

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ALEXANDRE AUGUSTO FERREIRA DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO FOSFATO  
INCORPORADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO, OBTIDAS DE  
DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS, EM DEFEITOS DE CALVÁRIA  
DE RATOS**

ALFENAS/MG

2021

**ALEXANDRE AUGUSTO FERREIRA DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO FOSFATO  
INCORPORADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO, OBTIDAS DE  
DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS, EM DEFEITOS DE CALVÁRIA  
DE RATOS**

Defesa de Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivien Thiemy Sakai

ALFENAS/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

S586a Silva, Alexandre Augusto Ferreira da.  
Associação da hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato incorporados em culturas de células-tronco, obtidas de dentes decíduos esfoliados humanos, em defeitos de calvária de ratos. / Alexandre Augusto Ferreira da Silva. - Alfenas/MG, 2021.  
80 f. : il. –  
Orientador: Ronaldo Célio Mariano.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2021.  
Bibliografia.

1. Regeneração Óssea. 2. Células-Tronco. 3. Materiais Biocompatíveis. 4. Durapatita. 5. Fosfatos de Cálcio. I. Mariano, Ronaldo Célio. II. Título.

CDD-617.605

**Alexandre Augusto Ferreira da Silva**

**“ASSOCIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA E BETA-TRICÁLCIO FOSFATO INCORPORADOS EM CULTURAS DE CÉLULAS-TRONCO, OBTIDAS DE DENTES DECÍDUOS ESFOLIADOS HUMANOS, EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE RATOS”**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 08 de fevereiro de 2021

Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano -MG  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Gustavo Mendonça  
Instituição: University of Michigan, EUA

Prof. Dr. André Gustavo Paleari  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -MG



Documento assinado eletronicamente por **Ronaldo Célio Mariano, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas**, em 08/02/2021, às 18:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Mendonca, Usuário Externo**, em 08/02/2021, às 18:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andre Gustavo Paleari, Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológica**, em 08/02/2021, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0459216** e o código CRC **876B8016**.

## AGRADECIMENTOS

**A Deus.**

**Aos meus pais (*in memoriam*), Orestes e Maria**, que foram os alicerces que me proporcionaram, com muito esforço, a oportunidade de me tornar cirurgião-dentista. Muita paz para vocês. Até algum dia!

**A minha esposa Sonia Luisa e minha filha Sofia Maria** que compreenderam e apoiaram minha decisão de me afastar do nosso lar em prol do meu sonho de realizar o mestrado. A elas, que são o sentido da minha vida, minha eterna gratidão.

**Ao meu orientador, Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano**, que ainda como meu professor na graduação, assistindo a seriedade de suas aulas e sua capacidade didática, me fez apaixonar pela especialidade da Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial. Hoje, na pós-graduação, observo que sua exigência e zelo para que tudo seja realizado com dedicação, competência e respeito à prática clínica e a pesquisa científica, nortearão a continuidade da minha vida profissional. Serei sempre grato. Abraços!

**Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL** com quem tive a oportunidade de conviver e aprender, tendo sido esta experiência muito engrandecedora para minha formação. Muito obrigado mesmo! Um especial agradecimento **a minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vivien Thiemy Sakai**, responsável pelo fornecimento do biomaterial testado em nosso experimento, bem como da obtenção e cultivo das células-tronco. Sem a participação da professora Dr.<sup>a</sup>. Vivien, nosso trabalho de dissertação não teria sido possível. Agradeço o **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** pela paciência e total disponibilidade para me ensinar a fotografar as lâminas do experimento desta dissertação. Um forte agradecimento ao **Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes** e ao **Prof. Dr. Marcelo Franchin** por todas as orientações, sugestões e considerações como professores membros da banca examinadora em meu exame de qualificação. Ao Prof. Marcelo Franchin ainda agradeço pelo convívio e aprendizado, participando

com ele do projeto de extensão 'A Voz da Ciência', onde tive a oportunidade de conhecer o **Prof. Dr. Pedro Rosalen** e o **Prof. Dr. Lucas Lopardi Franco**, a quem deixo aqui o meu muito obrigado por tudo. Também não poderia deixar de agradecer o **Prof. Dr. André Gustavo Paleari** e o **Prof. Dr. Gustavo Mendonça** que como membros da banca examinadora da defesa de dissertação possibilitaram com seus argumentos um refinamento essencial ao nosso trabalho.

**Aos colegas discentes do mestrado (Thaís, Nívea, Laura, Samara, Ugo, Caio, Bruno e Leon)** com quem tive o privilégio de conviver e aprender durante todo esse tempo, compartilhando todas as suas expectativas que o futuro guarda para cada um de vocês e, tenho certeza, serão brilhantes. Um agradecimento mais que especial ao colega **Ugo Guilherme Roque Rinco**, que além de ajudar diretamente a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Vivien Thiemy Sakai no cultivo das células-tronco *in vitro*, ajudou com disposição eu e o Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano nas cirurgias dos animais durante a fase experimental.

**Aos alunos de graduação da Faculdade de Odontologia da UNIFAL** com quem tive a oportunidade de trocar experiências durante o decorrer da disciplina de Estágio Docente na Clínica de Cirurgia, em especial aos colegas **Mateus Silva Beker dos Reis** e **Vinicius Rafael Gonzaga**, pelo desenvolvimento de trabalhos integrando a graduação e a pós-graduação e, pela enorme disponibilidade e total boa vontade em auxiliar nas cirurgias e eutanásias dos animais do experimento desta dissertação.

**As secretárias Rosana Aparecida de Oliveira e Jane Sandra da Silva do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, a secretária Dayana da Mata Souza Padilha da Clínica de Cirurgia, bem como as funcionárias da Clínica de Cirurgia, Tatiana de Fátima Ferreira Herculano e Valdilene da Mata Ribeiro**, pela atenção e disponibilidade com minha pessoa durante todo o curso do mestrado.

**Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL** pela ajuda e disponibilidade durante a fase experimental da pesquisa, em especial a veterinária **Dra. Erika Kristina Incerpi Garcia**, cuja ajuda e transmissão de conhecimento em relação ao

manuseio e bem estar animal foram importantíssimo para a condução do nosso experimento.

Ao técnico em histologia **Antônio Martins dos Santos** pelo preparo das peças e confecção das lâminas, deixo aqui minha gratidão.

