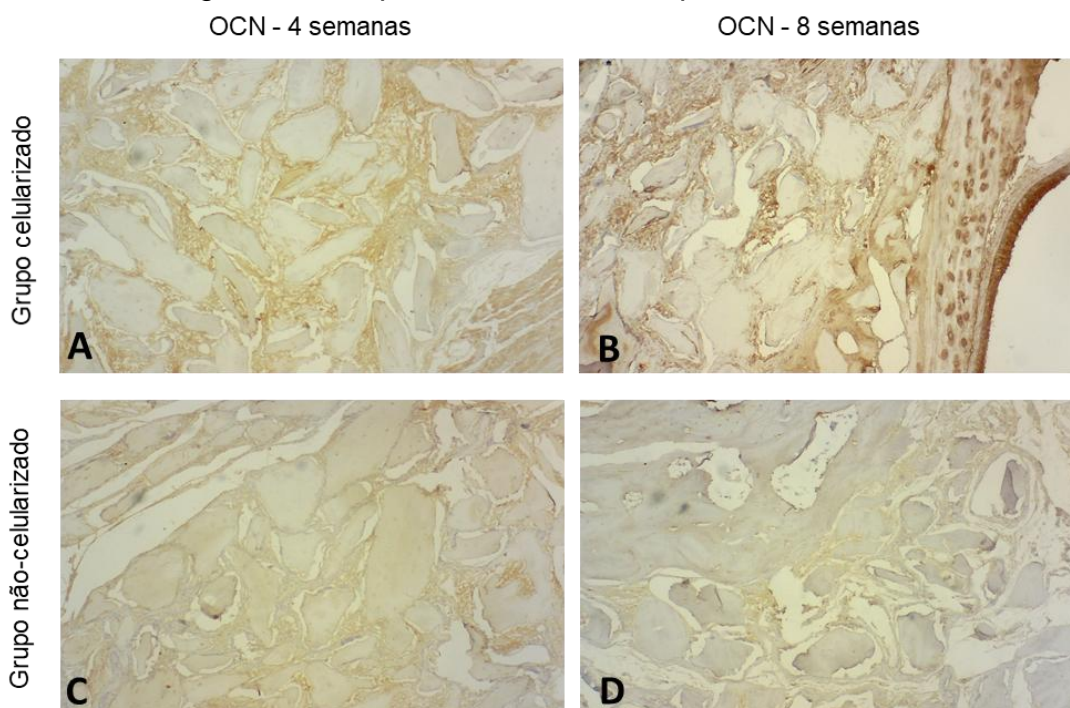
Figura 17 – Expressão imuno-histoquímica de COL-1



Legenda: Colágeno tipo I (COL 1). Observa-se maior intensidade de marcação positiva no grupo celularizado (A e B) que no grupo não-celularizado (C e D). Todos: 10x.

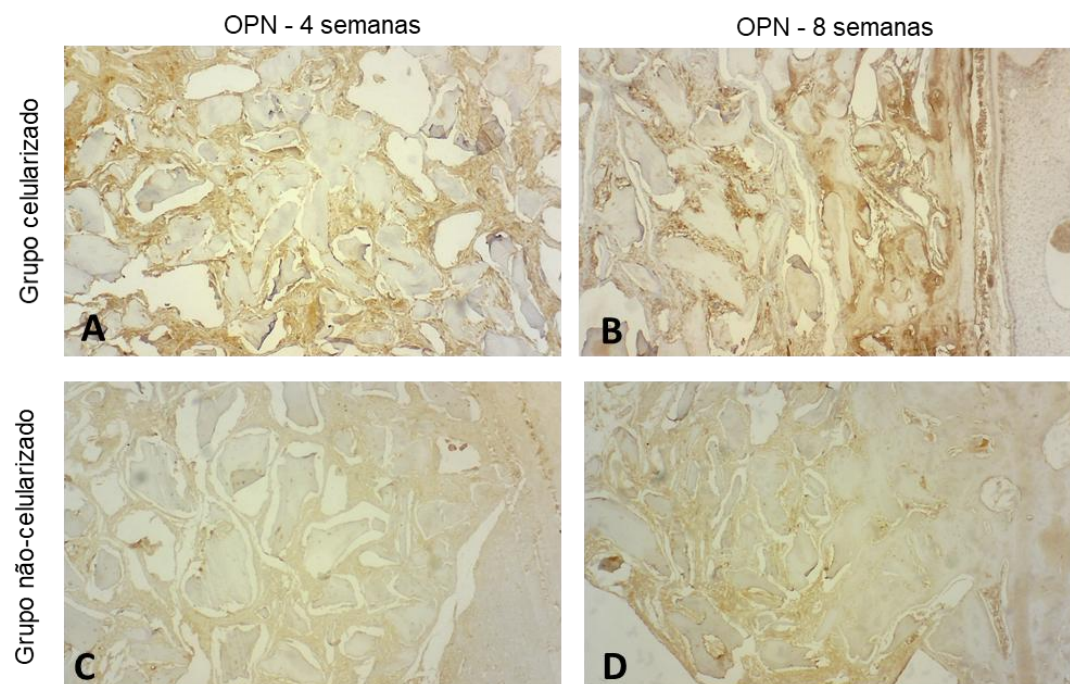
Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

Figura 18 – Expressão imuno-histoquímica de OCN



Legenda: Osteocalcina (OCN). Observa-se maior intensidade de marcação positiva no grupo celularizado (A e B) do que no grupo não-celularizado (C e D). Todos: 10x.
Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

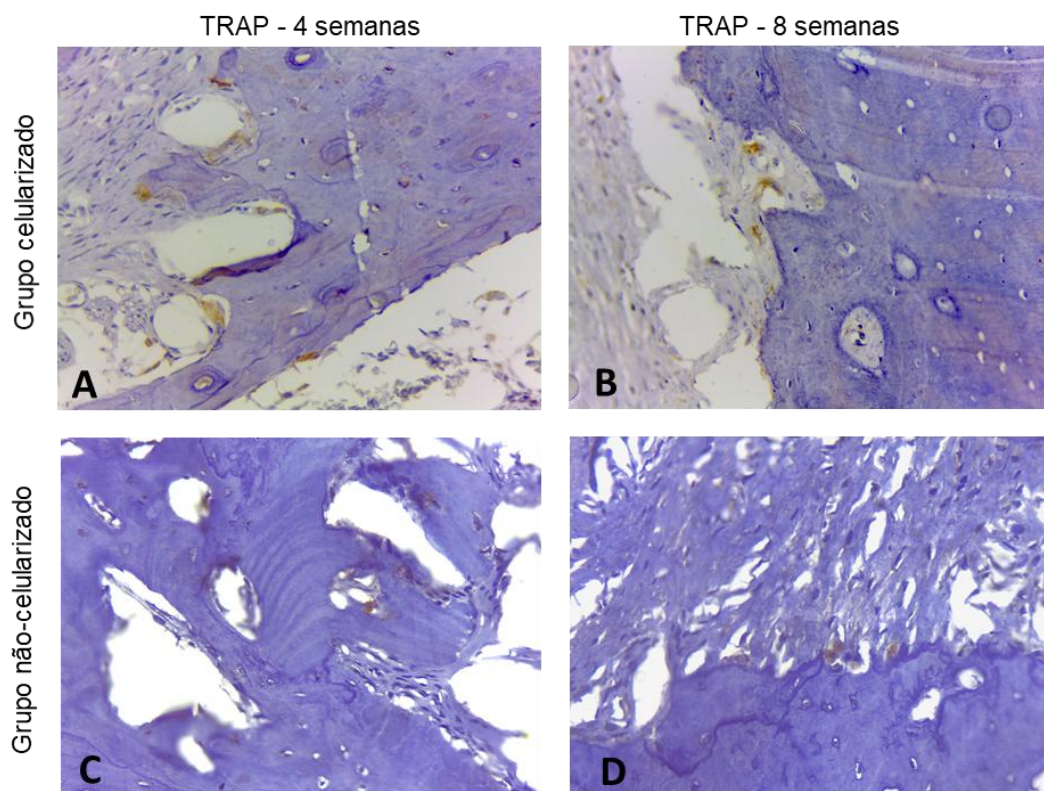
Figura 19 – Expressão imuno-histoquímica de OPN



