Bruno Vinícius Pimenta de Almada

Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução à regeneração óssea

Comparison of mesenchymal stem cells from different sources in inducing bone formation

São Paulo
2013

Bruno Vinícius Pimenta de Almada

Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução à regeneração óssea

Comparison of mesenchymal stem cells from different sources in inducing bone formation

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Bruno Vinícius Pimenta de Almada

Comparação entre fontes de células-tronco mesenquimais na indução à regeneração óssea. 80 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Engenharia de tecidos 2. Células-tronco de dentes decíduos esfoliados 3. Células-tronco de músculo orbicular do lábio. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Prof(a). Dr.(a).
Orientador(a)

Dedico esta dissertação aos meus pais João e Marcia; por todo o apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.
Dedico a minha noiva Joyce por todo o amor e carinho.

De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar
Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim terá valido a pena existir!

***SABINO, Fernando*. Encontro Marcado**

Agradecimentos

Este trabalho é fruto da contribuição de muitos, assim como na vida, nada é construído sozinho. Várias pessoas foram importantes para que este objetivo fosse alcançado, assim, a escrita dos agradecimentos é uma parte difícil da dissertação, pois corro o risco de cometer alguma injustiça ao deixar mencionar nomes de pessoas que também contribuíram para o trabalho.

Agradeço a minha orientadora Drª Maria Rita Passos Bueno, não só por ser uma ótima orientadora mas também pelas oportunidades a mim concedidas e por acreditar que poderia dar certo. Sempre lhe serei grato.

À Drª Luciane Portas Capelo, uma excelente amiga, que juntamente com a Rita me orientou na execução deste trabalho. Obrigado pelos conselhos, pelas conversas, os desabafos, paciência e pela grande contribuição neste trabalho.

À Drª Marilia Trierveiler Martins, professora da Faculdade de Odontologia da USP. Obrigado pela colaboração, ensinamentos, disponibilidade e por deixar o seu laboratório sempre de portas abertas para mim.

À Drª Cecília Helena de A. Gouveia Ferreira, professora do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Obrigado pela colaboração e disponibilização do equipamento de micro-CT.

À Drª Daniela Franco Bueno, que me iniciou no estudo da bioengenharia de tecidos ósseos. Obrigado pela amizade, pelo companheirismo e também pelos momentos de diversão.

Ao Gerson, um grande amigo e quase um irmão. Obrigado pela ajuda nos experimentos de cultivo celular em plenos finais de semana ou durante a noite. E principalmente por todos os momentos fora do lab, com certeza você foi o responsável por deixar minha vida aqui em São Paulo mais agradável.

Aos não somente colegas, mas também bons amigos do laboratório: Cintia, Simone, Melina, Daniele Moreira, Vanessa, Joana, Larissa, Carol, Felipe e Camila. Obrigado pela troca de experiências, pelos bons relacionamentos e por propiciar no laboratório um excelente ambiente para trabalhar. Além destes, gostaria de agradecer especialmente aos amigos: Rodrigo, Roberto, Luciano, May, Meire, Andressa, Karina, Ana Luiza, Lucas e Erika com os quais tive o prazer de compartilhar excelentes momentos dentro e fora do laboratório. Os churrascos na laje, as festas na USP e as cervejinhas foram essenciais para a concretização deste trabalho.

Aos novos amigos paulistas: He-man, Camila, Ligia, Maneco, Andrews, Lucas, Carolina Soares, Cintia Takeyama e até a Elaine. Além de todos meus companheiros e companheiras de república que conviveram comigo. Obrigado pelos momentos de descontração.

À toda a equipe do Centro de Estudo do Genoma Humano, em especial à Heloisa, Fernando, Vanessa Sato e Wagner.

À minha noiva Joyce, pelo carinho, respeito e por nunca ter desacreditado em nosso amor mesmo à distância. Obrigado por todo o passado e futuro que iremos compartilhar.

Aos meus pais, pelo amor, pelo apoio e pela dedicação incondicionais. Vocês foram imprescindíveis na conquista desta vitória.

Ao meu irmão, Hudson, pela amizade e companheirismo;

Este trabalho contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação do Brasil.

Notas

Esta dissertação de Mestrado compreende um trabalho inédito desenvolvido durante os anos de 2011 a 2013 no Laboratório de Genética do Desenvolvimento do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH/IB-USP).

Embora seja indicado no modelo tradicional de dissertação, pelo programa de pós-graduação do Instituto de Biociências, que se deva evitar o uso de anglicismos, alguns, como *in vitro* e *in vivo*, foram utilizados. Tais palavras não foram traduzidas para o português, pois são usadas corriqueiramente no meio científico e tem seu significado conhecido por esta comunidade.

1. Introdução

O campo da ortopedia desenvolveu-se significativamente a partir do último século, graças ao surgimento de novos produtos, técnicas cirúrgicas e o desenvolvimento da medicina regenerativa. Entretanto, mesmo com todos estes avanços, milhões de pacientes ainda sofrem com doenças ou fraturas ósseas. Por conta disto, os processos relacionados à regeneração óssea tem recebido grande atenção da comunidade médico-científica (SEONG *et al*., 2010).

A medicina regenerativa é uma área extremamente ampla, que tem o objetivo de criar, reparar ou promover a regeneração de tecidos ou órgãos danificados, restaurando a arquitetura nativa e função biológica, a partir da utilização de células-tronco (CORSI *et al*., 2007; GLOTZBACH *et al*., 2011).

1.1 Sistema Esquelético e Regeneração

1.1.1 O Osso

O sistema ósseo-articular (sistema esquelético) é composto por ossos e articulações. Apresenta funções de proteção para órgãos vitais e para o canal raquidiano, proporciona a sustentação e ancoragem de músculos, além de alta atividade metabólica servindo de reserva de diversos íons, principalmente o cálcio e fosfato, liberando-os de maneira controlada na corrente sanguínea para manter a homeostase (TORTORA *et al*., 2010).

A partir de uma análise macroscópica, podemos distinguir os ossos compactos dos ossos esponjosos. O osso compacto ou cortical é formado por lamelas ósseas paralelas e justapostas, constituindo uma substância dura e compacta que confere resistência ao osso. O osso esponjoso ou trabecular é muito menos espesso, já que é formado por lâminas ósseas irregularmente dispostas nos vários sentidos, deixando espaços livres entre si. Entretanto, vale ressaltar que a descrição acima trata-se de uma classificação macroscópica,

uma vez que tanto os ossos corticais quanto trabeculares apresentam a mesma estrutura histológica básica (ROSS *et al*., 2012).

Os ossos são compostos majoritariamente pelo tecido ósseo. Este por sua vez, é composto de três componentes principais: (1) uma matriz orgânica constituída basicamente por colágeno e outros tipos de proteínas (glicoproteínas, proteolipídeos e fosfoproteínas), (2) uma matriz mineral formada em sua maioria por cristais de fosfato de cálcio similares à hidroxiapatita e (3) pelos três componentes celulares: os osteoblastos, os quais são responsáveis pela formação óssea e pela deposição de matriz óssea; os osteócitos, responsáveis pela manutenção da massa e da estrutura óssea e os osteoclastos, os quais são responsáveis pela reabsorção da matriz extracelular óssea e mobilização de íons de cálcio e fosfato da matriz extracelular óssea para a corrente sanguínea (ROSS *et al*., 2012; Bab *et al*., 2012).

A matriz extracelular (MEC) do tecido ósseo é muito mais do que uma estrutura mecânica que serve de apoio às células ósseas. Ela tem sido reconhecida também como reguladora da atividade biológica do osso. A MEC serve como depósito de sinais moleculares, principalmente fatores de crescimento sequestrados pelos seus componentes macromoleculares (TUAN, 2013). A MEC é composta principalmente de proteínas fibrosas de colágeno com capacidade de ser mineralizada. Neste processo de mineralização, íons de cálcio e fosfato são ligados ao colágeno I e II, por ação das sialoproteínas ósseas e fosfatases alcalinas (ALP) (CHEN *et al*., 2012). O tecido ósseo também contém água em sua formação, o que confere resistência e flexibilidade à MEC e que por fim, refletem na sua função mecânica (CURREY, 2002).