**Aos bibliotecários da UNIFAL** pelo suporte durante a elaboração desta dissertação. Um agradecimento especial aos **bibliotecários Ronan Lázaro Gondim** e **Fátima dos Reis Goiatá** pela ajuda e total disponibilidade.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Vários estudos têm investigado o comportamento de biomateriais no preenchimento de defeitos ósseos. A maior morbidade pós-operatória associada às restrições de áreas doadoras para enxertos ósseos autógenos e a maior demanda por procedimentos cirúrgicos menos invasivos têm trazido para o mercado de enxertias ósseas diferentes biomateriais com composições variadas. As biocerâmicas à base de fosfato de cálcio bifásico (BCP) compostas por hidroxiapatita (HA) associada ao beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) têm sido uma alternativa ao enxerto ósseo autógeno com características semelhantes aos componentes da matriz óssea. Este estudo *in vivo* investigou o efeito da incorporação de células-tronco originadas da polpa de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), nos grânulos de BCP quando utilizados como material de preenchimento de defeitos em calvárias de ratos adultos metabolicamente normais. Um defeito de tamanho crítico de 6 mm de diâmetro, por animal, foi realizado nas calvárias de 50 ratos. Foram utilizados grânulos de BCP com 60% de HA e 40% de  $\beta$ -TCP com tamanho médio de 250 a 420  $\mu$ m que foram incorporados a SHED cultivadas durante 7 dias em meio de cultura convencional (MC) ou meio de cultura osteogênico (MO). Os animais foram divididos em 5 grupos com 10 animais cada: coágulo (CO), osso autógeno (AUT), BCP, BCP + SHED em MC (BCP-MC) e BCP + SHED em MO (BCP-MO). A eutanásia ocorreu após 4 e 8 semanas. A neoformação óssea e presença de partículas residuais do biomaterial foram avaliadas por meio da histometria e o processo inflamatório crônico através de uma análise histológica qualitativa. A menor neoformação óssea foi observada no grupo CO para 4 e 8 semanas sem diferença significativa entre os períodos ( $p = 0,9996$ ). O grupo AUT teve a maior média em neoformação óssea e foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) de todos os outros grupos após 8 semanas e quando avaliado todo o período de estudo. Após 8 semanas os grupos BCP-MC e BCP-MO apresentaram homogeneidade em neoformação óssea ( $p = 0,1363$ ). Em todo o período do estudo o grupo BCP apresentou a maior média percentual de partículas residuais de biomaterial, porém, sendo igual estatisticamente ao grupo BCP-MC ( $p = 0,0604$ ) e diferente ( $p = 0,0104$ ) do grupo BCP-MO. Os grupos BCP-MC e BCP-MO foram iguais ( $p = 0,5920$ ) quanto a presença de partículas residuais de biomaterial. O infiltrado inflamatório crônico foi considerado discreto com 4 e 8 semanas em um transplante xenógeno de SHED para ratos sem

imunodeficiência. Assim, considerando as limitações deste estudo, concluímos que as partículas de BCP incorporadas com SHED em MC ou MO mostraram resultados homogêneos, porém, inferiores ao enxerto ósseo autólogo para o preenchimento de defeitos críticos em calvárias de ratos.

Palavras chaves: Regeneração Óssea. Células-Tronco. Materiais Biocompatíveis. Durapatita. Fosfatos de Cálcio.

## ABSTRACT

Several studies have investigated the effect of biomaterials in filling bone defects. The higher postoperative morbidity associated with donor area restrictions for autogenous bone grafts and the greater demand for less invasive surgical procedures have brought different biomaterials with different compositions to the bone grafting market. Bioceramics based on biphasic calcium phosphate (BCP) composed of hydroxyapatite (HA) associated with beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) have been an alternative to the autogenous bone graft with characteristics related to the bone components. This *in vivo* study investigated the effect of the incorporation of stem cells originated from the pulp of human exfoliated deciduous teeth (SHED), into the granules of BCP when used as a filling material in calvarial defects in metabolically normal adult rats. A critical size defect measuring 6 mm in diameter, per animal, was performed in the calvarial of 50 rats. BCP granules with 60% HA and 40%  $\beta$ -TCP with an average size of 250 to 420  $\mu$ m were used and incorporated into SHED cultured for 7 days in conventional culture medium (MC) or osteogenic culture medium (MO). The animals were divided into 5 groups with 10 animals each: clot (CO), autogenous bone (AUT), BCP, BCP + SHED in MC (BCP-MC) and BCP + SHED in MO (BCP-MO). Euthanasia occurred after 4 and 8 weeks. Bone neoformation and presence of biomaterial residual particles were assessed using histometry and the chronic inflammatory process through qualitative histological analysis. The lowest bone neoformation was observed in the CO group for 4 and 8 weeks with no significant difference between the periods ( $p = 0.9999$ ). The AUT group had the highest average in bone neoformation and was statistically different ( $p < 0.05$ ) from all other groups after 8 weeks and when the entire study period was evaluated. After 8 weeks, the BCP-MC and BCP-MO groups showed homogeneity in bone neoformation ( $p = 0.1363$ ). Throughout the study period, the BCP group had the highest percentage of residual biomaterial particles, however, it was statistically equal to the BCP-MC group ( $p = 0.0604$ ) and different ( $p = 0.0104$ ) from the BCP-MO group. The BCP-MC and BCP-MO groups were the same ( $p = 0.5920$ ) in terms of the presence of biomaterial residual particles. The chronic inflammatory infiltrate was considered mild at 4 and 8 weeks in a xenogenous SHED transplant for rats without immunodeficiency. Thus, considering the limitations of this study, we concluded that BCP particles incorporated with SHED in MC or MO showed homogeneous results,

however, inferior to the autogenous bone graft for filling critical calvarial defects in rats.

Key words: Bone Regeneration. Stem Cells. Biocompatible Materials. Durapatite. Calcium Phosphates.

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem visualizadas na microscopia de luz.....   | 32 |
| Figura 2-  | Fosfato de cálcio bifásico (BCP) - Grânulos de HA/ $\beta$ -TCP - Osteosynt®.....  | 33 |
| Figura 3-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem + grânulos de HA/ $\beta$ -TCP 1 dia após o plaqueamento. Aumento de 100X na microscopia de luz.....  | 33 |
| Figura 4-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 2. Microscópio invertido - Aumento de 100X.....  | 34 |
| Figura 5-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 2. Microscópio invertido - Aumento de 400X.....  | 35 |
| Figura 6-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 7. Microscópio invertido - Aumento de 100X.....  | 36 |
| Figura 7-  | SHED de 14 <sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 7. Microscópio invertido - Aumento de 400X.....  | 37 |
| Figura 8-  | Grânulos de HA/ $\beta$ -TCP após 7 dias incorporados a SHED cultivadas em meio de cultura convencional ou osteogênico.....  | 38 |
| Figura 9-  | Técnica cirúrgica para o preparo do defeito ósseo de tamanho crítico na calvária dos ratos.....  | 39 |
| Figura 10- | Padronização da delimitação da área total (AT) para realização da análise histométrica.....  | 41 |
| Figura 11- | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).....   | 43 |
| Figura 12- | Aumento de 400X em HE do grupo CO no período experimental de 4 semanas.....  | 44 |
| Figura 13- | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100x - HE).....  | 44 |
| Figura 14- | Osso neoformado (ON) junto ao osso nativo, com boa mineralização, circundado por tecido conjuntivo maduro com fibroblastos e osteoblastos em meio a um infiltrado inflamatório discreto no grupo AUT no período de 4 semanas (Borda do defeito. Aumento de 400X - HE)..... | 45 |
| Figura 15- | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).....  | 45 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 16-  | Osso neoformado (ON) junto à margem do defeito circundado por tecido conjuntivo contendo fibroblastos, osteoblastos e partículas residuais de BCP no período experimental de 4 semanas (Aumento de 400X - HE).....   | 46 |
| Figura 17-  | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MC no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).....   | 46 |
| Figura 18-  | Margem do defeito evidenciando pequena formação óssea circundado por tecido conjuntivo com presença de fibroblastos e osteoblastos em meio a fibras colágenas pouco organizadas no grupo BCP-MC no período experimental de 4 semanas (Aumento de 400X - HE)..... | 47 |
| Figura 19 - | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MO no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).....   | 47 |
| Figura 20-  | Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MO no período experimental de 4 semanas.....  | 48 |
| Figura 21-  | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).....   | 48 |
| Figura 22-  | Aumento de 400X em HE do grupo CO no período experimental de 8 semanas.....  | 49 |
| Figura 23-  | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).....  | 49 |
| Figura 24-  | Osso neoformado (ON) próximo à região central do defeito ósseo onde observamos a presença de osteoblastos, fibroblastos e fibras colágenas mais organizadas do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento de 400X - HE).....                        | 50 |
| Figura 25-  | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).....  | 50 |
| Figura 26-  | Osso neoformado (ON) na margem do defeito circundado por tecido conjuntivo contendo poucos fibroblastos e osteoblastos nas adjacências de partículas residuais de BCP no período experimental de 8 semanas (Aumento de 400X - HE).....                           | 51 |
| Figura 27-  | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MC no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).....   | 51 |
| Figura 28-  | Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MC no período   |    |