Legenda: Osteopontina (OPN). Observa-se maior intensidade de marcação positiva no grupo celularizado (A e B) do que no grupo não-celularizado (C e D). Todos: 10x.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

Figura 20 – Expressão imuno-histoquímica de TRAP



Legenda: Fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP). Observa-se maior quantidade de marcação positiva no grupo celularizado (A e B) do que no grupo não-celularizado (C e D). Todos: 40x.

Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Daniel Deluiz.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, foi observado por micro-TC que os animais que receberam *chips* ósseos com CTMs apresentaram um aumento no volume ósseo significativamente maior que os animais que receberam enxertos não-celularizados, em ambos os intervalos de tempo. Também foi observado que o conteúdo celular contribuiu para um rápido aumento de volume ósseo, já que com 4 semanas o grupo com células atingiu uma quantidade de volume ósseo que o grupo não-celularizado somente alcançou com 8 semanas. Tal resultado é similar ao encontrado em estudo anterior do nosso grupo (DELUIZ *et al.*, 2019), com maior ganho de volume no grupo de biomaterial celularizado comparado com o grupo de micropartículas ósseas não celularizadas.

Em relação à DMO, definida como a densidade volumétrica da hidroxiapatita de cálcio (CaHa), em unidades de g/cm^3 (KUSTRO *et al.*, 2018), quando avaliados os grupos em cada intervalo de tempo, pôde-se observar uma rápida diminuição da DMO no grupo celularizado com 4 semanas. Como os enxertos ósseos incorporam ao leito hospedeiro por substituição óssea, é esperada, inicialmente, uma reabsorção óssea desses enxertos, seguida de deposição de osteoide e, posteriormente, sua mineralização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Dessa forma, no primeiro intervalo de tempo avaliado (4 semanas), o conteúdo celular pode ter contribuído para um rápido *turnover* ósseo, diminuindo de forma acentuada a sua quantidade de material mineral, pelo aumento da atividade osteoclástica e, conseqüentemente, diminuindo a DMO. Enquanto o grupo acelular, nesse mesmo intervalo de tempo, ainda apresentava uma DMO alta, possivelmente, porque a reabsorção óssea ocorreu de forma mais lenta, apresentando, como observado por histomorfometria, grande quantidade de remanescentes do enxerto, portanto mais minerais. Por outro lado, somente com 8 semanas o grupo sem células apresentou uma acentuada diminuição da DMO e o grupo celularizado, por sua vez, manteve-se com a mesma densidade de 4 semanas, provavelmente porque nesse momento já estava ocorrendo mineralização da sua matriz extracelular. Esses achados divergiram do estudo de Chamieh *et al.* (2016), que encontraram maior DMO no grupo celularizado do que no grupo com arcabouço de gel de colágeno acelular, na calvária de ratos.

Quanto à fração de volume ósseo, definida como a razão entre o volume ósseo e o volume tecidual total (BV/TV) (BOUXSEIN *et al.*, 2010), a maioria dos estudos que compararam diferentes tipos de arcabouços ósseos semeados com células-tronco mesenquimais de diferentes origens, encontraram a relação BV/TV maior no grupo celularizado do que no grupo controle (CHAMIEH *et al.*, 2016; SHIU *et al.*, 2021). Por outro lado, os dados do presente estudo mostraram que com 4 semanas o grupo não-celularizado apresentou BV/TV significativamente maior que o grupo celularizado e não houve diferença estatística entre os grupos com 8 semanas. Nossa hipótese é de que, devido ao intenso processo de *turnover* ósseo no grupo com células, tenha ocorrido uma rápida reabsorção dos *chips* ósseos, além de deposição de matriz óssea, ainda não calcificada neste momento e, conseqüentemente, diminuição do BV. E talvez, a principal vantagem do conteúdo celular seria acelerar o processo de substituição, mas com o passar do tempo, não haveria diferença entre os dois grupos.

É importante ressaltar que a avaliação por micro-TC foi realizada em conjunto com a histologia e histomorfometria, para que os resultados pudessem ser interpretados corretamente. Desse modo, ao observarmos maior DMO e BV/TV no grupo não-celularizado e correlacionarmos com os dados histológicos, verificamos que tal aumento mineral tratava-se de alta quantidade de remanescentes do enxerto, nesse primeiro intervalo de tempo avaliado. Além disso, cabe lembrar que os resultados dos diferentes estudos podem não ser totalmente comparáveis com os nossos em virtude das diferenças metodológicas, uma vez que a maioria dos estudos que analisam regeneração óssea em animais, o fazem em um defeito crítico na calvária, tíbia ou rádio (CHAMIEH *et al.*, 2016; KANG *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2021; SHIU *et al.*, 2021), onde é criada uma cavidade óssea e o enxerto é inserido e comparado com um defeito vazio, sem enxerto. No nosso trabalho, assim como em outros estudos (DONOS; KOSTOPOULOS; KARRING, 2002; LUIZE *et al.*, 2008; ZENG *et al.*, 2016), o enxerto foi colocado sobre a superfície lateral do ramo mandibular (onlay), e não dentro de uma cavidade (inlay). Além disso, nosso grupo controle foi osso humano não celularizado, que apresenta vascularização e neoformação óssea similares aos encontrados em osso enxertado com material autógeno (ACOCELLA *et al.*, 2012; CONTAR *et al.*, 2009; DELUIZ *et al.*, 2017; ORSINI *et al.*, 2011).

Em relação à percentagem de osso neoformado, analisada por meio de histomorfometria, o grupo celularizado apresentou valores mais elevados, em ambos os intervalos de tempo, condizentes com os nossos resultados da micro-TC. No estudo prévio de Deluiz *et al.* (2019), com 4 semanas, a percentagem de osso neoformado no grupo celularizado foi maior que o não-celularizado, porém com 8 semanas não houve diferença estatística. Dessa forma, os *chips* ósseos humanos com células viáveis, usados neste trabalho, parecem apresentar resultados superiores ao Viagraft® com 8 semanas. Chamieh *et al.* (2016) também revelaram que a percentagem de osso neoformado foi significativamente maior nos dias 14, 21, 28 e 35 pós-enxertia ao usar arcabouços semeados com CTMs da polpa dentária de ratos em comparação com arcabouços acelulares e com defeitos vazios (sem enxertos). Entretanto, os autores não avaliaram com mais de 35 dias. Wofford *et al.* (2020) também encontraram, com 4 semanas, maior formação óssea nos defeitos maxilares de ratos tratados com Gelfoam® e CTMs humanas do tecido adiposo, comparado ao grupo tratado apenas com Gelfoam®. Com 12 semanas, não houve diferença estatística, sugerindo uma cicatrização óssea aumentada e precoce na presença de CTMs humanas do tecido adiposo.