O desenvolvimento ósseo ocorre por dois principais mecanismos: formação óssea intramembranosa e formação óssea endocondral. A formação óssea intramembranosa é o processo formador da maioria dos ossos do crânio, tais como: frontal, parietal, de partes do occipital e temporal e das maxilas superior e inferior. Além de contribuir para o crescimento dos ossos curtos e o crescimento em espessura dos ossos longos. Este processo de formação óssea é mediado pela porção interna do periósteo. Nele as células-tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos, e estes por sua vez, sintetizam

o osteóide (matriz ainda não mineralizada) que logo se mineraliza. Neste processo alguns osteoblastos ficam aprisionados nos espaços lacunares e passam a ser osteócitos (SHAPIRO, 2008; TETI, 2011).

A formação óssea endocondral é a responsável pela formação dos ossos curtos e longos. Ela tem início sobre um molde de cartilagem hialina. A ossificação endocondral consiste essencialmente em dois processos. Primeiro, o molde de cartilagem hialina sofre uma série de modificações: hipertrofia dos condrócitos, produção de colágeno X e morte dos condrócitos por apoptose. Segundo, as cavidades deixadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos e por células-tronco mesenquimais oriundas dos tecidos adjacentes. Finalmente, estas células-tronco mesenquimais se diferenciam em osteoblastos, os quais produzirão a matriz óssea sobre os restos da cartilagem hialina. Ao produzir a matriz óssea acabam ficando retidos e passam a ser osteócitos (TETI, 2011).

A ossificação endocondral inicia com o aparecimento dos centros de ossificação primários ainda no estágio embrionário e se estende à diversas regiões após o nascimento. Os centros de ossificação primários iniciam a formação da diáfise dos ossos longos e são seguidos pelo aparecimento dos centros de ossificação secundário ou lamelar, os quais ocorrem nas extremidades das epífises, somente após o nascimento. A diáfise é separada de ambas as epífises pelas lâminas epifisárias, as quais são formadas por cartilagem hialina altamente especializada. A lâmina epifisária proporciona o crescimento longitudinal dos osso longos até que os indivíduos alcancem a maturidade esquelética (18 a 25 anos). Nesta fase, com exceção das cartilagens articulares, toda a cartilagem remanescente é substituída por osso (TETI, 2011).

Em ambos os processos de formação óssea, primeiramente é formado um osso imaturo, o qual é denominado de tecido ósseo primário. Neste tecido, as fibras colágenas estão desorganizadas e apresentam baixa resistência mecânica. O tecido ósseo primário é gradativamente substituído pelo tecido ósseo secundário ou lamelar. Este por sua vez, apresenta organização lamelar concêntrica altamente organizada, em que as fibras de colágeno estão dispostas

paralelas umas às outras na mesma lamela, conferindo ao osso resistência à torção (SHAPIRO, 2008; TETI, 2011).

1.1.2 Regeneração Óssea

O tecido ósseo é um tecido dinâmico que está em constante remodelamento através de um processo de reabsorção e síntese mediados por osteoclastos e osteoblastos, respectivamente (BAR-SHAVIT, 2008). O remodelamento ósseo promove ajustes morfológicos, a reparação de microfraturas e garante a homeostase mineral. Estima-se que 3% do osso cortical humano e mais de 30% do osso trabecular são remodelados por ano, e isto responderia a 6% dos ossos sendo remodelados anualmente (JIMI *et al*., 2012).

As fraturas são situações que levam à descontinuidade do osso. Em geral, o osso apresenta elevada capacidade de regeneração após fraturas, mesmo em indivíduos adultos. O processo natural de regeneração de uma fratura começa quando o osso lesionado e tecidos circundantes sangram e formam um hematoma na região. A formação do hematoma geralmente é seguida por uma resposta inflamatória. É durante esta fase que ocorre a degranulação plaquetária e a infiltração de macrófagos no local da fratura, os quais liberam citocinas inflamatórias incluindo fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF), fatores transformadores de crescimento β (TGF- β), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), prostaglandina E2 (PGE2) e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Ainda nesta fase inicial, fibroblastos e células-tronco (CT) começam a se proliferar e expressar fatores de crescimento fibroblásticos (FGF), além disso, as CTs e as células osteoprogenitoras começam a expressar proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) e TGF- β necessários na via de maturação dos pré-osteoblastos em osteoblastos e também para a formação óssea (BORRELLI *et al*., 2012).

Em seguida, com a maturação do hematoma uma matriz colágena e vasos sanguíneos se desenvolvem e a partir desta vascularização, nutrientes, fatores de crescimento e mais CTs são direcionadas ao local e promovem a regeneração da lesão (BORRELLI *et al*., 2012; HOLZAPFEL *et al*., 2013). Entretanto quando

se trata de lesões muito grandes, ocorre uma invasão de tecido fibroso que pode preencher o espaço do defeito e impedir a formação da vascularização. Consequentemente, o processo de regeneração do osso é interrompido e não leva à união das estruturas (ZHANG *et al*., 2012). Nestes casos, as lesões que não se regeneram espontaneamente ainda permanecem como um desafio clínico e são denominadas de defeitos críticos (GIANNOUDIS *et al*., 2007; SCHMITZ, 1986).

Os defeitos críticos geralmente se originam de traumatismos ósseos seguidos ou não de infecção, tumores, periodontite, síndromes e malformações congênitas, podendo resultar em sequelas funcionais e estéticas graves (PAGNI *et al*., 2012). Nos casos das malformações craniofaciais, como por exemplo as fissuras lábio-palatinas, o osso ausente deve ser reposto cirurgicamente por enxertos ósseos para estabelecer a continuidade da esqueleto craniofacial. Além disto, nestes casos a reabsorção óssea ocorre de 10 a 36% dos casos, nas quais são necessárias outras intervenções cirúrgicas (BAYERLEIN *et al*., 2006; HIBI *et al*., 2006).

1.1.2.1 Enxertos Ósseos

Os procedimentos clínicos para o tratamento das fraturas ósseas devem se basear não só na localização da lesão mas também na necessidade e idade de cada paciente (HOLZAPFEL *et al*., 2013). Atualmente, o padrão ouro para a reconstrução óssea são os enxertos autólogos, os quais utilizam sítios doadores do próprio paciente como por exemplo a crista ilíaca, costelas, calvária, tíbia entre outros. Este método fornece três elementos essenciais: um substrato osteocondutor, fatores osteoindutores e células osteogênicas. No entanto, ele também apresenta algumas desvantagens tais como: a necessidade de um segundo sítio cirúrgico para a obtenção do enxerto, quantidade limitada de osso que pode ser retirada; morbidade da área doadora; reabsorção pós-operatória; além de complicações como dor crônica e lesões vasculares durante o procedimento cirúrgico (ABUKAWA *et al*., 2006).

Uma alternativa para realização dos enxertos autólogos é a utilização de osso alogênico obtido de bancos de ossos, o que pode eliminar as desvantagens citadas acima. Uma vez que os indivíduos são geneticamente diferentes, os tecidos ósseos substituintes precisam ser tratados para reduzir a rejeição. Este tratamento impossibilita sua participação na fase osteogênica do reparo ósseo, mas preserva as características osteocondutoras e osteoindutoras do enxerto, conferindo-lhe uma matriz sobre a qual ocorrerá a angiogênese e a osteogênese a partir das células mesenquimais do tecido conjuntivo (PINTO, 2010). Entretanto, o processo de desvitalização e a consecutiva absorção do enxerto podem levar a uma perda da estabilidade mecânica e a falhas na integração com o osso do paciente. Além disto, devido à natureza compacta dos ossos corticais alogênicos, o processo de revascularização e invasão celular podem não ocorrer. Portanto acredita-se que a falta de remodelamento e de revascularização podem ser responsáveis pela alta taxa de complicações cirúrgicas desta metodologia (DIMITRIOU *et al*., 2011).

A estas limitações somam-se a crescente demanda de transplantes alogênicos e a limitada quantidade de osso que podem ser retiradas dos sítios doadores nos transplantes autólogos. Diante disto novos conceitos terapêuticos tem sido idealizados para substituir as atuais opções de tratamento que utilizam abordagens inertes. Estas novas abordagens, agora com enfoque mais biológicos focalizam na reconstrução estrutural-funcional dos tecidos. Foi neste contexto que emergiu a bioengenharia de tecidos ósseos, uma ciência que oferece soluções a serem implementadas no campo da medicina regenerativa (HOLZAPFEL *et al*., 2013).