|            |  |    |
|------------|--|----|
|            | experimental de 8 semanas.....   | 52 |
| Figura 29- | Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MO no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE)..... | 53 |
| Figura 30- | Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MO no período experimental de 8 semanas.....                                    | 53 |
| Figura 31- | Particula de BCP envolvida por neoformação óssea após 8 semanas no grupo BCP-MO.....                               | 54 |

## LISTA DE TABELAS

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Tabela 1- | Distribuição dos animais em relação aos grupos e períodos no modelo experimental.....                             | 31 |
| Tabela 2- | Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AO segundo os períodos do modelo experimental..... | 55 |
| Tabela 3- | Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os grupos do modelo experimental.....                                | 57 |
| Tabela 4- | Teste de Tukey para as médias percentuais da AO segundo os grupos do modelo experimental.....                     | 57 |
| Tabela 5- | Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os períodos de avaliação do modelo experimental.....                 | 58 |
| Tabela 6- | Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos de avaliação do modelo experimental.....      | 59 |
| Tabela 7- | Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AP segundo os períodos do modelo experimental..... | 60 |
| Tabela 8- | Análise de variância (ANOVA) para AP segundo os grupos do modelo experimental.....                                | 62 |
| Tabela 9- | Teste de Tukey para as médias percentuais da AP segundo os grupos do modelo experimental.....                     | 62 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Gráfico 1- | Representação gráfica das médias percentuais da AO e do desvio padrão nos diferentes grupos, considerando os períodos de avaliação do modelo experimental..... | 55 |
| Gráfico 2- | Representação gráfica das médias percentuais da AO e do desvio padrão nos diferentes grupos em todo o período do modelo experimental.....                      | 56 |
| Gráfico 3- | Representação gráfica das médias percentuais da AP e do desvio padrão nos diferentes grupos, considerando os períodos de avaliação do modelo experimental..... | 61 |
| Gráfico 4- | Representação gráfica das médias percentuais da AP e do desvio padrão nos diferentes grupos em todo o período do modelo experimental.....                      | 61 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |  |
|-----------------|--|
| ANOVA           | Análise de variância                                 |
| AO              | Área de osso   |
| AP              | Área de partículas                                   |
| AT              | Área total   |
| BCP             | Fosfato de cálcio bifásico                           |
| BFGF            | Fator de crescimento básico de fibroblastos          |
| CaP             | Fosfato de cálcio                                    |
| CaSr            | Proteína receptora sensível ao cálcio                |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                   |
| E.D.T.A         | Ácido etilenodiaminotetracético                      |
| HA              | Hidroxiapatita                                       |
| HE              | Hematoxilina e Eosina                                |
| HMSC            | Células-tronco mesenquimais humanas da medula óssea  |
| MC              | Meio de cultura convencional                         |
| Mesh            | Unidade de medida para tamanho de partícula          |
| MO              | Meio de cultura osteogênico                          |
| SHED            | Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos |
| β-TCP           | Beta-tricálcio fosfato                               |
| μl              | Microlitro   |
| μm              | Micrômetro   |

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                           | 18 |
| 2     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                | 21 |
| 3     | <b>OBJETIVO</b> .....                             | 28 |
| 4     | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                  | 29 |
| 4.1   | MODELO EXPERIMENTAL.....                          | 29 |
| 4.2   | CULTURA DE CÉLULAS.....                           | 31 |
| 4.2.1 | Plaqueamento das células.....                     | 32 |
| 4.3   | PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....                       | 38 |
| 4.4   | EUTANÁSIA.....                                    | 40 |
| 4.5   | PROCESSAMENTO DAS PEÇAS.....                      | 40 |
| 4.6   | ANÁLISE HISTOLÓGICA.....                          | 40 |
| 4.7   | ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....                         | 40 |
| 4.8   | ANÁLISE ESTATÍSTICA.....                          | 42 |
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....                           | 43 |
| 5.1   | AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS..... | 43 |
| 5.1.1 | Grupo coágulo (CO).....                           | 43 |
| 5.1.2 | Grupo autógeno (AUT).....                         | 44 |
| 5.1.3 | Grupo BCP.....                                    | 45 |
| 5.1.4 | Grupo BCP-MC.....                                 | 46 |
| 5.1.5 | Grupo BCP-MO.....                                 | 47 |
| 5.2   | AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS..... | 48 |
| 5.2.1 | Grupo coágulo (CO).....                           | 48 |
| 5.2.2 | Grupo autógeno (AUT).....                         | 49 |
| 5.2.3 | Grupo BCP.....                                    | 50 |
| 5.2.4 | Grupo BCP-MC.....                                 | 51 |
| 5.2.5 | Grupo BCP-MO.....                                 | 52 |
| 5.3   | ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....           | 54 |
| 5.3.1 | Área de neoformação óssea.....                    | 54 |
| 5.3.2 | Área de partículas residuais do biomaterial.....  | 60 |
| 6     | <b>DISCUSSÃO</b> .....                            | 64 |

|   |                         |    |
|---|-------------------------|----|
| 7 | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | 73 |
|   | <b>REFERÊNCIAS.....</b> | 74 |
|   | <b>ANEXO.....</b>       | 80 |

## 1 INTRODUÇÃO

A involução do aparelho mastigador, no aspecto do periodonto de sustentação, caracteriza-se pela perda óssea manifestada em função de fatores fisiológicos e patológicos. A perda dentária desencadeia um processo de reabsorção óssea dos rebordos alveolares alterando de forma significativa as dimensões em altura e largura, chegando a inviabilizar a inserção de próteses suportadas por implantes osseointegrados (SCHROPP *et al.*, 2013; SALVI *et al.*, 2018; CHEN; DARBY, 2020).

Atrofias do rebordo alveolar, portanto, apresentam-se atualmente como as maiores restrições para os métodos reabilitadores na era da implantodontia. E as cirurgias reconstrutivas ósseas tomam suas indicações para devolver um contorno com dimensões mínimas do rebordo alveolar para garantir posição otimizada dos implantes dentários (SESMA *et al.*, 2012; TRAN *et al.*, 2016).