Diferente do que foi encontrado no estudo prévio de Deluiz *et al.* (2019), não observamos diferença estatística na percentagem de partículas remanescentes do enxerto, entre os grupos celularizado e não-celularizado com 4 semanas. Neste intervalo de tempo, ambos os grupos apresentaram quantidade de remanescentes do enxerto maior que com 8 semanas, o que é esperado, já que com o passar do tempo as partículas de enxerto vão sendo substituídas por novo osso. Já com 8 semanas, o grupo celularizado apresentou uma percentagem de remanescentes do enxerto significativamente menor que o grupo não-celularizado, sendo a menor dos quatro grupos. Esse resultado contribuiu para a compreensão da comparação dos gráficos de volume, DMO e percentagem de remanescentes ósseos: o grupo celularizado com 8 semanas apesar de ter menos partículas remanescentes, apresentou maior volume ósseo e maior DMO, mostrando que houve maior formação óssea nesse grupo comparado ao acelular com 8 semanas.

O uso de marcadores de remodelação óssea, através da análise imuno-histoquímica, também é um importante método para complementar a análise da micro-TC e da histomorfometria. A técnica de imuno-histoquímica emprega anticorpos para detectar, localizar e quantificar proteínas específicas. Neste estudo

foram utilizados os anticorpos primários anti-OCN, anti-OPN, anti-COL I e anti-TRAP, como meio para compreender os fenômenos envolvidos na reparação óssea (HAWTHORNE *et al.*, 2013; KADIROĞLU *et al.*, 2020).

A matriz extracelular óssea tem dois componentes: uma parte mineral compreendendo hidroxiapatita (70-90%) e uma parte orgânica (10-30%) constituída principalmente de colágeno (aproximadamente 90% da matriz orgânica) e proteínas não-colágenas (~ 10%) (SROGA *et al.*, 2011; VASHISHTH, 2007) sendo todas elas produzidas pelos osteoblastos. Dentro do grupo das proteínas não-colágenas, a osteocalcina e a osteopontina são as mais abundantes, representando 10-20% dessas proteínas (SROGA *et al.*, 2011). Juntos, o colágeno e as proteínas não-colágenas permitem a deposição de hidroxiapatita (SROGA *et al.*, 2011; VASHISHTH, 2007).

O colágeno tipo I é expresso principalmente pelos osteoblastos e representa um importante componente orgânico da matriz óssea alveolar (HELDER; BRONCKERS; WOLTGENS, 1993), tendo um papel crítico na estrutura e função do tecido ósseo (VASHISHTH, 2007). A expressão de colágeno tipo I pode ser considerada como um marcador da formação óssea precoce (MOEST *et al.*, 2019). No nosso estudo, o índice de positividade do anticorpo anti-COL I foi maior nos enxertos celularizados do que nos enxertos não-celularizados, em ambos os intervalos de tempo. Porém, foi no intervalo de tempo mais curto (4 semanas) que houve a maior diferença, mostrando que a presença de células nos enxertos contribuiu para um rápido aumento na deposição de matriz extracelular óssea. Esse achado é compatível com os achados de Chamieh *et al.* (2016), que utilizaram a técnica de hibridização *in situ*, usando sonda específica para Col1a1, e verificaram forte expressão de colágeno em arcabouços semeados com CTMs da polpa dentária de ratos, enquanto apenas sinais fracos associados a Col1a1 foram observados em arcabouços acelulares. Ao avaliarem as lâminas coradas por *Sirius red*, que marca as fibras de colágeno, esta foi muito mais intensa em arcabouços semeados quando comparado com o grupo acelular, indicando que mais colágeno foi secretado no grupo com CTMs.

A osteocalcina (OCN) é considerada como uma das proteínas não-colágenas mais abundantes, já que é depositada em quantidades significativas na matriz óssea. É predominantemente sintetizada e secretada por osteoblastos maduros, condrócitos hipertrofiados e odontoblastos, possui afinidade pelo cálcio, e tem papel

importante na neoformação e mineralização óssea (DUCY *et al.*, 1996; GARNERO; DELMAS, 1998). O papel exato desta proteína na remodelação óssea não foi completamente elucidado, apesar de sua estrutura indicar interação com cálcio e com cristais de hidroxapatita. No entanto, mostra-se como uma via importante de ativação da formação óssea, devido ao seu efeito sobre os osteoblastos. O aparecimento e aumento de produção da osteocalcina são coincidentes com o início do processo de mineralização (OWEN *et al.*, 1990; STEIN *et al.*, 1990). Em nosso estudo, não houve diferença significativa no índice de positividade desta proteína entre os enxertos celularizados e não-celularizados no intervalo de tempo de 4 semanas. Já com 8 semanas, a imunopositividade para o anticorpo anti-OCN foi maior no grupo celularizado. Este resultado divergiu do que foi encontrado em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa (DELUIZ *et al.*, 2019), que mostrou maior quantidade de células positivas para OCN no grupo celularizado com células MIAMI no intervalo de 4 semanas, e não houve diferença estatística com 8 semanas. Como a expressão de osteocalcina é um marcador de formação óssea tardia, envolvida durante o processo de mineralização (MOEST *et al.*, 2019), esse poderia ser uma explicação para a maior positividade somente com 8 semanas. O mesmo foi observado por Tera *et al.* (2014) num estudo com ratas ovariectomizadas (grupo teste) ou não (grupo controle), que receberam enxerto ósseo autógeno com ou sem membrana. A marcação por OCN não foi observada durante a formação inicial dos cristais, porém pôde ser encontrada nos estágios posteriores da formação óssea, com positividade de osteoblastos e da matriz óssea recém-formada no dia 45 e aos 60 dias, revelando características do osso maduro. De Ponte *et al.* (2016), num estudo em humanos com elevação do seio maxilar, também observaram células imunopositivas para OCN somente após 6 meses de enxertia de osso fresco congelado, porém acelular.

No osso, a OPN é sintetizada e secretada por osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (DENHARDT *et al.*, 2001). É uma proteína de matriz multifuncional que está envolvida na regulação da mineralização fisiológica e patológica. A OPN serve tanto para unir as células ósseas à matriz, quanto para gerar sinais intracelulares essenciais para a motilidade normal dos osteoclastos no osso (MAZZALI *et al.*, 2002). É produzida por células osteoblásticas em diversos estágios, e tem sido sugerido que sua expressão ocorre em dois picos (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000). Logo, essa proteína, em células-tronco da medula óssea, é detectável com níveis de

expressão intermediários nos primeiros estágios de diferenciação durante a proliferação de precursores celulares como os pré-osteoblastos e em níveis elevados em osteoblastos (AUBIN, 1998). Neste estudo, o índice de positividade do anticorpo anti-OPN foi maior nos enxertos celularizados do que nos enxertos não-celularizados, em ambos os intervalos de tempo. Entretanto, os autores não realizaram uma avaliação quantitativa da expressão deste anticorpo. Wofford *et al.* (2020) verificaram, por imuno-histoquímica, expressão notável de OPN em todos os ratos na semana 4, com as amostras tratadas com Gelfoam® + CTMs humanas derivadas do tecido adiposo apresentando uma distribuição morfológica mais organizada dessa proteína em comparação com o padrão caótico nas amostras de Gelfoam® sem células

Como observado, nossa pesquisa apresentou maior expressão de proteínas envolvidas na osteogênese (OCN, OPN e COL I) no grupo celularizado comparado ao grupo não-celularizado, sugerindo que há um aumento do processo de mineralização e formação óssea nos enxertos ósseos com células, corroborando com nosso estudo anterior (DELUIZ *et al.*, 2019).