1.2. Bioengenharia do Tecido Ósseo

A bioengenharia de tecido ósseo é uma ciência interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e de ciências biológicas para a produção de tecidos ósseos. Os esforços são voltados fundamentalmente para a compreensão da relação estrutura-função, tanto em tecidos ósseos saudáveis quanto nos que apresentam alguma patologia, além do desenvolvimento de substitutos

biológicos para a restauração ou promoção da regeneração (CHAPEKAR, 2000). Para desenvolver estes substitutos biológicos a bioengenharia de tecido ósseo se baseia em três princípios: células-tronco, biomateriais com capacidade osteocondutivas e fatores de crescimento que induzem a formação óssea (LANGER; VACANTI, 1993). Cada um destes elementos, quando utilizados sozinhos, são capazes de promover a regeneração do osso, entretanto, quando utilizados em combinações ou todos ao mesmo tempo o resultado é melhor (EBERLI *et al*., 2011).

Desde a descrição da bioengenharia de tecidos por LANGER e VACANTI em 1993, diversas estratégias para o desenvolvimento da bioengenharia de tecido ósseo foram exploradas. Estas por sua vez podem ser classificadas de acordo com suas abordagens: metodologias que utilizam fatores de crescimentos ou técnicas que utilizam CTs com potencial osteogênico (MEINEL *et al*., 2004).

As abordagens que utilizam CTs exógenas dependem dos fatores de crescimento secretadas por elas para potenciar o processo de reparo do defeito. Em contraste, as técnicas que utilizam fatores de crescimento exógenos mobilizam as células osteoprogenitoras do hospedeiro para o local da lesão e as induzem a se diferenciar para promover a regeneração óssea (KIMELMAN *et al*., 2007).

A escolha da melhor abordagem ainda é muito controversa. Enquanto as técnicas baseadas em fatores de crescimento podem disponibilizar imediatamente estes fatores no sítio a ser regenerado, sua eficiência é altamente dependente do *pool* de células osteogênicas endógenas, as quais podem estar comprometidas devido a uma variedade de doenças ou pela idade do paciente. Além disto, são necessárias várias aplicações de fatores de crescimento em concentrações otimizadas de acordo com cada etapa da via de regeneração (ROUWKEMA *et al*., 2008).

Por outro lado, as abordagens que utilizam CTs exógenas funcionam independentemente das células osteogênicas do hospedeiro, e podem, portanto, alcançar um melhor resultado clínico em pacientes com células progenitoras

osteogênicas comprometidas tanto pela idade avançada como por alguma patologia (ZHANG *et al*., 2012).

Portanto, em vista destas razões optamos no presente estudo por abordar dois dos três princípios da bioengenharia de tecidos ósseos: as células-tronco e os biomateriais.

1.2.1 Noções Básicas da Biologia das Células-Tronco.

O termo células-tronco (CT) refere-se a uma população de células indiferenciadas que apresentam grande capacidade proliferativa, de auto-renovação e de se diferenciarem em uma variedade de tipos de células especializadas (plasticidade) sob condições apropriadas (LAJTHA, 1979). As CTs são categorizadas de acordo com sua origem (embrionárias e adultas) e plasticidade (FIG. 01).

As células-tronco embrionárias (CTEs) são obtidas da massa celular interna do blastocisto (entre 4 ou 5 dias após a fecundação), e já foram isoladas de embriões de camundongos, ratos e de humanos (BUEHR *et al*., 2008; EVANS, 1981; THOMSON *et al*., 1998). As CTEs possuem a característica de se auto-renovar *in vitro,* enquanto perdurar o contato com o *feeder cell layer*. Uma vez cessado este contato elas iniciam o processo de diferenciação resultando na formação de agregados tridimensionais de células, denominados de corpo embrióides, seguido da diferenciação para regiões derivadas das três camadas germinativas: endoderma, mesoderma e ectoderma (SEONG *et al*., 2010).

No entanto, alguns problemas quanto a utilização das CTEs em terapia tem sido levantados na literatura. Entre eles podemos destacar a formação de teratomas, a rejeição imunológica e problemas éticos (SWIJNENBURG *et al*., 2005; WINKLER *et al*., 2005).

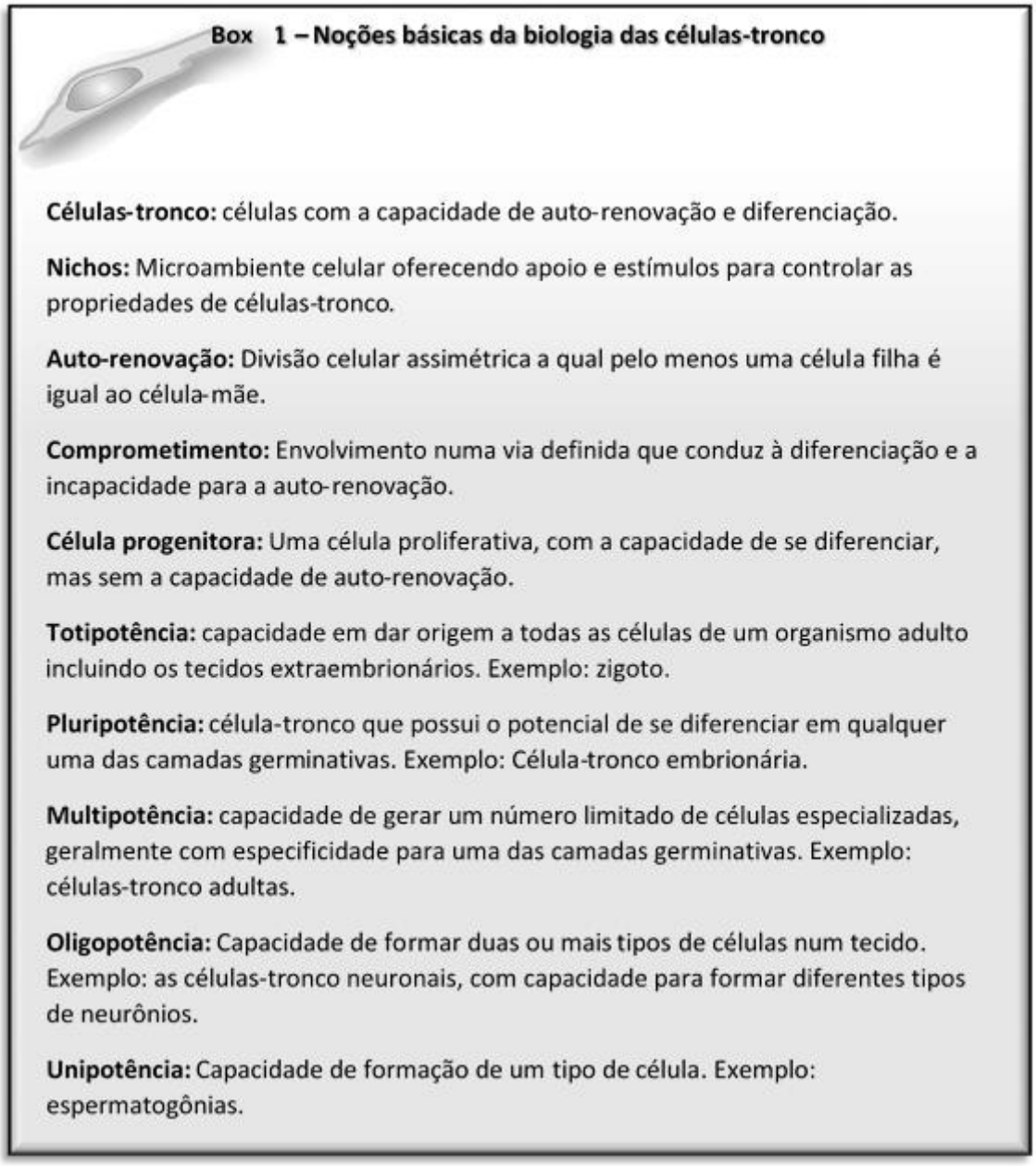
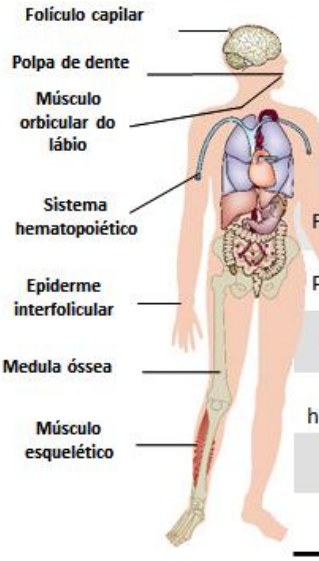


Figura 01. Noções básicas de células-tronco.

Após o estágio de blastocisto do embrião, as CTEs não são mais encontradas e a regeneração e formação dos tecidos passa a ser mantida por diferentes populações de células-tronco adultas (CTA) (GLOTZBACH *et al*., 2011).