As técnicas de reconstrução dos tecidos ósseos exigem a aplicação de princípios básicos para conseguir uma adequada osteogênese. O “padrão ouro” tido como modalidade de tratamento de defeitos ósseos para se garantir qualidade de osteogênese é o enxerto ósseo autógeno. Entretanto, a reconstrução óssea com esses enxertos está associada às desvantagens severas como morbidade do sítio doador, forma e tamanho limitados de material, custos extras e necessidade de hospitalização em muitos casos severos (KHOJASTEH; MOTAMEDIAN, 2016; MENDES *et al.*, 2016; JAFARI *et al.*, 2017). Portanto, pesquisadores tentam encontrar métodos alternativos de regeneração óssea. Um dos métodos propostos envolve o uso de substitutos ósseos em conjugação com células-tronco para fornecer um material de enxerto projetado com características semelhantes às dos enxertos ósseos autógenos (KHOJASTEH *et al.*, 2015; MOTAMEDIAN *et al.*, 2015).

Assim, opções alternativas para resolver esses problemas por engenharia de tecido ósseo têm surgido. Materiais biocompatíveis para uso como substitutos ósseos ou arcabouços estão sendo desenvolvidos. Mas além da importante propriedade da estrutura de biocompatibilidade, o arcabouço deve permitir neovascularização e suporte para adesão de células semeadas, seguida da proliferação e diferenciação celular. Além disso, os arcabouços devem se degradar adequadamente e os produtos metabolizados precisam ser não tóxicos e absorvíveis por mecanismos fisiológicos. As propriedades mecânicas devem

suportar forças ou funções repetitivas. Os arcabouços também precisam ser estruturas tridimensionais porosas que possuam uma rede de poros com tamanhos adequados e interconectados de modo que o fluido e nutriente passem para permitir o crescimento de células através dos suportes (SALGADO *et al.*, 2004). Arcabouços tridimensionais fabricados pela técnica de deposição por estiramento e multicamadas por fusão, especificamente desenhados para a regeneração de tecido ósseo, foram desenvolvidos por Wongsupa *et al.* (2017) e foram confeccionados para terem as propriedades mecânicas apropriadas, redes porosas interconectadas e um padrão caracterizado por microsulcos ou ranhuras para favorecer a adesão celular, bem como as funções celulares osteogênicas.

A empresa *Eincobio*, localizada na cidade de Belo Horizonte - MG - Brasil, desenvolve materiais granulados com seus grânulos em diversos tamanhos de partículas isoladamente, desde a mais grossa até a mais fina. Informa que cada grama do material granulado tem a capacidade de absorção de aproximadamente 0,7ml de substâncias orgânicas, promovendo a osteogênese sem o uso de substâncias exógenas. Pode ainda ser misturado com outras substâncias, quando indicado, como, por exemplo: sangue ou osso medular, plasma rico em plaquetas, proteínas recombinantes humanas tipo II, ou conduzir e liberar substâncias como antibióticos.

Os grânulos apresentados pela empresa acima citada é uma associação balanceada dos seus principais componentes - hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP). Esta associação permite um equilíbrio entre o tempo de reabsorção do material pelo organismo, de reconstituição do osso e da manutenção da resistência mecânica, já que tem uma fase mais estável representada pela HA, que é reabsorvida mais lentamente, e uma fase mais solúvel proporcionada pelo  $\beta$ -TCP, que é menos estável e reabsorvida mais rapidamente. Desta forma, o profissional e o paciente contam com diferentes apresentações para encontrar uma solução específica caso a caso. As proporções de HA e  $\beta$ -TCP disponibilizadas no mercado pela *Eincobio* apresentam taxa de reabsorção e estabilidades diferentes:

a) 80% de HA e 20% de  $\beta$ -TCP apresentam maior estabilidade e reabsorção mais lenta;

b) 60% de HA e 40%  $\beta$ -TCP proporcionam média estabilidade e reabsorção também média;

c) 20% de HA e 80% de  $\beta$ -TCP possibilitam menor estabilidade e reabsorção mais rápida.

A lógica de usar biomateriais à base de fosfato de cálcio (CaP), como a HA e o  $\beta$ -TCP, é sua similaridade química com os componentes dos minerais ósseos (TANAKA *et al.*, 2017; HERNIGOU *et al.*, 2017). Roberts *et al.* (2011) estudaram a capacidade de formação óssea de células derivadas do periósteo humano combinadas com fosfatos de cálcio *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram que o CaP pode suportar a adesão, proliferação, diferenciação dos osteoblastos e, eventualmente, promover a cicatrização óssea. A combinação de HA e  $\beta$ -TCP produz fosfato de cálcio bifásico (BCP) não apenas para biodegradação equilibrada, mas também para bioatividade melhorada (BOSE; TARAFDER, 2012). Os grânulos de BCP podem atuar como portadores potenciais para a cicatrização óssea guiada por células (LOMELINO *et al.*, 2012).

As células-tronco dos dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) originam-se da crista neural embrionária como células-tronco mesenquimais. Elas são auto-renováveis, possuem taxas altas de proliferação com aumento da duplicação da população de células e apresentam capacidade imatura de multi-diferenciação. Células-tronco oriundas da polpa de dentes permanentes ou SHED podem exercer aplicações terapêuticas promissoras na prática clínica em vários níveis além do escopo do sistema estomatognático. Devido às suas robustas capacidades angiogênicas, neurogênicas, osteogênicas e odontogênicas, vários tecidos apresentam potencial para serem regenerados, como a polpa dentária e o osso, entre outros. A engenharia de tecidos tem dedicado muita atenção para as células-tronco obtidas de dentes humanos, sobretudo pelas SHED, devido à facilidade de obtenção, plasticidade e alta capacidade de diferenciação multipotencial em vários tipos de células, tornando-as uma das fontes mais populares de células-tronco para engenharia biomédica (YANG *et al.*, 2019; CHIH-SHENG *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2020).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As alterações dimensionais dos rebordos alveolares decorrentes das perdas dentárias muitas vezes caracterizam-se como defeitos ósseos que dificultam os atuais métodos de reabilitação do complexo bucomaxilofacial. Os defeitos ósseos resultantes também de trauma, doenças neoplásicas e patológicas, periodontite e condições congênitas, juntamente com as atrofia dos rebordos alveolares são desafios comuns no tratamento reabilitador. A modalidade de tratamento “padrão ouro” desses defeitos é o enxerto ósseo autógeno. No entanto, a obtenção desses enxertos está associada a várias desvantagens, como aumento do número de sítios cirúrgicos, morbidade do sítio doador, tamanho e forma limitados, custos extras e necessidade de hospitalização (KHOJASTEH; MOTAMEDIAN, 2016; JAFARI *et al.*, 2017).

Em princípio, biocompatibilidade, propriedades biomecânicas satisfatórias e capacidade de devolver a funcionalidade ao osso, são características desejáveis aos biomateriais aplicáveis à odontologia com a função de substituir o osso autógeno nas cirurgias ósseas reconstrutivas dos maxilares antecipadamente à colocação de implantes dentários, à regeneração periodontal e à reconstrução do rebordo alveolar em fissuras labiopalatinas congênitas (FINKEMEIER, 2002; JENSEN *et al.*, 2012).