A fosfatase ácida tartarato-resistente é uma enzima encontrada em células osteoclásticas e eritrócitos, liberada durante a reabsorção, promovendo degradação da matriz orgânica, sendo considerada importante marcador da atividade osteoclástica (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Neste trabalho, o grupo celularizado apresentou maior positividade para TRAP, em ambos os intervalos de tempo, diferentemente do achado anterior de Deluiz *et al.* (2019), no qual houve maior positividade para TRAP no grupo semeado com células somente com 4 semanas. A detecção de osteoclastos positivos para TRAP, que também foram encontrados nas superfícies dos ossos recém-formados, indica um processo precoce de remodelação em curso, maior no grupo com *chips* ósseos celularizados, que neste estudo permaneceu até o intervalo de tempo de 8 semanas.

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (DELUIZ *et al.*, 2019), realizado nos EUA, foi testado um produto comercialmente disponível (Viagraft®), composto por micropartículas ósseas corticais e medulares de doadores humanos e células MIAMI. Entretanto, esse biomaterial ainda não tem liberação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ser comercializado no Brasil. Dessa forma, a fim de buscar uma alternativa para tal produto, no presente estudo utilizamos enxertos ósseos, em forma de *chips*, de doadores humanos, congelados

a -80°C com a adição do agente crioprotetor DMSO, que tem sido vastamente utilizado para criopreservação de células-tronco, devido à sua habilidade de se unir às moléculas de água para evitar a formação de gelo intracelular e, assim, permitir a viabilidade das células (CÓRDOVA-CABALLERO et al., 2002). Assim, o tecido ósseo poderia ser transplantado já com as células-tronco contidas nele, assim como acontece com o transplante de pele e córnea, por exemplo.

A disponibilização de tecidos músculo-esqueléticos no Brasil é feita por bancos de tecidos que possuam licença sanitária e estejam autorizados pela Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes do Ministério da Saúde e pela ANVISA, somente para médicos e cirurgiões-dentistas cadastrados. O banco de tecidos musculoesqueléticos é o estabelecimento que realiza triagem clínica e laboratorial dos doadores, captação, identificação, transporte, processamento, armazenamento, e disponibilização dos enxertos minimizando o risco de contaminação (MARTINS, 2016). Portanto, os enxertos celularizados poderiam ser processados nesses bancos, dentro dos protocolos autorizados para transplantes de tecidos.

Até onde sabemos, esse é o primeiro estudo com enxertos ósseos humanos, captados de banco de tecidos, com a presença de suas células mesenquimais viáveis nativas para aumento mandibular. Entretanto, apresenta algumas limitações metodológicas. Apesar dos ratos terem tolerado muito bem os enxertos e as suas células, sem reação adversa ou imunológica, o material humano foi implantado xenogenicamente em animais, portanto, não utilizamos enxertos alógenos, como sugerimos para serem utilizados na clínica odontológica. Também não avaliamos cronologicamente um mesmo indivíduo, já que usamos animais diferentes para avaliá-los em momentos diferentes (4 e 8 semanas). Assim, não foi possível determinar a evolução dos processos biológicos de osseointegração e remodelação num mesmo indivíduo durante as 8 semanas. Além disso, como não instalamos implantes dentários nesses enxertos, só foram avaliadas as características ósseas, os enxertos em função após o implante instalado não foram avaliados, portanto, não sabemos como se comportariam nessas situações.

Apesar das limitações citadas acima, os resultados desta pesquisa experimental demonstraram que a presença de CTMs em enxertos ósseos humanos apresenta propriedades osteogênicas positivas, maior formação óssea, maior taxa de remodelação óssea e uma melhor incorporação em ratos. Estudos futuros com

animais maiores, e com posterior instalação de implantes dentários, e estudos clínicos em humanos são necessários para avaliar a viabilidade desses enxertos celularizados e o sucesso da reabilitação com os implantes dentários.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados observados, foi possível concluir que:

- a) Os enxertos ósseos humanos celularizados apresentam alto potencial osteogênico, revelado pela maior formação óssea e maior ganho de volume ósseo, e processo acelerado de incorporação e remodelação óssea, demonstrados pela presença de atividade osteoclástica e diminuição da densidade mineral no primeiro intervalo de tempo avaliado, sugerindo que conteúdo celular possa ter contribuído para um rápido *turnover* ósseo;
- b) Os enxertos ósseos celularizados apresentam maior ganho de volume ósseo, revelado pelos parâmetros micro-tomográficos, além de menor densidade mineral no primeiro tempo avaliado, sugerindo rápida reabsorção dos *chips* ósseos com deposição de matriz ainda não calcificada neste momento, e um aumento dessa densidade com o passar do tempo para 8 semanas, momento com maior mineralização óssea;
- c) O processo de substituição dos enxertos ósseos por novo osso é mais eficiente no grupo celularizado, demonstrado, histomorfometricamente, pela maior porcentagem de neoformação óssea e, no segundo intervalo de tempo avaliado, menor porcentagem de partículas remanescentes do enxerto;
- d) Os enxertos ósseos celularizados apresentam maior taxa de formação e remodelação óssea, revelada através da maior expressão imuno-histoquímica de marcadores osteoblásticos, como colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina, e de TRAP, marcador de osteoclastos.

REFERÊNCIAS

ACOCELLA, A. *et al.* Clinical, histological and histomorphometric evaluation of the healing of mandibular ramus bone block grafts for alveolar ridge augmentation before implant placement. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, [s.l.], v. 38, n. 3, p. 222-230, 2010.

ACOCELLA, A. *et al.* Maxillary alveolar ridge reconstruction with monocortical fresh-frozen bone blocks: a clinical, histological and histomorphometric study. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, [s.l.], v. 40, n. 6, p. 525-533, Sept. 2012.

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, [s.l.], v. 105, n. 4, p.1815-1822, Feb. 2005.

AICHELMANN-REIDY, M. E.; YUKNA, R. A. Bone replacement grafts. The bone substitutes. **Dent. clin. North Am.**, Philadelphia, v. 42, n. 3, p. 491–503, 1998.

AL-MORAISSEI, E. A. *et al.* 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**, Lombard, v. 35, n. 1, p. 79–90, 2020.

ALOY-PRÓSPER, A. *et al.* The outcome of intraoral onlay block bone grafts on alveolar ridge augmentations: a systematic review. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Valencia, v. 20, n. 2, p. e251-e258, Mar. 2015.

AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. Tissue Banking of Bone Allografts Used in Periodontal Regeneration. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 72, p. 834-838, 2001.doi.org/10.1902/jop.2001.72.6.834.

ANITUA, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 14, n. 4, p. 529–535, 1999.

ANITUA, E. *et al.* Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. **BioDrugs**, Auckland, v. 27, n. 2, p. 97–111, 2013.

ANKRUM, J. A.; ONG, J. F.; KARP, J. M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. **Nat. Biotechnol.**, New York, v. 32, n. 3, p. 252-260, Mar. 2014.

ARRINGTON, E. D. *et al.* Complications of iliac crest bone graft harvesting. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, v. 329, p. 300–309, 1996.

AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v. 76, n. 6, p. 899-910, 1998.

BASCIANO, L. *et al.* Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC Cell Biol.**, London, v. 12, p. 12, 2011.