As CTAs residem em locais anatômicos específicos denominados nichos, os quais criam microambientes únicos. Cada nicho tem um papel dominante no controle do comportamento das CTs. Os sinais a partir do nicho influenciam na proliferação das CTs e também ajudam a manter o seu estado indiferenciado. As CTAs podem ser encontradas na maioria dos tecidos de todo o organismo (FIG. 02) e elas apresentam uma notável capacidade de se auto-renovar ou de se diferenciar a um (unipotência) ou mais (multipotência) tipos celulares (HSU, 2012).



Tipo Celular	Localização das células-tronco	Componentes do nicho
Folículo capilar	Bulbo	Bulbo K6⁺, papila dermal, pré-adipócitos, gordura subcutânea
Polpa de dente	Polpa de dente	Dentina, câmara pulpar, ligamento periodontal, osso
Músculo	Músculo orbicular do lábio	Miofibras* (?)
Sistema hematopoiético	Medula óssea	Macrofagos, céls. T reg, osteoblastos, adipócitos, glia
Epiderme interfolicular	Camada basal da epiderme	Fibroblastos dermais
Músculo esquelético	Entre a membrana basal e as fibras musculares	Miofibras* (?)

Figura 02. Localização de algumas células-tronco adultas (CTA). As CTAs são células indiferenciadas encontradas em diversos tecidos do corpo. Elas apresentam tanto a capacidade de auto-renovação e de se diferenciarem em tipos celulares especializados sob apropriadas condições. A localização de algumas células-tronco (CT) e seus respectivos nichos estão listados na tabela. Os componentes do nicho que são derivados das CTs estão marcados com asterisco (*); os pontos de interrogação (?) indicam candidatos a componentes do nicho cujo o papel regulador ainda precisam ser demonstrados; K6: queratina 6; céls. T reg: células T reguladoras. Figura adaptada de (HSU, 2012).

A atividade das CTAs podem variar bastante dependendo dos tecidos em que se encontram. Por exemplo, grande parte das células da epiderme, do intestino e do sistema hematopoiético morrem diariamente como parte do seu ciclo de vida normal, assim a regeneração destes tecidos necessitam do constante uso das CTAs (HSU, 2012). Entretanto, a grande maioria das CTAs

permanecem em relativa quiescência, mas em períodos de estresse ou quando ocorre uma lesão elas são rapidamente mobilizadas.

As CTAs tornaram-se o foco de pesquisas na área da medicina regenerativa devido às características acima citadas e pela possibilidade de serem utilizadas em terapias (GLOTZBACH *et al*., 2011).

1.2.1.1 Células-Tronco Mesenquimais

Existem três tipos de subpopulações de CTAs: as células-tronco hematopoiéticas, as endoteliais e as mesenquimais. As células-tronco mesenquimais (CTM) compreendem uma subpopulação de células multipotentes capazes de gerar o mesênquima, ou seja, tecidos que se desenvolvem principalmente a partir da mesoderme do embrião (CAPLAN, 1991).

As CTMs apresentam grande potencial em aplicações clínicas devido ao fácil isolamento e manipulação, à sua capacidade de serem expandidas *ex vivo* e de se diferenciarem em diversas linhagens, incluindo osteócitos, condrócitos, miócitos e adipócitos (RUBIO *et al*., 2005). De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular, as CTMs devem apresentar além da multipotência, aderência ao plástico e imunofenótipo específico: mais de 95% da população devem apresentar marcação positiva para os antígenos de superfície CD13, CD29, CD44, CD73, CD105 e CD166 e menos de 3% de marcação negativa para CD11, CD14, CD31, CD34, CD45 (DOMINICI *et al*., 2006).

As CTMs são as responsáveis pela capacidade regenerativa dos seus tecidos adjacentes. Elas já foram isoladas em diversos tecidos como: a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, membrana sinovial, músculo esquelético, derme, sangue, cordão umbilical humano, pulmão, trompa de falópio, polpa de dente, músculo orbicular do lábio (BUENO *et al*., 2009; DE BARI *et al*., 2001; DE MENDONÇA COSTA *et al*., 2008; FRIEDENSTEIN *et al*., 1966; GRONTHOS *et al*., 2000; IN ’T ANKER *et al*., 2003; JANKOWSKI; DEASY, 2002; JAZEDJE *et*

al., 2012; MARESCHI *et al*., 2001; NAKAHARA *et al*., 1990; SECCO *et al*., 2009; TOMA *et al*., 2001; ZUK *et al*., 2001; ZVAIFLER *et al*., 2000).

Dentre as CTMs, as CTs provenientes da medula óssea (BMSC) vêm sendo amplamente utilizadas em estudos pré-clínicos e clínicos (CAPLAN, 2009). Embora o uso das BMSCs tenha demonstrado bons resultados clínicos na bioengenharia do tecido ósseo, o processo para obtenção destas células é invasivo e doloroso, assim como o processo de obtenção de osso autógeno. As BMSC, correspondem a uma população de células escassas (0,01% a 0,001% das células isoladas). Além disto, a sua multipotência e capacidade de reparo de tecidos e órgãos são inversamente proporcionais à idade do doador (CHOUDHERY *et al*., 2012; PITTENGER *et al*., 1999; SEONG *et al*., 2010). Sendo assim é importante identificar outras fontes de CTs com potencial osteogênico e que possam ser obtidas de maneira menos invasivas. Diante destes fatores, optamos em estudar as células-tronco de dentes decíduos esfoliados e as células-tronco do músculo orbicular do lábio, que apresentam características promissoras para utilização na bioengenharia de tecido ósseo.

1.2.1.1.1. Células Tronco de Dentes Decíduos Esfoliados

Uma fonte alternativa de CTs para aplicações na bioengenharia de tecido ósseo provém da polpa de dente decíduos. Estes dentes são eliminados naturalmente como parte do desenvolvimento da dentição de cada pessoa ou por intervenções de cirurgiões dentistas como parte do tratamento odontológico (SONOYAMA *et al*., 2008).

As células-tronco de dentes decíduos esfoliados (SHED) apresentam propriedades típicas de CT, e uma taxa de proliferação maior em relação as células-tronco de polpa de dente adultas (DPSC) e da medula óssea (BMSC), facilitando assim a sua expansão *in vitro* antes da implantação em biomateriais (MIURA *et al*., 2003). Ainda neste contexto, estudos anteriores mostram que do ponto de vista osteoblastogênico as SHED apresentam potencial idêntico ao das BMSC, tanto em análises *in vitro* como em *in vivo*, e podem ser uma fonte alternativa de CT para serem usadas na bioengenharia de tecido ósseo,

particularmente no tratamento das malformações craniofaciais (SEO *et al*., 2008; TAMAKI *et al*., 2012; YAMAZA *et al*., 2010). Além disto um estudo realizado pelo nosso grupo observou que SHED apresenta maior potencial osteogênico do que células-tronco de tecido adiposo (ADSC), tanto *in vitro* como *in vivo*. Neste estudo, as SHED apresentaram elevada atividade de fosfatase alcalina e de mineralização da matriz extracelular quando comparadas com ADSC. E ainda quando comparado o potencial de neoformação óssea *in vivo* em defeitos críticos calvarianos em ratos não imunossuprimidos, as SHED induziram 7 vezes mais formação óssea do que as ADSC (Fanganiello *et al*., manuscrito em preparação).

Estudos que verificam o potencial osteogênico das SHED *in vivo* geralmente associam estas células à biomateriais e em seguida, as implantam tanto em compartimentos subcutâneos no dorso de animais, quanto em defeitos críticos. Contudo, a origem da neoformação óssea é um ponto controverso e que merece ser discutido em detalhes. Como relatado na literatura, as ilhas ósseas podem ter origem nas células enxertadas, ser de origem do hospedeiro ou ainda ser um mosaico contendo células tanto do hospedeiro quanto enxertadas.

MIURA e colaboradores (2003) associaram SHED à biomateriais de HA/β-TCP e enxertaram em compartimentos subcutâneos de camundongos imunossuprimidos. Após 8 semanas eles observaram a formação de ilhas ósseas no interior dos poros do biomaterial. Para verificar a origem da neoformação óssea, eles utilizaram sondas especificas para sequência Alu humanas e observaram que as células humanas estavam localizadas no tecido conjuntivo que preenchia os poros do biomaterial, enquanto que as ilhas ósseas foram marcadas com sondas específicas para a sequência Pf1 murinas. Entretanto, resultado oposto, foi observado por LAINO e colaboradores (2006) quando enxertaram SHED em compartimento subcutâneo de ratos imunossuprimidos. Neste estudo eles observaram que após 4 semanas o osso neoformado era de origem humana, porém estes pesquisadores pré-induziram as SHED antes das cirurgias, e isto pode ter selecionado uma subpopulação de células mais comprometidas com a diferenciação osteogênica, o que explicaria as diferenças entre ambos os estudos.