Sendo assim, os diferentes substitutos ósseos são classificados quanto ao seu mecanismo de ação em biomateriais osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Materiais osteogênicos são orgânicos e capazes de estimular a formação óssea a partir de osteoblastos e células progenitoras. Os osteoblastos e células-tronco presentes no enxerto autógeno e que sobrevivem ao processo de transplante são inicialmente os únicos responsáveis pela proliferação e formação de nova matriz osteóide. Já os osteoindutores, são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas (pluripotentes) ou osteoprogenitoras em osteoblastos nos tecidos adjacentes, estimulando assim, a formação óssea no local ou mesmo num sítio heterotípico. Por outro lado, os osteocondutores auxiliam a cicatrização através de seu arcabouço micro e macroscópico permitindo a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso como células mesenquimais indiferenciadas e osteoblastos, conduzindo o crescimento do osso e possibilitando aposição óssea do osso existente, mas não induzem a formação óssea

(LOURENÇO, 2002; GUIANNOUDIS; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO, *et al.*, 2010; OGUNSALU, 2011).

Os substitutos ósseos podem ser também classificados quando relacionados à sua origem em autógenos ou autólogos (quando obtidos do próprio indivíduo); homogêneo, homólogo ou aloenxerto (quando obtidos de indivíduos da mesma espécie); heterogêneo ou xenogêneo (quando obtidos de indivíduos de espécie diferente); sintéticos ou aloplásticos (que possuem origem sintética) (CARVALHO *et al.*, 2010; CONZ *et al.*, 2010; FARDIN *et al.*, 2010; OGUNSALU, 2011).

A utilização de substitutos ósseos como material de preenchimento de defeitos no complexo bucomaxilofacial tem permitido associações de produtos para agregar propriedades melhoradas para a formação óssea. Diferentes estudos tentam encontrar um método alternativo de regeneração óssea, utilizando de substitutos ósseos de origem homogênea, xenogênea ou sintética. Recentes estudos investigam a utilização de substitutos ósseos em conjugação com células-tronco para fornecer um material de enxerto projetado com características semelhantes às dos enxertos ósseos autógenos (KHOJASTEH *et al.*, 2015; MOTAMEDIAN *et al.*, 2015). A chamada medicina regenerativa baseada em células é uma das técnicas mais convincentes para tratar vários defeitos nos tecidos. Constitui um método de engenharia tecidual composto de células-tronco multipotentes e um arcabouço de biomateriais (CECCARELLI *et al.*, 2017). Espera-se que as células-tronco por ter um forte e estável potencial de diferenciação, tenham capacidade de expansão e transformação osteogênica (MIURA *et al.*, 2003; SEO *et al.*, 2008; HUANG; THESLEFF, 2013).

As células-tronco podem ser derivadas de vários tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, pele e cordão umbilical, e são isoladas e examinadas em termos de capacidade de proliferação e diferenciação celular, levando à regeneração tecidual (DE MIGUEL *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2018). Além disso, nos últimos anos, células-tronco mesenquimais derivadas de tecidos dentários têm sido estudadas devido à sua maior acessibilidade, que é considerado um fator muito importante (NAKAJIMA *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019; FERREIRA; GRECK, 2020).

Existem cinco fontes principais de células-tronco de origem dentária, podendo ser classificadas quanto a sua origem como células-tronco da polpa dentária de dentes permanentes ou decíduos, da papila apical, do ligamento periodontal e do folículo dentário. Essas células tem sido estudadas

para o tratamento da periodontite, reparo ósseo, regeneração da polpa após necrose e desenvolvimento de novos dentes. Desta forma as células-tronco de origem dentária constituem uma alternativa interessante para pesquisa e aplicação em terapias regenerativas em odontologia (ALMEIDA; CUNHA, 2016; CHIH-SHENG *et al.*, 2020).

Miura *et al.* (2003) e Seo *et al.* (2008) afirmam que as células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED) também têm a capacidade de se submeter à diferenciação osteogênica com alta eficiência. Com esta capacidade de diferenciação osteogênica, as SHED podem reconstruir um defeito de tamanho crítico na calvária de um camundongo.

Na medicina regenerativa baseada em células, a aplicação de células no local da ferida pode ser realizada de diferentes maneiras. Dentre elas, por lâminas de células, com a injeção de células dissociadas (MENASCHE *et al.*, 2001; ATALA, 2011). Também podem as células estar associadas a um arcabouço de biomateriais (OHASHI *et al.*, 2007; IWATA *et al.*, 2009; SEKIYA *et al.*, 2009).

Estudos relatam que as folhas ou camadas de células geram resultados clínicos mais eficazes, como meio de transplante de células, do que a injeção de células dissociadas sem um suporte. Na organização da folha de células, as intrincadas junções célula-célula são preservadas, as proteínas de superfície estão presentes em quantidades fisiológicas e a matriz extracelular é secretada naturalmente (MENASCHE *et al.*, 2001; ATALA, 2011).

Essas importantes propriedades biológicas não podem ser facilmente reproduzidas em sistemas baseados em arcabouços para engenharia de tecidos. Além disso, tecidos mais complexos e funcionais podem ser gerados pelo empilhamento de folhas de células compostas por diferentes tipos de células, com densidades celulares muito altos. Portanto, as folhas de células transplantadas proporcionam maior funcionalidade tecidual, regeneração tecidual mais consumada e efeitos terapêuticos aumentados, quase imediatamente, do que os transplantes monocelulares (OHASHI *et al.*, 2007; IWATA *et al.*, 2009; SEKIYA *et al.*, 2009).

Liu *et al.* (2015) demonstraram que o tratamento com ácido acetil salicílico *in vitro* melhorou as funções das SHED, incluindo uma regulação positiva na proliferação celular e osteogênese. Afirmando que o tratamento com ácido acetil salicílico pode ser uma abordagem farmacológica viável e eficiente para melhorar os efeitos terapêuticos das SHED.

Células progenitoras mesenquimais com propriedades regenerativas e imunomoduladoras foram isoladas e caracterizadas a partir da lâmina própria gengival. Estas células, em contraste com outras fontes de células progenitoras mesenquimais, são abundantes e facilmente acessíveis e obtidas através de técnicas minimamente invasivas de isolamento celular. Considerando suas semelhanças nas características culturais e genéticas com outras células progenitoras mesenquimais, as células-tronco gengivais podem ganhar inúmeras aplicações em terapias celulares e regenerativas que visam incluir o reparo de ferida de pele, regeneração de tendões e defeitos ósseos, bem como reparação periodontal e periimplantar (VENKATESH; KUMAR; ALUR, 2017).

Sakai *et al.* (2010) estudaram as SHED com o objetivo de constatarem a diferenciação destas células em odontoblastos e células endoteliais. As SHED foram cultivadas em arcabouços de tecido dentário e implantadas no subcutâneo de ratos com imunodeficiência. Desta forma, através de uma compreensão mais aprimorada dos mecanismos de odontogênese, verificou-se a efetiva diferenciação das SHED em odontoblastos funcionais e células endoteliais angiogênicas, produzindo respectivamente dentina tubular e neoformação capilar. Assim a terapia com SHED tem demonstrado um potencial muito interessante para o tratamento de dentes com inflamação pulpar irreversível ou com necrose em alternativa ao tratamento endodôntico tradicional.

Lee *et al.* (2019) estudaram *in vitro* as células-tronco mesenquimais humanas da medula óssea (HMSC) e as SHED. Ambas deram origem a calcificação *in vitro*, que indicou o potencial osteogênico dessas células. As folhas de células de HMSC e SHED expressaram os marcadores osteogênicos específicos de osso, mostrando que as células-tronco podem representar uma nova alternativa ao transplante de osso autólogo na reconstrução de defeitos ósseos como as fissuras alveolares e palatinas.