BASTAMI, F.; KHOJASTEH, A. Use of leukocyte-and platelet-rich fibrin for bone regeneration: a systematic review. **Regen. Reconstruct Rest.**, v. 1, n. 2, p. 47– 68, 2016.

BESSA, P. C.; CASAL, M.; REIS, R. L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, Part I (basic concepts). **J. Tissue Eng. Regen. Med.**, Chichester, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2008.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone graft substitutes. **Hand Clin.**, Philadelphia, v. 28, n. 4, p. 457-468, Nov. 2012.

BOSTROM, M. P. G.; ASNIS, P. Transforming growth factor beta in fracture repair. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 355S, p. S124-S131, 1998.

BOSTROM, M. P. G. *et al.* Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 13, p. 357-367, 1995.

BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.

BRANDI, M. L.; COLLIN-OSDOBY, P. Vascular biology and the skeleton. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 21, n. 2, p. 183–192, 2006.

CANELLAS, J. V. D. S. *et al.* Platelet-rich fibrin in oral surgical procedures: a systematic review and meta-analysis. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 48, n. 3, p. 395-414, Mar. 2019.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.

CAPLAN, A. I.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 11-15, Jul. 2011.

CECCARELLI, G. *et al.* Emerging Perspectives in Scaffold for Tissue Engineering in Oral Surgery. **Stem Cells Int.**, [s.l.], v. 2017, p. 4585401, 2017.

CELESTE, A. J. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [s.l.], v. 87, n. 24, p. 9843–9847, 1990.

CHAMIEH, F. *et al.* Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. **Sci Rep.**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 38814, Dec. 2016.

CHAVDA, S.; LEVIN, L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. **J. Oral Implantol.**, Abingdon, v. 44, n. 1, p. 74-84, Feb. 2018.

CHIAPASCO, M.; CASENTINI, P.; ZANIBONI, M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 24, supl., p. 237–259, 2009.

CHIAPASCO, M.; ZANIBONI, M.; BOISCO, M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 17, supl. 2, p. 136–159, 2006.

CHINNADURAI, R. *et al.* IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN-gamma-licensed human mesenchymal stromal cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 192, n. 4, p. 1491–1501, 2014.

CHIU, C. P. *et al.* Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human bone marrow. **Stem Cells**, Basel, v. 14, n. 2, p. 239-248, 1996.

CHOUKROUN, J. *et al.* A second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 101, p. 299–303, 2006.

CONTAR, C. M. M. *et al.* Maxillary Ridge Augmentation With Fresh-Frozen Bone Allografts. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 67, n. 6, p. 1280-1285, 2009.

COOK, S. D. *et al.* Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in healing large segmental bone defects. **J. Orthop. Trauma**, New York, v. 12, n. 6, p. 407-412, 1998.

CORDARO, L.; AMADE, D. S.; CORDARO, M. Clinical results of alveolar ridge augmentation with mandibular block bone grafts in partially edentulous patients prior to implant placement. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 1, p. 103-111, 2002.

CÓRDOVA-CABALLERO, M. S. *et al.* Transplantes de células progenitoras hematopoyéticas. **Gaceta Méd. México**, Cidade del México, v. 138, n. 1, mar./abr. 2002.

D'IPPOLITO, G. *et al.* Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 34, n. 11, p. 1608-1610, 2006.

D'IPPOLITO, G. *et al.* Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. **J. Cell. Sci.**, London, v. 117, pt 14, p. 2971-2981, Jun. 2004.

DAMSAZ, M. *et al.* Evidence-Based Clinical Efficacy of Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin in Maxillary Sinus Floor Lift, Graft and Surgical Augmentation Procedures. **Front Surg.**, [s.l.], v. 7, 537138, 2020.

DARVEAU, S. C. *et al.* Existing clinical evidence on the use of cellular bone matrix grafts in spinal fusion: updated systematic review of the literature. **Neurosurg. Focus**, Charlottesville, v. 50, n. 6, p. E12, jun. 2021.

DE PONTE, F. S. *et al.* Histochemical and morphological aspects of fresh frozen bone: a preliminary study. **Eur. J. Histochem.**, Pavia, v. 60, n. 4, p. 2642, Dec. 2016.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DEATHERAGE, J. Bone materials available for alveolar grafting. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 347-352, 2010.

DEB, K. D.; SARDA, K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. **J. Transl. Med.**, London, v. 6, p. 7, 2008.

DEL CORSO, M. *et al.* Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: periodontal and dentoalveolar surgery. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, Hilversum, v. 13, n. 7, p. 1207–1230, 2012.

DEL CORSO, M.; ETIENNE, D. Choukroun's platelet-rich fibrin membranes in periodontal surgery: understanding the biomaterial or believing in the magic of growth factors? **J. Periodontol.**, Indianápolis, v. 80, p. 1694–1699, 2009.

DELUIZ, D. *et al.* Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cell-Seeded Bone Biomaterial Directs Fast and Superior Mandibular Bone Augmentation in Rats. **Sci Rep.**, [s.l.], v. 9, n. 1, p. 11806, Aug. 2019.

DELUIZ, D. *et al.* Incorporation and Remodeling of Bone Block Allografts in the Maxillary Reconstruction: A Randomized Clinical Trial. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, Hamilton, v. 19, n. 1, p. 180-194, 2017.

DELUIZ, D. *et al.* Time-dependent changes in fresh-frozen bone block grafts: Tomographic, histologic, and histomorphometric findings. **Clin. implant. dent. relat. res.**, Hamilton, v. 17, n. 2, p. 296-306, 2015.

DENHARDT, D. T. *et al.* Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J. Clin. Investig.**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.1055-1061 2001.

DEUSE, T. *et al.* Immunogenicity and immunomodulatory properties of umbilical cord lining mesenchymal stem cells. **Cell. Transplant.**, Elmsford, v. 20, n. 5, p. 655–667, 2011.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, [s.l.], v. 36, n. 12, p. 1392–1404, 2005.

DOHAN EHRENFEST, D. M. *et al.* Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. **Growth Factors**, Yverdon-Les-Baibs, v. 27, n. 1, p. 63–69, 2009.

DOHAN EHRENFEST, D. M.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends Biotechnol.**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 158–167, 2009.

DONOS, N.; KOSTOPOULOS, L.; KARRING, T. Augmentation of the rat jaw with autogeneic cortico-cancellous bone grafts and guided tissue regeneration. **Clin. Oral Impl. Res.**, [s.l.], v. 13, n. 2, p. 192-202, 2002.

DUCY, P. *et al.* Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. **Nature**, London, v. 382, n. 6590, p. 448-452, Aug. 1996.

DUFRANE, D. Impact of age on human adipose stem cells for bone tissue engineering. **Cell Transplant.**, Elmsford, v. 26, n. 9, p. 1496–1504, 2017.

ERLEBACHER, A. *et al.* Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. **Mol. Biol. Cell**, Bethesda, v. 9, n. 7, p. 1903–1918, 1998.

ESKAN, M. A. *et al.* Platelet-rich plasma-assisted guided bone regeneration for ridge augmentation: a randomized, controlled clinical trial. **J. Periodontol.**, Indianápolis, v. 85, n. 5, p. 661–668, 2014.

ESPOSITO, M.; ARDEBILI, Y.; WORTHINGTON, H. V. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. **Cochrane Database Syst. Rev.**, Oxford, 2014.

ESPOSITO, M. *et al.* The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants - a Cochrane systematic review. **Eur J Oral Implantol.**, Began, v. 2, n. 3, p. 167-184, 2009.