Por outro lado, os trabalhos que verificaram a regeneração de defeitos críticos calvarianos em camundongos imunossuprimidos observam que as SHED são responsáveis pela neoformação óssea (MA *et al*., 2012; SEO *et al*., 2008). E ainda, quando os defeitos críticos são em mandíbulas de porcos, foi demonstrado que osso neoformado nesta região tinha como origem tanto as células enxertadas como as células do próprio hospedeiro (ZHENG *et al*., 2009).

Recentemente, o nosso grupo utilizou SHED associadas a biomateriais de membrana de colágeno para regenerar defeitos críticos na calvária de ratos Wistar não imunossuprimidos. Após 60 dias de implantação, foi verificado que nos lados enxertados com SHED o defeito crítico havia sido regenerado. Neste estudo foram coletados DNAs tanto do lado controle quanto do lado contendo as SHED, e a partir da técnica de PCR, o DNA humano foi detectado apenas nos lados contendo as SHED e a origem das ilhas ósseas neoformadas foi atribuída às células humanas (DE MENDONÇA COSTA *et al*., 2008).

Portanto, estes dados na literatura sugerem que se o modelo animal for imunossuprimidos, as SHED se diferenciarão em osteoblastos. Caso contrário, o osso neoformado poderá ser tanto um mosaico formado pelas células enxertadas ou ser de origem do hospedeiro. Além disto, outros pesquisadores sugerem que as CTs enxertadas são responsáveis por recrutar as células osteoprogenitoras do hospedeiro, secretar fatores de indução à osteogênese para que as células osteoprogenitoras se diferenciem em osteoblastos (BONFIELD *et al*., 2010; MIURA *et al*., 2003). Desta forma, estudos que esclareçam a origem das neoformações ósseas em modelos de xenotransplantes precisam ser melhor debatidos.

1.2.1.1.2. Células-Tronco Derivadas de Músculo

O tecido muscular contém uma população de células heterogêneas. Esta população inclui além da fibras musculares, células-tronco derivadas de músculo (MDSC). As MDSC são células multipotentes, capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, tais como os adipócitos, osteoblastos e condrócitos (JACKSON *et al*., 2011; JANKOWSKI *et al*., 2002; MASTROGIACOMO *et al*., 2005; SUN *et al*.,, 2005).

Recentemente, o nosso grupo identificou as células-tronco do músculo orbicular do lábio (OOMDSC), cujos fragmentos são rotineiramente descartados durante as cirurgias de reconstrução do lábio (queiloplastia) dos pacientes com fissuras lábio palatinas (FL/Ps). Estas células são de grande interesse na bioengenharia de tecido ósseo, uma vez que a sua coleta não confere morbidade adicional ao paciente e seu uso poderia contribuir para o processo de reconstrução do osso alveolar, frequentemente comprometido nestas crianças com FL/Ps.

As OOMDSC exibem as marcações de superfície celular típicas de células-tronco e são capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos *in vitro*. Quando associadas a um biomaterial à base de colágeno, promovem a regeneração de defeitos críticos calvarianos em ratos Wistar (BUENO *et al*., 2009).

Alguns autores sugerem que as MDSC sem modificação genética não são capazes de promover a regeneração óssea, e além disto, só a partir de estímulos por BMP-2, que as MDSC seriam capazes de se diferenciar em osso (LEE *et al*., 2001). De fato, a grande maioria dos estudos que verificam o potencial osteogênico das MDSC *in vivo* geralmente utilizam células de camundongos geneticamente modificadas para expressar BMP-2 ou BMP-4 humanas.

Além disto, alguns estudos na literatura sugerem que as neoformações ósseas podem ter como origem as MDSC enxertadas (LEE *et al*., 2001; MASTROGIACOMO *et al*., 2005; MUSGRAVE *et al*., 2002; WRIGHT *et al*., 2002) ou ainda ser um mosaico contendo porções de ambas as origens (MESZAROS *et al*., 2012).

LEE e colaboradores (2001) estudando a regeneração de defeitos críticos calvarianos de camundongos imunossuprimidos, isolaram células dos músculos das pernas traseiras de camundongos C57BL e as modificaram geneticamente para expressar BMP-2 humano. Quatro semanas após as cirurgias, eles verificaram que as lacunas das ilhas ósseas que regeneraram o defeito crítico continham apenas 5% das células que expressavam BMP-2 humano, enquanto a grande maioria estava localizada às margens das ilhas ósseas ou no tecido

conjuntivo. Ou seja, uma pequena porcentagem das MDSC não só participaram com um veículo de entrega de BMP-2 como também diferenciaram em osteoblastos e ajudaram no reparo do defeito crítico.

MESZAROS e colaboradores (2012) estudando a influência do gênero do hospedeiro na regeneração óssea, isolaram MDSC de camundongos C57BL e as modificaram geneticamente para expressar tanto BMP-4 humano como GFP. Em seguida, as enxertaram em defeitos críticos tanto de machos como de fêmeas de camundongos C57BL. Após 28 dias de cirurgia havia se formado mais osso nos hospedeiros machos quando comparados com hospedeiras fêmeas. Além disto, a partir da detecção das células que expressavam GFP, foi possível determinar a contribuição das MDSC na neoformação óssea. Como observado, as ilhas ósseas eram formadas tanto pelas células enxertadas e em maior proporção por células do hospedeiro.

Contudo, apesar das MDSC serem de fácil acesso e obtenção, até o momento existem apenas dois trabalhos que utilizam estas células isoladas de tecidos humanos (BUENO *et al*., 2009; GAO *et al*., 2012) sendo que em nenhum deles é comparado o potencial de diferenciação osteogênico com outras fontes celulares. Além disto, com exceção do trabalho de BUENO e colaboradores (2009), todos os demais trabalhos modificam geneticamente as MDSC. Em razão disso é de grande importância um trabalho que compare as MDSC, sem modificação genética, com uma outra fonte celular e se a neoformação óssea *in vivo* é de origem das células enxertadas ou do hospedeiro.

1.2.2. Biomateriais

Na bioengenharia de tecido ósseo utilizam-se biomateriais, os quais mimetizam a MEC para que as células tenham a possibilidade de se aderirem, proliferarem, e diferenciarem para regenerar o tecido (VAN HOUT *et al*., 2011).

No que diz respeito aos biomateriais utilizados como arcabouços, não há como rotina o uso de um modelo único de estrutura que seja aplicável a todas as situações, fazendo-se necessária a busca e o desenvolvimento de materiais alternativos com características osteogênicas, osteoindutivas, osteocondutivas e

osteointegrativas para que ocorra a regeneração óssea (SITTINGER *et al*., 2004).

Os biomateriais desempenham um papel fundamental fornecendo um modelo tridimensional para a neoformação óssea. Os biomateriais não só podem ser usados como veículos para a entrega das CTs, mas também podem servir como um microambiente sintético em termos de composição química, estrutura física e com porções biologicamente funcionais (PAGNI *et al*., 2012)

Segundo POTTER e ELLIS (2004), um biomaterial ideal para enxerto ósseo deve conter as seguintes propriedades: ser quimicamente inerte, biocompatível, não alérgico, não cancerígeno, de custo aceitável, passível de esterilização sem que haja alteração de sua composição química, de fácil manipulação, de fácil conformação durante a realização da cirurgia, de boa estabilidade e apresentar radiopacidade. Além disso, o biomaterial não deve ser uma fonte passível de crescimento bacteriano. Finalmente, o material deve ser totalmente reabsorvível e substituível por tecido ósseo novo.

Muitos materiais tem sido utilizados para confecção dos biomateriais para bioengenharia de tecido ósseo como: materiais sintéticos (polyesters derivados de α-hridroxiacidos e outros polímeros) (STARK *et al*., 1998) a associação de cerâmicas com fosfato de cálcio e moléculas bioativas (HUTMACHER, 2000); uso de polímeros naturais como: colágenos, proteoglicanas, glicosaminoglicanas, elastinas e hidroxiapatita (LEE *et al*., 2001; STARK *et al*., 1998).