Nakajima *et al.* (2018) estudaram o transplante de células-tronco de diferentes origens em defeitos críticos de 4 mm de diâmetro em calvárias de camundongos com imunodeficiência. Foram utilizadas células mesenquimais da medula óssea, da polpa de dentes humanos permanentes e da polpa de dentes decíduos esfoliados. Estas células foram semeadas em um arcabouço constituído de uma membrana de ácido polilático e poliglicólico que preencheram os defeitos ósseos. Todas as células-tronco, de diferentes origens, foram estatisticamente semelhantes para a

regeneração óssea nos defeitos criados, porém, as células provenientes dos dentes decíduos esfoliados mostraram maiores fibras de colágeno osteóide e também com melhor distribuição na área óssea neoformada.

Mebarki *et al.* (2017) descreveram a importância de desenvolver um arcabouço com poros abertos para uma melhor adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais *in vivo*. Somente as células que permanecem aderidas ao arcabouço conseguem sobreviver *in vivo*. Os autores relatam que a sobrevivência destas células enxertadas é crucial, uma vez que elas irão participar diretamente na formação óssea. Comparando dois diferentes tipos de arcabouços, o fosfato de cálcio bifásico (HA associada ao  $\beta$ -TCP) e o osso humano processado e liofilizado, concluíram que a neoformação óssea e a adesão celular aos poros do arcabouço foram duas vezes maiores *in vitro* e *in vivo* no grupo do osso humano liofilizado quando comparado ao grupo de fosfato de cálcio bifásico, atribuindo a isto uma rede com poros mais abertos e com conteúdo de colágeno no osso humano liofilizado, sendo mais propício para adesão, proliferação e sobrevivência das células-tronco *in vivo*. Kouhestani *et al.* (2018) também demonstraram que células-tronco mesenquimais humanas da medula óssea e da polpa de dentes de terceiros molares retidos têm apresentado bons resultados *in vitro* em arcabouços de osso humano liofilizado devido sua estrutura de poros extremamente adequada para a fixação e proliferação das células enxertadas.

As SHED quando cultivadas em meio osteogênico têm potencial para se diferenciarem em células ósseas como os osteoblastos, fundamentais para a aposição de novo tecido ósseo. No entanto, para que as células-troncos possam ser transplantadas para um defeito ósseo que precisa ser reconstruído, há a necessidade da utilização de arcabouços onde estas células poderão se diferenciar em células osteogênicas. O fosfato de cálcio bifásico (BCP) que é o resultado da união da hidroxiapatita (HA) com o beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) demonstraram biocompatibilidade comprovada, osteocondutividade, segurança e previsibilidade em modelos *in vitro*, *in vivo* e clínico. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o BCP pode ser osteoindutor. No campo da engenharia de tecidos ele representa arcabouços promissores capazes de transportar e modular o comportamento das células-tronco, criando um microambiente único que favorece a regeneração óssea (LOBO; ARINZEH, 2010).

Lobo *et al.* (2015) estudaram a resposta de células-tronco de diferentes origens, incluindo de polpa de dentes humanos, associadas a HA e o  $\beta$ -TCP em uma proporção respectivamente de 65% e 35%. Em um estudo *in vitro* verificaram que ocorreu maior adesão, proliferação e diferenciação celular em pré-osteoblastos em arcabouços de BCP no formato de grânulos com tamanhos menores, cujo diâmetro médio das partículas era de 0,6 mm. Em grânulos maiores com diâmetro médio de 1 a 1,5 mm as taxas de adesão e proliferação celular foram menores respectivamente. No entanto, os autores afirmam que estudos de longo prazo *in vivo* se fazem necessários para determinar a qualidade do tecido ósseo neoformado.

Pereira *et al.* (2019) estudaram células-tronco mesenquimais da medula óssea associadas a grânulos de BCP na proporção de HA e  $\beta$ -TCP respectivamente de 60:40 e 20:80. No modelo de estudo *in vitro* o estudo mostrou uma taxa mais alta de liberação de íons cálcio nas partículas de BCP na proporção de 20:80. Quando ambas as cerâmicas associadas às células-tronco foram implantadas no subcutâneo de camundongos foi observada uma neoformação óssea mais rápida e mineralizada, bem como uma neovascularização mais intensa nos animais que receberam o BCP na proporção de 20:80. Os autores acreditam que a liberação dos íons de cálcio pelos arcabouços de BCP são responsáveis para ativar uma proteína receptora sensível ao cálcio (CaSr) presente na superfície das células-tronco semeadas nesses arcabouços, representando assim um possível mecanismo de ossificação e angiogênese mediada por células-tronco provenientes da medula óssea.

Zheng *et al.* (2009) estudaram as células-tronco provenientes de dentes decíduos de porcos em miniatura e transplantaram-nas para um defeito de tamanho crítico na região da parasínfise mandibular. As células foram cultivadas em um arcabouço de  $\beta$ -TCP e cada porco recebeu um transplante autólogo de células-tronco associado ao biomaterial sintético. No grupo onde somente o biomaterial foi colocado foi observado uma reparação parcial do defeito ósseo após 6 meses. No grupo com células-tronco, tendo o biomaterial como arcabouço, a reparação óssea do defeito foi completa após o mesmo período de pós-operatório. Este estudo realizado em um modelo de animal grande permite testar um arcabouço de células-tronco para restauração de defeitos ósseos através de ensaios clínicos em humanos.

Chu *et al.* (2018) realizaram defeitos ósseos de tamanho crítico na tíbia de 12 cabras com 3 cm de extensão. Após o preparo do defeito a tíbia foi estabilizada

através de fixação interna rígida. Em 6 cabras a reconstrução do defeito foi realizada com somente grânulos de  $\beta$ -TCP e na outra metade foram preenchidos com associação de  $\beta$ -TCP e células-tronco provenientes da medula óssea. Cada animal recebeu as células-tronco retiradas dele mesmo caracterizando um transplante autógeno de células. Após 6 meses foi observado uma neoformação óssea significativamente maior no grupo com  $\beta$ -TCP e células-tronco e também menor quantidade de grânulos residuais de  $\beta$ -TCP no interior do defeito quando comparado com o grupo controle. Os autores concluem que as células-tronco foram capazes de proporcionar ao biomaterial estudado propriedades osteogênicas.

Apesar dos desafios enfrentados na terapia com células-tronco, o futuro deste campo é extremamente promissor. Compreensão das interações celulares envolvidas no complexo processo de regeneração óssea é fundamental para o avanço da engenharia do tecido ósseo. As propriedades regenerativas das células-tronco estão sendo exploradas para responder os problemas clínicos, além da regeneração óssea, incluindo saúde cardíaca, recuperação de derrame e doença renal, entre outras. *In vitro* os diversos tipos de origem de células-tronco apresentam resultados semelhantes no campo da regeneração óssea, entretanto, nos resultados *in vivo* permanecem variáveis a serem esclarecidas. Entendendo e minimizando variações em estudos futuros, os projetos permitirão uma maior generalização dos resultados e a tradução final destes achados para a prática clínica (HO-SHUI-LING *et al.*, 2018; LUBY *et al.*, 2019; DAHAKE *et al.*, 2020).