EVANS, C. H. *et al.* Facilitated endogenous repair: Making tissue engineering simple, practical, and economical. **Tissue Engineering**, [s.l.], v. 13, n. 8, p. 1987–1993, 2007.

FARIA, P. E. P. *et al.* Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 19, n. 4, p. 393-401, 2008.

FERNANDES, M. B. *et al.* The effect of bone allografts combined with bone marrow stromal cells on the healing of segmental bone defects in a sheep model. **BMC Vet. Res.**, [s.l.], v. 10, p. 36, Feb. 2014.

FERRAZ, E. P. *et al.* Effect of autogenous and fresh-frozen bone grafts on osteoblast differentiation. **J. Dent.**, Guildford, v. 43, n. 1, p. 110–116, 2015.

FIJANY, A. *et al.* Mesenchymal stem cell dysfunction in diabetes. **Mol. Biol. Rep.**, [s.l.], v. 46, n. 1, p. 1459–1475, 2019.

FLORENCIO-SILVA, R. *et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed. Res. Int.**, [s.l.], v. 2015, 421746, 2015.

FRÉCHETTE, J. P.; MARTINEAU, I.; GAGNON, G. Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 84, n. 5, p. 434-439, 2005.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet.**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. **Endocrinol. Metab. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 27, n. 2, p. 303-323, Jun. 1998.

GEIGER, F. *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165- GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 20, n. 5, p. 2028–2035, 2005.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Angiogenesis and bone growth. **Tr. Cardiovasc. Med.**, [s.l.], v. 10, p. 223–228, 2000.

GLOWACKI, J. A review of osteoinductive testing methods and sterilization processes for demineralized bone. **Cell Tissue Bank**, Sordrecht, v. 6, n. 1, p. 3-12, 2005.

GRAU-MONGE, C. *et al.* Marrow-isolated adult multilineage inducible cells embedded within a biologically-inspired construct promote recovery in a mouse model of peripheral vascular disease. **Biomed. Mater.**, Bristol, v. 12, n. 1, p. 015024, Feb. 2017.

HALM, D. *et al.* Direct comparison of the immunogenicity of major histocompatibility complex-I and -II deficient mesenchymal stem cells in vivo. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 402, n. 6, p. 693-702, 2021.

HÄMMERLE, C. H. F.; JUNG, R. E. Bone augmentation by means of barrier membranes. **Periodontol. 2000**, Copenhagen, v. 33, p. 36–53, 2003.

HAWTHORNE, A. C. *et al.* Immunohistochemical, tomographic, and histological study on onlay bone graft remodeling. Part III: allografts. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 24, n. 10, p. 1164-1172, Oct. 2013.

HELDER, M. N.; BRONCKERS, A. L.; WOLTGENS, J. H. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in

dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. **Matrix**, Stuttgart, v.13, n. 5, p. 415–425, 1993.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Sci.**, Washington, v. 295, n. 5557, p. 1014–1017, 2002.

HIRAO, A.; ARAI, F.; SUDA, T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 3, n. 12, p.1481-1483, 2004.

HOFMANN, A. *et al.* The influence of bone allograft processing on osteoblast attachment and function. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 23, n. 4, p. 846–854, 2005.

HORWITZ, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, London, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HSIONG, S. X.; MOONEY, D. J. Regeneration of vascularized bone. **Periodontol.** **2000**, Copenhagen, v. 41, p. 109–122, 2006.

HUANG, Y. C. *et al.* Combined angiogenic and osteogenic factor delivery enhances bone marrow stromal cell-driven bone regeneration. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 20, n. 5, p. 848–857, 2005.

IKADA, Y. Challenges in tissue engineering. **J. R. Soc. Interface**, [s.l.], v. 3, n. 10, p. 589-601, 2006.

ISHIDOU, Y. *et al.* Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 10, n. 11, p.1651-1659, 1995.

JEMT, T.; LEKHOLM, U. Implant treatment in edentulous maxillae: a 5-year follow-up report on patients with different degrees of jaw resorption. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 10, n. 3, p. 303-311, May/Jun. 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro, 2004.

KADIROĞLU, E. T. *et al.* Calvarial bone defects in ovariectomised rats treated with mesenchymal stem cells and demineralised freeze-dried bone allografts. **Folia Morphol.**, Warsaw, v. 79, n. 4, p. 720-735, 2020.

KAIGLER, D.; CIRELLI, J.; GIANNOBILE, W. Growth factor delivery for oral and periodontal tissue engineering. **Expert Opin. Drug. Deliv.**, [s.l.], v. 3, n. 5, p. 647–662, 2006.

KAIGLER, D. *et al.* VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects, **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 21, n. 2, p. 735–744, 2006.

KANCZLER, J.; OREFFO, R. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. **Eur. Cells Mater.**, Wales, v. 15, p. 100–114, 2008.

KANE, R. J. *et al.* Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. **Acta Biomater.**, Orxford, v. 17, p. 16–25, 2015.

KANG, S. H. *et al.* Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. **Cell Tissue Res.**, Berlin, v. 355, n. 1, p. 81–88, 2014.

KEMPEN, D. H. R. *et al.* Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. **Biomaterials**, Guildford, v. 30, n. 14, p. 2816–2825, 2009.

KHAN, S. N. *et al.* The biology of bone grafting. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, Rosemont, v. 13, n. 1, p. 77–86, 2005.

KIM, S. S. *et al.* Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1399–1409, 2006.

KINGSLEY, D. M. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes Dev.**, New York, v. 8, n. 2, p. 133–146, 1994.

KIRAN, N. K.; MUKUNDA, K. S.; TILAK RAJ, T. N. Platelet concentrates: a promising innovation in dentistry. **J. Dent. Sci. Res.**, [s.l.], v. 2, p. 50–61, 2011.

KLEINHEINZ, J. *et al.* VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 63, n. 9, p. 1310–1316, 2005.

KUSTRO, T. *et al.* Quantification of the mandibular defect healing by micro-CT morphometric analysis in rats. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, [s.l.], v. 46, n. 12, p. 2203–2213, Dec. 2018.

LEACH, J. K. *et al.* Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 17, p. 3249–3255, 2006.

LE BLANC, K. *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp. Hematol.**, Copenhagen, n. 10, p. 890–896, Oct. 2003.

LE BLANC, K. *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. **Leukemia**, New Jersey, v. 21, n. 8, p. 1733–1738, 2007.

LEE, K.; SILVA, E. A.; MOONEY, D. J. Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. **J. Royal Soc. Interface**, [s.l.], v. 8, n. 55, p. 153–170, 2011.