Biomateriais de cerâmicas de fosfato de cálcio, como os de hidroxiapatita (HA) e de tricálcio fosfato (TCP) são frequentemente utilizados para a regeneração óssea devido a sua semelhança com a porção mineralizada do osso (EL-GHANNAM, 2005). Tanto a HA e TCP são biocompatíveis e osteocondutivos, porém apresentam algumas desvantagens. Estudos anteriores revelaram que as partículas de HA é um arcabouço para a neoformação óssea, no entanto, apresenta baixa reabsorção. Em contraste a TCP tem reabsorção imprevisível (DACULSI *et al*., 2003). À partir da fabricação de um composto cerâmico bifásico a base de 60% HA e 40% B-TCP foi possível controlar a

reabsorção do material e ao mesmo tempo manter a sua propriedade osteocondutora (PLACHOKOVA *et al*., 2007).

A presença de poros interconectados na estrutura do biomaterial é fundamental para a formação óssea, pois permite a migração de células dos tecidos adjacentes e a angiogênese. O diâmetro dos poros também deve ser levado em consideração, poros muito pequenos levam a uma migração celular limitada e impedem a vascularização, resultando na formação de uma cápsula celular fibrosa envolvendo o biomaterial (HARLEY *et al*., 2008). Em contraste, poros muito grandes podem afetar as propriedade mecânicas dos biomateriais (KARAGEORGIOU & KAPLAN, 2005). Para a bioengenharia de tecidos ósseos estima-se que os poros do biomaterial devam ter entre 100um a 900um, e em média 300um para promover a formação de vasos capilares. Poros maiores que 300um favorecem a osteogênese direta, enquanto poros menores estimulam a ossificação osteocondral (ROOSA *et al*., 2010; SZPALSKI *et al*., 2012).

Os biomateriais vêm ganhando cada vez mais aceitação no mercado em razão do fácil uso e manipulação por diminuir a morbidade do sítio doador do enxerto e diminuir o tempo da cirurgia, além de serem produzidos com uma ampla variedade de parâmetros (tamanhos, formatos, porosidades).

1.3. Modelos animais

Um grande desafio da bioengenharia de tecidos ósseos é identificar e validar modelos animais clinicamente relevantes de doenças humanas ou lesões. Modelos em animais de grande porte são caros e difíceis de trabalhar em grandes quantidades. Além disso, a imunologia e fisiologia geralmente não estão bem caracterizadas. Ratos, por outro lado, são ideais do ponto de vista prático, pois é possível trabalhar com grandes quantidades, além de ter a imunologia e a fisiologia bem conhecidas. (HORWITZ, 2013).

O modelo biológico mais utilizado para promoção de regeneração do tecido ósseo *in vivo* descrito na literatura é a reconstrução de defeitos críticos criados nas calvárias de ratos (GOMES, 2011). SCHMITZ e colaboradores

(1986) conceituaram que um defeito de tamanho crítico, em um modelo experimental, é aquele que não irá reparar espontaneamente durante o tempo de vida do animal. No entanto, alguns autores defendem que deva ser considerado um defeito crítico aquele que não se repara até o término do estudo, uma vez que tais estudos não duram por toda vida do animal (COOPER *et al*., 2010; GOSAIN *et al*., 2000).

A escolha da calvária como modelo para mimetizar grandes perdas craniofaciais deve-se ao fato dela ser composta por osso membranoso e um suplemento sanguíneo relativamente limitado, conferindo poucas propriedades para se regenerar espontaneamente (SCHMITZ *et al*., 1986). Além disto é uma área anatomicamente livre de estresse mecânico e existe uma estabilidade relativa das estruturas que circundam o defeito crítico (MANKANI *et al*., 2006).

2. Conclusão

Em resumo, as OOMDSC se diferenciam em osteoblastos mais lentamente, contudo, são tão capazes de se diferenciarem em osteoblastos maduros *in vitro* quanto às SHED. Entretanto, *in vivo* esta equivalência não é mais observada; SHED induz mais neoformação óssea do que as OOMDSC.

Além disto, as células que compõem a neoformação óssea observada *in vivo,* não são de origem humana. As células humanas estão localizadas no tecido conjuntivo que preenche os poros do biomaterial em todos os períodos avaliados. Contudo, as células humanas enxertadas parecem estar envolvidas nas alterações da microarquitetura do biomaterial, tanto promovendo a neoformação óssea quanto modulando o envolvimento dos osteoclastos.

Além de tudo, o método de avaliação da neoformação óssea proposto por nós, corrobora os resultados obtidos por histologia.

3. Resumo

A regeneração óssea é um processo fisiológico que promove a neoformação de tecido ósseo saudável e funcional com características idênticas antes da lesão. Entretanto, frente a defeitos críticos, o osso é incapaz de se regenerar espontaneamente. Diante destas deficiências, a bioengenharia de tecidos ósseos (BTO) é uma opção promissora para a regeneração deste tipo de defeito. A maioria das abordagens de BTO utiliza as células-tronco mesenquimais da medula óssea (BMSC), porém, a coleta de BMSC dos pacientes é um processo bastante invasivo e doloroso. Por estas desvantagens, a busca por abordagens acessíveis e menos invasivas de novas fontes de células-tronco (CT) se tornou necessária. Neste contexto, as células-tronco de polpa de dentes decíduos (SHED) foram identificadas e sua aplicação na BTO, desde então, vem sendo amplamente estudada devido ao seu potencial osteogênico e por se tratar de uma fonte não invasiva. A obtenção de células-tronco do músculo orbicular do lábio (OOMDSC) também não causa dor adicional aos indivíduos, pois os fragmentos deste tecido são rotineiramente descartados durante as cirurgias de reconstrução do lábio.

No presente trabalho investigamos o potencial de diferenciação osteoblástico *in vitro* e *in vivo* das OOMDSC e comparamos com as SHED, além disto, associamos estas células a biomateriais de HA/β-TCP e investigamos a sua contribuição na neoformação óssea *in vivo*.

O imunofenótipo de cada amostra de SHED e OOMDSC foi verificado para certificar a identidade de CT mesenquimais. Em seguida, as células em cultura foram submetidas à diferenciação osteoblástica *in vitro*. Em 9 e 14 dias de diferenciação as OOMDSC apresentaram menor atividade de fosfatase alcalina ($p<0,0001$) e menor marcação de matriz extracelular mineralizada, comparado às SHED ($p<0,001$), enquanto que em 21 dias estas diferenças não foram mais observadas. Quando associadas a biomateriais e implantadas em defeitos críticos calvariais bilaterais em ratos Wistar, tanto OOMDSC e SHED foram capazes de induzir neoformação óssea após 50 dias de cirurgia, conforme evidenciado pela análise morfológica e por micro-CT. Todavia, as células ósseas encontradas nos sítios da neoformação óssea não eram de origem humana.

A avaliação da neoformação óssea *in vivo* induzida por SHED assim como a sua distribuição no enxerto foi verificada também em 07, 15 e 30 dias pós-cirúrgicos. Nestes períodos não há evidência de neoformação óssea, entretanto, as SHED estão localizadas no tecido conjuntivo que se forma e preenche o enxerto. Além disto, os dados sugerem que estas células estão relacionadas à modificações na microarquitetura do biomaterial e ainda à modulação dos números dos osteoclastos, também verificada nestas amostras.

Portanto, podemos concluir que as OOMDSC são tão capazes de se diferenciar em osteoblastos quanto às SHED *in vitro*, porém esta diferenciação é mais lenta. Os experimentos i*n vivo* indicam que as SHED possuem maior capacidade de indução à neoformação óssea quando comparadas às OOMDSC e que, em nosso modelo, as CT humanas não se diferenciam em osteoblastos *in vivo*. De qualquer forma a adição das CT ao biomaterial favorece a neoformação óssea, variações de microarquitetura e modulação dos osteoclastos. O fato de as ilhas ósseas não serem de origem humana indica que as células-tronco possam estar secretando fatores de indução à osteogênese, estimulando a neoformação óssea a partir das células do hospedeiro.

4. Abstract

Bone regeneration is a physiological process, which promotes the growth of tissue at the site of injury, with the same characteristics of the original bone. However, when faced with critical defects the bone is unable to regenerate spontaneously. Bone tissue engineering (BTE) is a promising option for regenerating this type of defect. The majority of the approaches in BTE use Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells (BMSC); however, the aspiration of bone marrow is a very invasive and painful procedure. Due to these disadvantages, the search for new, affordable and less invasive sources of stem cells (SC) has become necessary. In this context, stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) have been identified and their application in BTE, since then, has been widely studied because they can be obtained non-invasively and due to their osteogenic potential. Stem cells from the *orbicularis oris* muscle (OOMDSC) are also obtained non-invasively and do not cause additional pain to individuals, because the fragments of this tissue are routinely discarded during lip reconstruction surgeries.