### **3 OBJETIVO**

Investigar o efeito da incorporação de células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), cultivadas em meio de cultura convencional ou osteogênico, nos grânulos porosos da associação de hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP), quando utilizados como material de preenchimento de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos adultos metabolicamente normais, através de análises histológicas e histométricas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o protocolo experimental foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização em Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) com o protocolo de registro nº 32/2019 (ANEXO A). Os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes institucionais e do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O presente estudo procurou contemplar a conformidade com as diretrizes ou lista de verificações *Arrive2* (PERCIE DU SERT *et al.*, 2020).

Foram utilizados 50 ratos metabolicamente normais (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com 2 a 3 meses de idade e peso entre 200 e 300 gramas (Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental.

### 4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Para o planejamento estatístico e delineamento experimental visando encontrar o número da amostra adequado segundo os grupos de tratamento e os períodos de análise, utilizou-se o software G\*Power 3.1.9.2. Através da análise de variância (ANOVA) com 2 fatores (grupos e tempo), considerando o tamanho do efeito igual a 0.5, sendo alfa igual a 5% e poder do teste de 80%, segundo os parâmetros apresentados na literatura científica, foi necessário um total de 50 animais para os cálculos estatísticos, divididos em 10 animais para os diferentes grupos e 5 animais para os diferentes períodos, com eutanásias em 4 e 8 semanas (5 animais/período/grupo). Levando em consideração o aprendizado com um estudo piloto prévio, foi escolhido um biomaterial com tamanho de partículas adequado para uma melhor acomodação e distribuição do mesmo no preenchimento dos defeitos ósseos produzidos nas calvárias dos ratos. O grupo coágulo foi considerado o controle negativo e o grupo enxerto autógeno como controle positivo por ser considerado o “padrão ouro” para as reconstruções ósseas. Uma randomização estratificada dos animais foi realizada através do editor de planilhas Microsoft Excel, levando em consideração o peso corporal. Os animais foram colocados em uma

planilha seguindo uma sequência do mais leve para o mais pesado e números aleatórios foram gerados pelo próprio programa para cada rato seguido da distribuição aleatória entre 5 grupos, sendo que cada grupo foi dividido em 2 subgrupos para análises em 4 e 8 semanas. Desta forma, os animais mais leves e mais pesados foram distribuídos de forma balanceada entre os grupos (TABELA 1) e nomeados como:

- a) grupo coágulo (CO): uma cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi realizada e preenchida com apenas o coágulo sanguíneo natural;
- b) grupo autógeno (AUT): uma cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi realizada e preenchida com osso autógeno particulado da própria calvária;
- c) grupo HA/ $\beta$ -TCP (BCP): grânulos compostos por 60% de HA e 40% de  $\beta$ -TCP com tamanho médio das partículas de 250 a 420 micras. Uma cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi realizada e preenchida com 7 mg de grânulos de HA/ $\beta$ -TCP - Osteosynt® (EINCO Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil);
- d) grupo HA/ $\beta$ -TCP + SHED MC (BCP-MC): uma cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi realizada e preenchida com 7 mg de grânulos de HA/ $\beta$ -TCP (60:40 e 250 a 420 micras) incorporados na suspensão de SHED cultivadas durante 7 dias em meio de cultura convencional;
- e) grupo HA/ $\beta$ -TCP + SHED MO (BCP-MO): uma cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi realizada e preenchida com 7 mg de grânulos de HA/ $\beta$ -TCP (60:40 e 250 a 420 micras) incorporados na suspensão de SHED cultivadas durante 7 dias em meio de cultura osteogênico.

Tabela 1 - Distribuição dos animais em relação aos grupos e períodos no modelo experimental.

| Grupo  | Material   | Nº total de animais | Nº de animais 4 semanas | Nº de animais 8 semanas |
|--------|--|---------------------|-------------------------|-------------------------|
| CO     | Coágulo sanguíneo do próprio animal  | 10                  | 5                       | 5                       |
| AUT    | Osso particulado da própria calvária do animal                                   | 10                  | 5                       | 5                       |
| BCP    | BCP 60:40 - 250 a 420 micras (Osteosynt®)  | 10                  | 5                       | 5                       |
| BCP-MC | BCP 60:40 - 250 a 420 micras (Osteosynt®) + SHED cultivadas em meio convencional | 10                  | 5                       | 5                       |
| BCP-MO | BCP 60:40 - 250 a 420 micras (Osteosynt®) + SHED cultivadas em meio osteogênico  | 10                  | 5                       | 5                       |

Fonte: Do autor.

Durante os primeiros 7 dias de pós-operatório os animais ficaram em gaiolas individuais para uma cicatrização inicial da ferida cirúrgica sem o risco de traumas produzidos por outros animais. Decorrido este período eles foram alocados em gaiolas com 5 animais em cada uma até o final do experimento. O animal que viesse a apresentar sinais de infecção na ferida cirúrgica ou a demonstrar comportamento de sofrimento incompatível com o bem estar animal seria excluído do estudo.

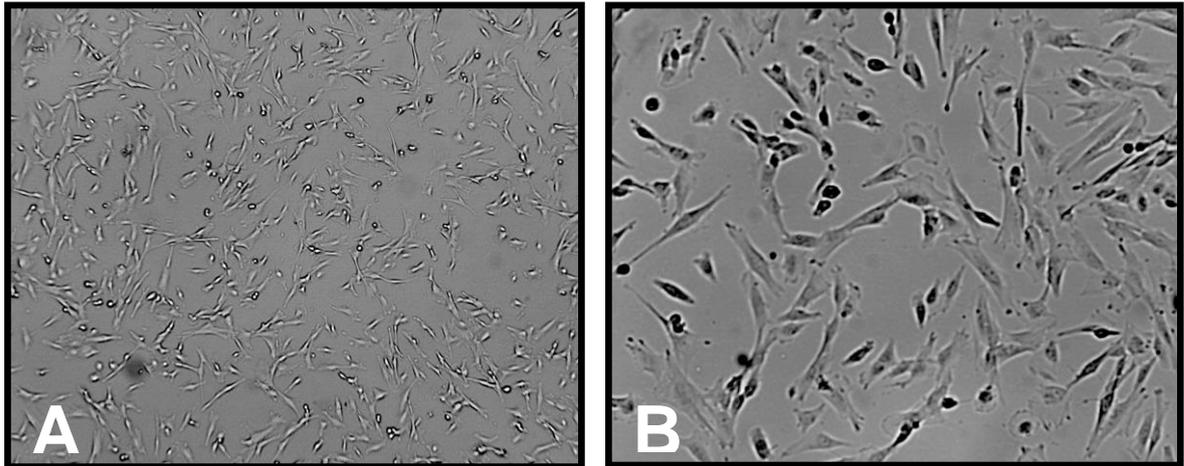
## 4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células-tronco de dentes decíduos esfoliados humanos (SHED), isoladas por digestão enzimática e caracterizadas de acordo com Miura *et al.* (2003), foram gentilmente cedidas pela Dr. Thais Marchini Oliveira (DDS, MSc, PhD, Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, SP, Brasil), após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da referida instituição (protocolo número CAAE: 88330218.6.0000.5417).

SHED foram mantidas em meio de cultura convencional (Meio Essencial Mínimo Modificado Alfa - MEM $\alpha$  - Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (*Fetal Bovine Serum, Certified, Heat-Inactivated, Gibco, Invitrogen*) e solução de penicilina e estreptomicina 1%

(*Penicillin-Streptomycin, Gibco, Invitrogen*). As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo o meio trocado a cada dois dias. Foram seguidos os protocolos para a cultura de células conforme estabelecido por Sakai *et al.* (2010). Nos experimentos, foram utilizadas SHED na 13ª a 14ª passagem (FIGURA 1).