- LEE, S. H.; SHIN, H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Amsterdam, v. 59, n. 4-5, p. 339–359, 2007.
- LEONETTI, J. A.; KOUP, R. Localized Maxillary Ridge Augmentation With a Block Allograft for Dental Implant Placement: Case Reports. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 12, n. 3, p. 217–226, 2003.
- LUIZE, D. S. *et al.* Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 23, n. 2, p. 207-214, 2008.
- LY, H. Telomere dynamics in induced pluripotent stem cells: potentials for human disease modeling. **World J. Stem. Cells**, [s.l.], v. 3, n. 10, p. 89-95, 2011.
- MAGALON, J. *et al.* DEPA classification: a proposal for standardising PRP use and a retrospective application of available devices. **BMJ Open Sport Exerc. Med.**, [s.l.], v. 2, n. 1, p. e000060, 2016.
- MANFRO, R. *et al.* Comparative, histological and histomorphometric analysis of three anorganic bovine xenogenous bone substitutes: bio-oss, bone-fill and gen-ox anorganic. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 13, n. 4, p. 464–470, 2014.
- MARTINS, D. D. **Comportamento dos enxertos alógenos em bloco na reconstrução alveolar maxilar antes e após a instalação de implantes: análise tomográfica, histológica e imunohistoquímica da incorporação e remodelação.** 2016. 56 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- MARX, R. E. *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 85, n. 6, p. 638–646, 1998.
- MARX, R. E. *et al.* Severely resorbed mandible: predictable reconstruction with soft tissue matrix expansion (tent pole) grafts. **J. oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 60, n. 8, p. 878–889, 2002.
- MAZZALI, M. *et al.* Osteopontin – a molecule for all seasons. **QJM**, Oxford, v. 95, n. 1, p. 3-13, 2002.
- MAZZUCCO, L. *et al.* Not every PRP-gel is born equal. Evaluation of growth factor availability for tissues through four PRP-gel preparations: fibrinet, RegenPRP-Kit, Plateltex and one manual procedure. **Vox Sang.**, Basel, v. 97, n. 2, p. 110–118, 2009.
- MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.
- MISCH, C. E.; DIETSH, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.

MISCH, C. M. *et al.* Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, Lombard, v. 7, n. 3, p. 360-366, 1992.

MISCH, C. M. Bone augmentation using allogeneic bone blocks with recombinant bone morphogenetic protein-2. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 26, n. 6, p. 826–831, 2017.

MISCH, C. M. Maxillary Autogenous Bone Grafting. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 23, n. 2, p. 229-238, 2011.

MOEST, T. *et al.* Osseous ingrowth in allogeneic bone blocks applied for vertical bone augmentation: a preclinical randomised controlled study. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v. 24, n. 8, p. 2867-2879, 2019.

MOHAN, S.; BAYLINK, D. J. Bone growth factors. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 263, p. 30-48, 1991.

MONJE, A. *et al.* On the feasibility of utilizing allogeneic bone blocks for atrophic maxillary augmentation. **Biomed. Res. Int.**, [s.l.], v. 2014, p. 814578, 2014.

MOTAMEDIAN, S. R.; KHOJASTE, M.; KHOJASTEH, A. Success rate of implants placed in autogenous bone blocks versus allogenic bone blocks: A systematic literature review. **Ann. Maxillofac. Surg.**, [s.l.], v. 6, n. 1, p. 78-90, Jan./Jun. 2016.

MOURARET, S. *et al.* A pre-clinical murine model of oral implant osseointegration. **Bone**, New York, v. 58, p. 177–184, 2014.

MUNDY, G. R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 323, p. 24-28, 1996.

MURPHY, C. M. *et al.* Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad. **Eur. Cell Mater.** Wales, v. 26, p. 120-132, 2013.

NARDI, N. B.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, In Vitro Expansion and Characterization. In: WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. (ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**. Berlin: Springer, 2008. v. 174.

NAUTA, A. J. *et al.* Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. **Blood**, [s.l.], v. 108, n. 6, p. 2114–2120, 2006.

NKENKE, E. *et al.* Morbidity of harvesting of retromolar bone grafts: a prospective study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 5, p. 514-521, 2002.

ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, Basel, v. 19, n. 3, p. 193-204, 2001.

OH, W. *et al.* Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. **Cell. Immunol.**, New York, v. 251, n. 2, p. 116–123, 2008.

OPPENHEIMER, A. J.; MESA, J.; BUCHMAN, S. R. Current and emerging basic science concepts in bone biology: implications in craniofacial surgery. **J. Craniofac. Surg.**, Boston, v. 23, n. 1, p. 30-36, Jan. 2012.

ORSINI, G. *et al.* Clinical and histologic evaluation of fresh frozen human bone grafts for horizontal reconstruction of maxillary alveolar ridges. **Int. J. Periodontics Restor. Dent.**, Chicago, v. 31, n. 5, p. 535-544. 2011.

ORYAN, A. *et al.* Role of mesenchymal stem cells in bone regenerative medicine: What is the evidence? **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 204, n. 2, p. 59–83, 2017.

OWEN, T. A. *et al.* Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J. Cell Physiol.**, Philadelphia, v. 143, n. 3, p. 420-430, 1990.

PATEL, Z. S. *et al.* Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**, New York, v. 43, n. 5, p. 931–940, 2008.

PELLISSIER, P. *et al.* Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 22, n. 1, p. 73–79, 2004.

PENG, H. *et al.* Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell-expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 110, n. 6, p. 751-759, 2002.

PENG, H. *et al.* VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis, **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 20, n. 5, p. 2017–2027, 2005.

PILIPCHUK, S. P. *et al.* Tissue engineering for bone regeneration and osseointegration in the oral cavity. **Dent. Mater.**, Washington, v. 31, n. 4, p. 317–338, 2015.

PIRES, J. L. S. *et al.* Repair of Critical Size Bone Defects Using Synthetic Hydroxyapatite or Xenograft with or without the Bone Marrow Mononuclear Fraction: A Histomorphometric and Immunohistochemical Study in Rat Calvaria. **Materials**, [s.l.], v. 14, p. 2854, 2021.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Sci.**, Washington, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PITTENGER, M. F.; FLAKE, A. M.; DEANS, R. J. Stem cell culture: mesenchymal stem cells from bone marrow. In: ATALA, A.; LANZA, R. P. (ed.). **Methods of tissue engineering**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 461–469.

POLO-CORRALES, L.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; RAMIREZ-VICK, J. E. Scaffold design for bone regeneration. **J. nanosci. nanotechnol.**, Stevenson Ranch, v. 14, n. 1, p. 15–56, 2014.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Sci.**, Washington, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

RAHNEMAI-AZAR, A. *et al.* Human marrow-isolated adult multilineage-inducible (MIAMI) cells protect against peripheral vascular ischemia in a mouse model. **Cytherapy**, London, v.13, n. 2, p. 179-192, Feb. 2011.

RATAJCZAK, M. Z. *et al.* Bone-marrow-derived stem cells-our key to longevity? **J. Appl. Genet.**, Pozna, v. 48, n. 4, p. 307-319, 2007.

SAADOUN, A. P.; TOUATI, B. Soft tissue recession around implants: is it still unavoidable?-Part II. **Pract. Proced. Aesthet. Dent.**, Mahwah, v. 19, n. 2, p. 81–87, 2007.

SALEM, D. *et al.* Usage of Bone Replacement Grafts in Periodontics and Oral Implantology and Their Current Levels of Clinical Evidence - A Systematic Assessment. **J. Periodontol.**, Indianapolis, v. 87, n. 8, p. 872-879, Aug. 2016.

SCHLIEPHAKE, H. Clinical efficacy of growth factors to enhance tissue repair in oral and maxillofacial reconstruction: a systematic review. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, Hamilton, v. 17, n. 2, p. 247-273, 2015.

SEIFERT, M. *et al.* Detrimental effects of rat mesenchymal stromal cell pre-treatment in a model of acute kidney rejection. **Front. Immunol.**, [s.l.], v. 3, p. 202, 2012.

SHI, M.; LIU, Z. W.; WANG, F. S. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 164, n. 1, p. 1-8, 2011.

SHIU, S.T. *et al.* Effect of Different Bone Grafting Materials and Mesenchymal Stem Cells on Bone Regeneration: A Micro-Computed Tomography and Histomorphometric Study in a Rabbit Calvarial Defect Model. **Int. J. Mol. Sci.**, [s.l.], v. 22, p. 8101, 2021.