In the present work we investigated, *in vitro* and *in vivo*, the osteoblastic differentiation potential of OOMDSC and compared with SHED; furthermore, we associated these cells with HA/β-TCP scaffolds and investigate its contribution in the bone formation *in vivo*.

The immunophenotype of each OOMDSC and SHED sample was verified to attest their mesenchymal stem cell identity. Then, cell cultures were submitted to osteoblastic differentiation *in vitro*. In 9 and 14 days of differentiation, OOMDSC exhibited lower alkaline phosphatase activity ($p < 0.0001$) and lower mineralized extracellular matrix staining compared to SHED ($p < 0.001$), whereas at 21 days, these differences were no longer observed. When associated with scaffolds and implanted into bilateral critical-sized calvarial defects in Wistar rats, both OOMDSC and SHED were able to induce bone formation after 50 days of surgery, as evidenced by morphological analysis and micro-CT. However, bone cells found at sites of bone formation were not of human origin.

The evaluation of new bone formation *in vivo* induced by SHED as well as its distribution in the graft was performed at 07, 15 and 30 days after surgery. During these periods there was no evidence of new bone formation, however, SHED were located in the connective tissue that formed and filled the graft. Furthermore, our results suggest that these cells are related to changes in the microarchitecture of the scaffold and also to the modulation of the number of osteoclasts observed in these samples.

In summary, our results suggest that OOMDSC are as capable to differentiate into osteoblasts as SHED *in vitro*, but this differentiation is slower. *In vivo* experiments indicate that SHED has a greater ability to induce bone

formation when compared with OOMDSC, and that in our model, the human stem cells do not differentiate into osteoblasts *in vivo*. Nonetheless, the addition of SC to the scaffolds promotes bone formation, as well as variations in microarchitecture and modulation of osteoclasts. The fact that the bone islands are not of human origin indicates that the stem cells may be secreting osteogenesis-inducing factors, stimulating the host's cells to regenerate the defects.

5. Referências Bibliográficas

ABUKAWA, H. et al. The engineering of craniofacial tissues in the laboratory: a review of biomaterials for scaffolds and implant coatings. **Dental clinics of North America**, v. 50, n. 2, p. 205-16, viii, abr. 2006.

ALVAREZ-BARRETO, J. F. et al. **Flow perfusion improves seeding of tissue engineering scaffolds with different architectures.Annals of biomedical engineering**, mar. 2007.

BAR-SHAVIT, Z. Taking a toll on the bones: regulation of bone metabolism by innate immune regulators. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 195-203, abr. 2008.

BAYERLEIN, T. et al. Evaluation of bone availability in the cleft area following secondary osteoplasty. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 34 Suppl 2, p. 57-61, set. 2006.

BONFIELD, T. L. et al. Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo. **Journal of inflammation (London, England)**, v. 7, n. 1, p. 51, jan. 2010.

BORRELLI, J. et al. Physiological challenges of bone repair. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 26, n. 12, p. 708-11, dez. 2012.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468-86, jul. 2010.

BUEHR, M. et al. Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1287-98, 26 dez. 2008.

BUENO, D. F. et al. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 2, p. 427-35, fev. 2009.

BURG, K. J. et al. Comparative study of seeding methods for three-dimensional polymeric scaffolds. **Journal of biomedical materials research**, v. 51, n. 4, p. 642-9, 15 set. 2000.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-50, set. 1991.

CAPLAN, A. I. New era of cell-based orthopedic therapies. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 15, n. 2, p. 195-200, jun. 2009.

CHAPEKAR, M. S. Tissue engineering: challenges and opportunities. **Journal of biomedical materials research**, v. 53, n. 6, p. 617-20, jan. 2000.

CHEN, K. et al. Osteochondral interface generation by rabbit bone marrow stromal cells and osteoblasts coculture. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 17-18, p. 1902-11, set. 2012.

CHOUDHERY, M. S. et al. Bone marrow derived mesenchymal stem cells from aged mice have reduced wound healing, angiogenesis, proliferation and anti-apoptosis capabilities. **Cell biology international**, v. 36, n. 8, p. 747-53, 1 ago. 2012.

COOPER, G. M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 125, n. 6, p. 1685-92, jun. 2010.

CORSI, K. A. et al. Regenerative medicine in orthopaedic surgery. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 25, n. 10, p. 1261-8, out. 2007.

DACULSI, G. et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 14, n. 3, p. 195-200, mar. 2003.

DE BARI, C. et al. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928-42, ago. 2001.

DE MENDONÇA COSTA, A. et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 19, n. 1, p. 204-10, jan. 2008.

DIMITRIOU, R. et al. Bone regeneration: current concepts and future directions. **BMC medicine**, v. 9, p. 66, jan. 2011.

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

EBERLI, D.; ATALA, A.; YOO, J. J. One and four layer acellular bladder matrix for fascial tissue reconstruction. **Journal of materials science. Materials in medicine**, v. 22, n. 3, p. 741-51, mar. 2011.

EL-GHANNAM, A. Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. **Expert review of medical devices**, v. 2, n. 1, p. 87-101, jan. 2005.

ENGSTRAND, T. et al. Transient production of bone morphogenetic protein 2 by allogeneic transplanted transduced cells induces bone formation. **Human gene therapy**, v. 11, n. 1, p. 205-11, 1 jan. 2000.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, 9 jul. 1981.

FRIEDENSTEIN, A J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 16, n. 3, p. 381-90, dez. 1966.

GAO, X. et al. BMP2 is superior to BMP4 for promoting human muscle derived-stem cell mediated bone regeneration in a critical size calvarial defect model. **Cell transplantation**, 1 nov. 2012.

GIANNOUDIS, P. V; EINHORN, T. A.; MARSH, D. Fracture healing: the diamond concept. **Injury**, v. 38 Suppl 4, p. S3-6, set. 2007.

GLOTZBACH, J. P. et al. Regenerative medicine. **Current problems in surgery**, v. 48, n. 3, p. 148-212, mar. 2011.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, jan. 2011.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 106, n. 2, p. 360-71; discussion 372, ago. 2000.

GREGORY, C. A et al. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical biochemistry**, v. 329, n. 1, p. 77-84, 1 jun. 2004.

GRONTHOS, S. et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 25, p. 13625-30, 5 dez. 2000.

HARLEY, B. A C. et al. Microarchitecture of three-dimensional scaffolds influences cell migration behavior via junction interactions. **Biophysical journal**, v. 95, n. 8, p. 4013-24, out. 2008.

HIBI, H. et al. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 35, n. 6, p. 551-5, jun. 2006.

HOLZAPFEL, B. M. et al. Can bone tissue engineering contribute to therapy concepts after resection of musculoskeletal sarcoma? **Sarcoma**, v. 2013, p. 153640, jan. 2013.

HORWITZ, E. M. Advancing regenerative medicine the translational way. **Science translational medicine**, v. 5, n. 177, p. 177fs9, 20 mar. 2013.

HSU, Y.-C.; FUCHS, E. A family business: stem cell progeny join the niche to regulate homeostasis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 13, n. 2, p. 103-14, fev. 2012.

HU, Z.-M. et al. Induction of bone matrix protein expression by native bone matrix proteins in C2C12 culture. **Biomedical and environmental sciences : BES**, v. 22, n. 2, p. 164-9, abr. 2009.

HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. **Biomaterials**, v. 21, n. 24, p. 2529-43, dez. 2000.

IN ’T ANKER, P. S. et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, v. 88, n. 8, p. 845-52, ago. 2003.

JACKSON, W. M. et al. Differentiation and regeneration potential of mesenchymal progenitor cells derived from traumatized muscle tissue. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 15, n. 11, p. 2377-88, nov. 2011.

JANKOWSKI, R. J.; DEASY, B. M.; HUARD, J. Muscle-derived stem cells. **Gene therapy**, v. 9, n. 10, p. 642-7, maio. 2002.

JAZEDJE, T. et al. Human fallopian tube mesenchymal stromal cells enhance bone regeneration in a xenotransplanted model. **Stem cell reviews**, v. 8, n. 2, p. 355-62, jun. 2012.

JIMI, E. et al. The current and future therapies of bone regeneration to repair bone defects. **International journal of dentistry**, v. 2012, p. 148261, jan. 2012.

KARAGEORGIOU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-91, set. 2005.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 18, n. 2, p. 129-38, abr. 2012.

KIMELMAN, N. et al. Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. **Tissue engineering**, v. 13, n. 6, p. 1135-50, jun. 2007.