SIMION, M. U. *et al.* Treatment of dehiscences and fenestrations around dental implants using resorbable and nonresorbable membranes associated with 108nd autografts: a comparative clinical study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 12, n. 2, p. 159–167, 1997.

SIMONPIERI, A. *et al.* The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: a new grafting protocol. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 18, p. 102–111, 2009.

SINGER, N. G.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. **Annu. Rev. Pathol.**, New York, v. 6, p. 457-478, 2011.

SITTITAVORNWONG, S.; GUTTA, R. Bone graft harvesting from regional sites. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 317-330, 2010.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Boca Raton, v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

SONNLEITNER, D.; HUEMER, P.; SULLIVAN, D. Y. A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques: a technical note. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 15, n. 6, p. 879–882, 2000.

SPIN-NETO, R. *et al.* Clinical similarities and histological diversity comparing fresh frozen onlay bone blocks allografts and autografts in human maxillary reconstruction. **Clin. Implant. Dent. Relat. Res.**, Hamilton, v. 15, n. 4, p. 490-497, 2013.

SPIN-NETO, R. *et al.* Graft incorporation and implant osseointegration following the use of autologous and fresh-frozen allogeneic block bone grafts for lateral ridge augmentation. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 226-233, 2014.

SPRINGER, I. N. G. *et al.* Particulated bone grafts - Effectiveness of bone cell supply. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 205-212, 2004.

SROGA, G. E. *et al.* Biochemical characterization of major bone-matrix proteins using nanoscale-size bone samples and proteomics methodology. **Mol. Cell. Proteomics**, Bethesda, v. 10, n. 9, M110.006718, 2011.

STÄHLI, A.; STRAUSS, F. J.; GRUBER, R. The use of platelet-rich plasma to enhance the outcomes of implant therapy: A systematic review. **Clin. Oral Impl. Res.**, [s.l.], v. 29, suppl. 18, p. 20-36, 2018.

STEIN, G. *et al.* Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, p. 3111–3123, 1990.

STREET, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, [s.l.], v. 99, n. 15, p. 9656–9661, 2002.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, [s.l.], v. 126, n. 4, p. 663-676, Aug. 2006.

TALLY, W. C. *et al.* Transforaminal Lumbar Interbody Fusion With Viable Allograft: 75 Consecutive Cases at 12-Month Follow-up. **Int. J. Spine Surg.**, [s.l.], v.12, n. 1, p. 76-84, Mar. 2018.

TARKKA, T. *et al.* Adenoviral VEGF-A gene transfer induces angiogenesis and promotes bone formation in healing osseous tissues. **J. Gene Med.**, Chichester, v. 5, n. 7, p. 560–566, 2003.

TEE, B. C.; SUN, Z. Mandibular distraction osteogenesis assisted by cell-based tissue engineering: a systematic review. **Orthod. Craniofac. Res.**, Oxford, v. 18, Supl. 1, n. 01, p. 39-49, Apr. 2015.

TERA, T. M. *et al.* Immunolocalization of markers for bone formation during guided bone regeneration in osteopenic rats. **J. Appl. Oral Sci.**, Bauru, v. 22, n. 6, p. 541-553, Nov./Dec. 2014.

TESSIER, P. *et al.* Complications of harvesting autogenous bone grafts: a group experience of 20,000 cases. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 116, suppl. 5, p. 72S-73S, 2005.

THOMSON, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Sci.**, Washington, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TORRES, J. *et al.* Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 37, n. 10, p. 943-951, 2010.

TOZUM, T. F.; DEMIRALP, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 69, n. 10, p. 664-665, 2003.

VASHISHTH, D. The role of the collagen matrix in skeletal fragility. **Curr. Osteoporos. Rep.**, Philadelphia, v. 5, n. 2, p. 62-66, 2007.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks? **Sci.**, Washington, v. 287, n. 5457, p. 1418-1419, 2000.

VON ARX T.; HÄFLIGER, J.; CHAPPUIS, V. Neurosensory disturbances following bone harvesting in the symphysis: a prospective clinical study. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 16, n. 4, p. 432-439, 2005.

WAN, C. D. *et al.* Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. **Hepatobiliary Pancreat Dis. Int.**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 29-33, 2008.

WANG, D. *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. **Cell. Transplant.**, Elmsford, v. 22, n. 12, p. 2267-2277, 2013.

WANG, Y. *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nat. Immunol.**, New York, v. 15, n. 11, p. 1009-1016, 2014.

WANG, Y. *et al.* Synergistic intrafibrillar/extrafibrillar mineralization of collagen scaffolds based on a biomimetic strategy to promote the regeneration of bone defects. **Int. J. Nanomed.**, Auckland, v. 11, p. 2053-2067, 2016.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Sci.**, Washington, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

- WEIBRICH, G. *et al.* Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p. 357–362, 2003.
- WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, Cambridge, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2000.
- WELCH, R. D. *et al.* Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 13, n. 9, p. 1483-1490, 1998.
- WIDMARK, G.; ANDERSSON, B.; IVANOFF, C. J. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants: presentation of a surgical method. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 26, n. 2, p. 106-109, 1997.
- WOFFORD, A. Human Fat-Derived Mesenchymal Stem Cells Xenogenically Implanted in a Rat Model Show Enhanced New Bone Formation in Maxillary Alveolar Tooth Defects. **Stem Cells Int.**, [s.l.], v. 2020, 2020.
- WOZNEY, J. M. *et al.* Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Sci.**, Washington, v. 242, n. 4885, p. 1528–1534, 1988.
- ZAMBORSKY, R. *et al.* Infection in Bone Allograft Transplants. **Exp. Clin. Transplant.**, Ankara, v. 14, n. 5, p. 484–490, 2016.
- ZENG, N. *et al.* Evaluation of novel resorbable membranes for bone augmentation in a rat model. **Clin. Oral Impl. Res.**, [s.l.], v. 27, n. 2, p. e8-e14, 2016.
- ZHANG, J. *et al.* The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Res. Ther.**, [s.l.], v. 6, p. 334-340, 2015.
- ZOUHARY, K. J. Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 22, n. 3, p. 301-316, 2010.

ANEXO - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



Administrative Change Approval

09-Jul-2015

Dear Dr. D'IPPOLITO,

The following administrative change was reviewed and approved by the University of Miami Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) as of the date below:

Protocol Number:	15-093 ADM 01
Protocol Title:	Development and characterization of a novel cellularized allograft for the alveolar ridge augmentation: a study in rats
Protocol Sponsor:	ORTHOPAEDICS & REHABILITATION
Protocol PI:	D'IPPOLITO, GIANLUCA
Institution:	University of Miami
Date of Approval:	24-Jun-2015
Change(s) Approved:	ADD to Protocol: Cristina Grau Monge

The University of Miami has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW), National Institutes of Health. The assurance number is #A-3224-01, effective November 23, 2011. Additionally, as of October 22, 2013, the Council on Accreditation of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC International) has continued the University of Miami's full accreditation.

Sincerely,

Sari Izenwasser, PhD

Chair, **Institutional Animal Care and Use (IACUC)**
 Professor of Psychiatry and Behavioral Sciences
 University of Miami Miller School of Medicine
 1600 NW 10th Ave., Room 4113A (D-80)
 Miami, FL 33136

Email Address: sizenwasser@med.miami.edu
 Tel: 305-243-2032; Fax: 305-243-5475