LAINO, G. et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. **Journal of cellular physiology**, v. 206, n. 3, p. 693-701, mar. 2006.

LAJTHA, L. G. Stem cell concepts. **Nouvelle revue française d'hématologie**, v. 21, n. 1, p. 59-65, jan. 1979.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science (New York, N.Y.)**, v. 260, n. 5110, p. 920-6, 14 maio. 1993.

LEE, J. Y.; MUSGRAVE, D. et al. Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 83-A, n. 7, p. 1032-9, jul. 2001.

LEE, Y. M.; SEOL, Y. J. et al. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. **Journal of biomedical materials research**, v. 54, n. 2, p. 216-23, fev. 2001.

MA, L. et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e51777, jan. 2012.

MANKANI, M. H. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 9, p. 2140-9, set. 2006.

MAO, J. J. et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. **Journal of dental research**, v. 85, n. 11, p. 966-79, nov. 2006.

MARESCHI, K. et al. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. **Haematologica**, v. 86, n. 10, p. 1099-100, out. 2001.

MASTROGIACOMO, M.; DERUBEIS, A. R.; CANCEDDA, R. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. **Journal of cellular physiology**, v. 204, n. 2, p. 594-603, ago. 2005.

MEINEL, L. et al. Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow. **Annals of biomedical engineering**, v. 32, n. 1, p. 112-22, jan. 2004.

MESZAROS, L. B. et al. Effect of host sex and sex hormones on muscle-derived stem cell-mediated bone formation and defect healing. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 17-18, p. 1751-9, set. 2012.

MIURA, M. et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 10, p. 5807-12, 13 maio. 2003.

MUSGRAVE, D.; PRUCHNIC, R. Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. **Journal of Bone & …**, v. 84, n. 1, p. 120-7, jan. 2002.

NAKAHARA, H. et al. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 259, p. 223-32, out. 1990.

NIEMEYER, P. et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells in a non-autogenous setting for bone regeneration in a rabbit critical-size defect model. **Acta biomaterialia**, v. 6, n. 3, p. 900-8, mar. 2010.

NOURBAKHSH, N. et al. Induced in vitro differentiation of neural-like cells from human exfoliated deciduous teeth-derived stem cells. **The International journal of developmental biology**, v. 55, n. 2, p. 189-95, jan. 2011.

OSHITA, K. et al. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegerin production. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 6, p. 1658-1667, jun. 2011.

PAGNI, G. et al. **Bone repair cells for craniofacial regeneration.Advanced drug delivery reviews**, set. 2012.

PENG, H. et al. Synergistic enhancement of bone formation and healing by stem cell–expressed VEGF and bone morphogenetic protein-4. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 6, p. 751-759, 15 set. 2002.

PINTO, J. G. S. Enxerto autógeno x biomateriais no tratamento de fraturas e deformidades faciais–uma revisão de conceitos atuais. **Revista da Faculdade …**, 2010.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, 2 abr. 1999.

PLACHOKOVA, A. S. et al. **Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects.Clinical oral implants research**, abr. 2007.

POTTER, J. K.; ELLIS, E. Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 62, n. 10, p. 1280-97, out. 2004.

RAUH, J. et al. Bioreactor systems for bone tissue engineering. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 17, n. 4, p. 263-80, ago. 2011.

RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J. et al. Tissue engineering with dental pulp stem cells: isolation, characterization, and osteogenic differentiation. **The Journal of craniofacial surgery**, v. 23, n. 6, p. e571-5, nov. 2012.

ROOHANI-ESFAHANI, S. I. et al. Repairing a critical-sized bone defect with highly porous modified and unmodified baghdadite scaffolds. **Acta biomaterialia**, v. 8, n. 11, p. 4162-72, nov. 2012.

ROOSA, S. M. M. et al. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 92, n. 1, p. 359-68, jan. 2010.

ROSS, M. H. et al. Histologia: Texto e Atlas: em Correlação Com Biologia Celular e Molecular. **Guanabara Koogan,** 6. ed, Rio de Janeiro, 2012, 1008p.

ROUWKEMA, J.; RIVRON, N. C.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Vascularization in tissue engineering. **Trends in biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 434-41, ago. 2008.

RUBIO, D. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. **Cancer research**, v. 65, n. 8, p. 3035-9, 15 abr. 2005.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299-308, abr. 1986.

SECCO, M. et al. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. **Stem cell reviews**, v. 5, n. 4, p. 387-401, dez. 2009.

SEO, B. M. et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral diseases**, v. 14, n. 5, p. 428-34, jul. 2008.

SEONG, J. M. et al. Stem cells in bone tissue engineering. **Biomedical materials (Bristol, England)**, v. 5, n. 6, p. 062001, dez. 2010.

SHAPIRO, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European cells & materials**, v. 15, p. 53-76, jan. 2008.

SHEN, H.-C. et al. Ex vivo gene therapy-induced endochondral bone formation: comparison of muscle-derived stem cells and different subpopulations of primary muscle-derived cells. **Bone**, v. 34, n. 6, p. 982-92, jun. 2004.

SITTINGER, M.; HUTMACHER, D. W.; RISBUD, M. V. Current strategies for cell delivery in cartilage and bone regeneration. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 411-8, out. 2004.

SONOYAMA, W. et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. **Journal of endodontics**, v. 34, n. 2, p. 166-71, fev. 2008.

STARK, G. B. et al. Biological wound tissue glue systems in wound healing. **Langenbecks Archiv für Chirurgie. Supplement. Kongressband. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie. Kongress**, v. 115, p. 683-8, jan. 1998.

SUN, J.-S.; WU, S. Y.-H.; LIN, F.-H. The role of muscle-derived stem cells in bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3953-60, jun. 2005.

SWIJNENBURG, R.-J. et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. **Circulation**, v. 112, n. 9 Suppl, p. I166-72, 30 ago. 2005.

SZPALSKI, C. et al. Bone tissue engineering: current strategies and techniques--part I: Scaffolds. **Tissue engineering. Part B, Reviews**, v. 18, n. 4, p. 246-57, ago. 2012.

TAMAKI, Y. et al. In vitro analysis of mesenchymal stem cells derived from human teeth and bone marrow. **Odontology / the Society of the Nippon Dental University**, 7 jul. 2012.

TEITELBAUM, S. L. Bone Resorption by Osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 1 set. 2000.

TETI, A. Bone development: overview of bone cells and signaling. **Current osteoporosis reports**, v. 9, n. 4, p. 264-73, dez. 2011.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 6 nov. 1998.

TOMA, J. G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nature cell biology**, v. 3, n. 9, p. 778-84, set. 2001.

TORTORA, G. J. et al. Princípios de Anatomia e Fisiologia. **Guanabara**, 12. ed, Rio de Janeiro, 2010, 1256p.

TUAN, R. S. Regenerative medicine in 2012: the coming of age of musculoskeletal tissue engineering. **Nature reviews. Rheumatology**, v. 9, n. 2, p. 74-6, fev. 2013.

VAN HOUT, W. M. M. T. et al. Reconstruction of the alveolar cleft: can growth factor-aided tissue engineering replace autologous bone grafting? A literature review and systematic review of results obtained with bone morphogenetic protein-2. **Clinical oral investigations**, v. 15, n. 3, p. 297-303, jun. 2011.

WINKLER, J.; HESCHELER, J.; SACHINIDIS, A. Embryonic stem cells for basic research and potential clinical applications in cardiology. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1740, n. 2, p. 240-8, 30 maio. 2005.

WRIGHT, V. et al. BMP4-expressing muscle-derived stem cells differentiate into osteogenic lineage and improve bone healing in immunocompetent mice. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 6, n. 2, p. 169-78, ago. 2002.

YAMAZA, T. et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Stem cell research & therapy**, v. 1, n. 1, p. 5, jan. 2010.

YE, X. et al. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in beta-tricalcium phosphate scaffolds. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 18, n. 7, p. 545-56, jul. 2012.

YIN, P. et al. Osteoblastic cell response on biphasic fluor-hydroxyapatite/strontium-substituted hydroxyapatite (FHA/SrHA) coatings. **Journal of biomedical materials research. Part A**, 27 mar. 2013.

ZHANG, Z.-Y. et al. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. **Biomaterials**, v. 33, n. 9, p. 2656-72, mar. 2012.

ZHENG, Y. et al. Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **Journal of dental research**, v. 88, n. 3, p. 249-54, mar. 2009.

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

ZVAIFLER, N. J. et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. **Arthritis research**, v. 2, n. 6, p. 477-88, jan. 2000.