Figura 1 - SHED de 14ª passagem visualizadas na microscopia de luz.



Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Aumento de 100X; (B) Aumento de 400X.

#### 4.2.1 Plaqueamento das células

Para o estudo *in vitro* grânulos porosos de BCP com tamanho médio de 40 a 60 mesh (250 a 420 micras) compostos por 60% de HA e 40% de  $\beta$ -TCP – Osteosynt® (EINCO Biomaterial Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) foram avaliados. Todo o biomaterial utilizado foi fornecido pelo fabricante (FIGURA 2).

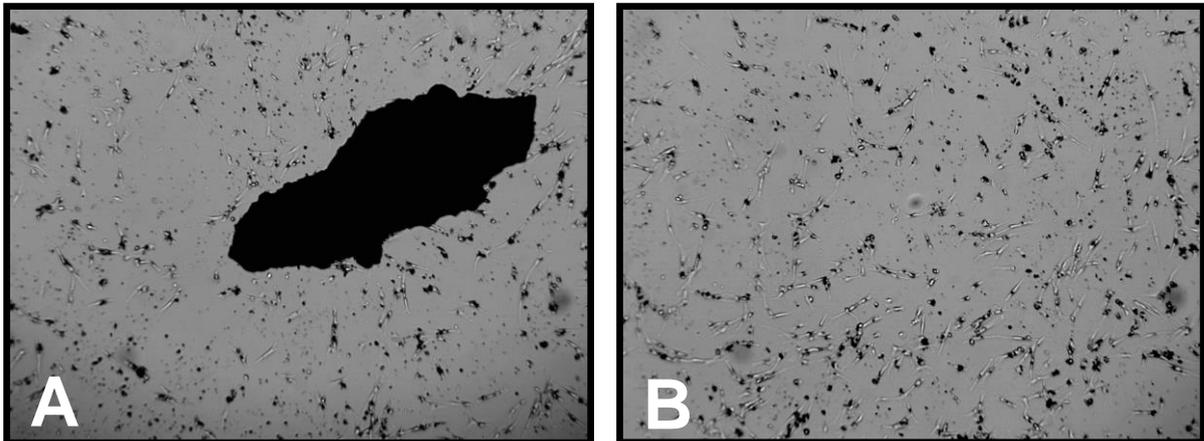
Figura 2 - Fosfato de cálcio bifásico (BCP) - Grânulos de HA/ $\beta$ -TCP - Osteosynt®.



Fonte: EINCO Biomaterial Ltda.

Foram colocados 7 mg de grânulos por poço de uma placa de 24 poços, e 500  $\mu$ l de uma suspensão de células contendo  $5 \times 10^4$  SHED foi semeada nos poços. Após o plaqueamento com meio de cultura convencional (MEM $\alpha$ ), as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até o dia seguinte, durante aproximadamente 18 horas, para se aderirem aos grânulos e/ou ao fundo dos poços (FIGURA 3).

Figura 3 - SHED de 14ª passagem + grânulos de HA/ $\beta$ -TCP 1 dia após o plaqueamento. Aumento de 100X na microscopia de luz.

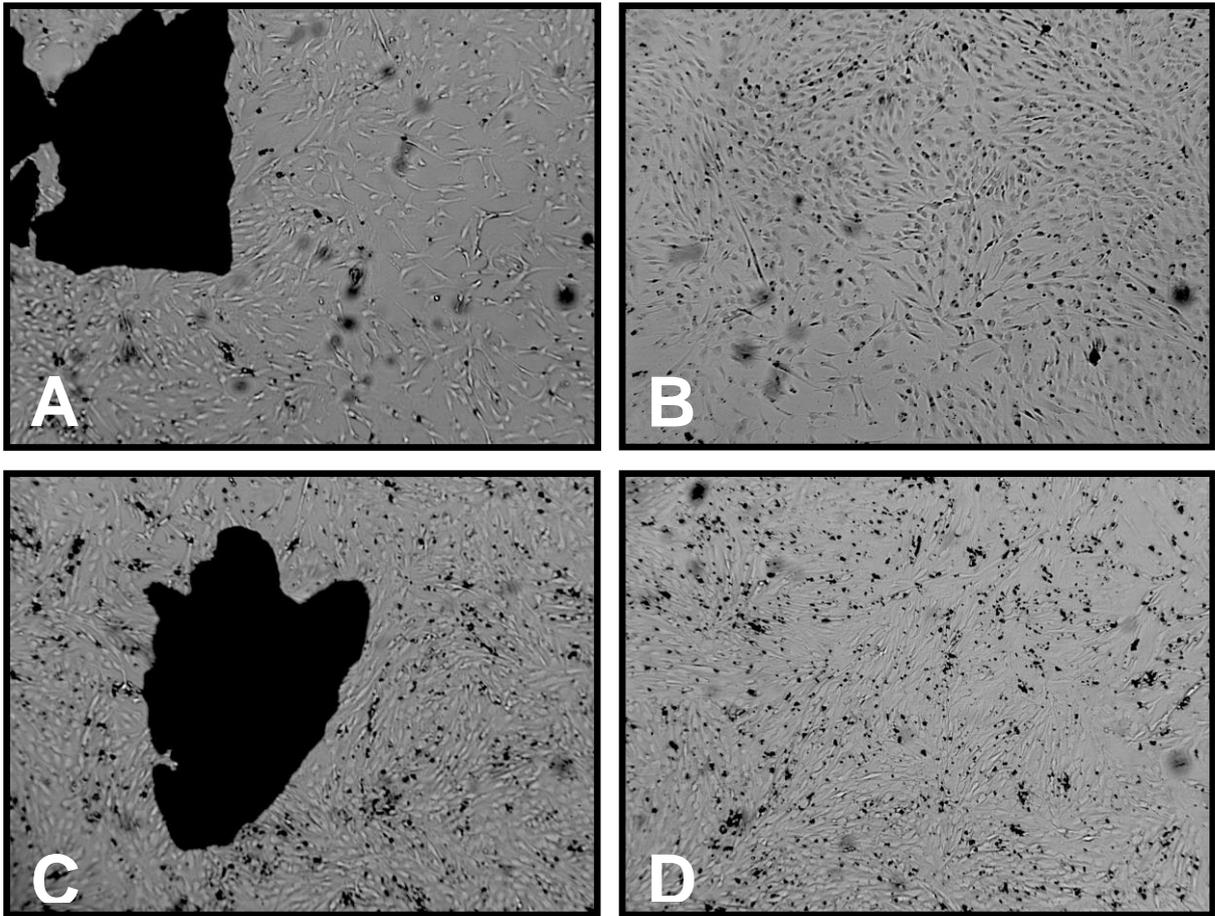


Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Área próxima ao grânulo; (B) Área distante do grânulo.

Decorrido o período de adesão das células aos grânulos e/ou ao fundo dos poços, elas foram cultivadas em meio de cultura convencional ou em meio de cultura osteogênico (*Osteogenic Differentiation Medium, Lonza Group Ltd., Basel, SWZ*) durante 7 dias, sendo trocados a cada dois dias (FIGURAS 4, 5, 6 E 7).

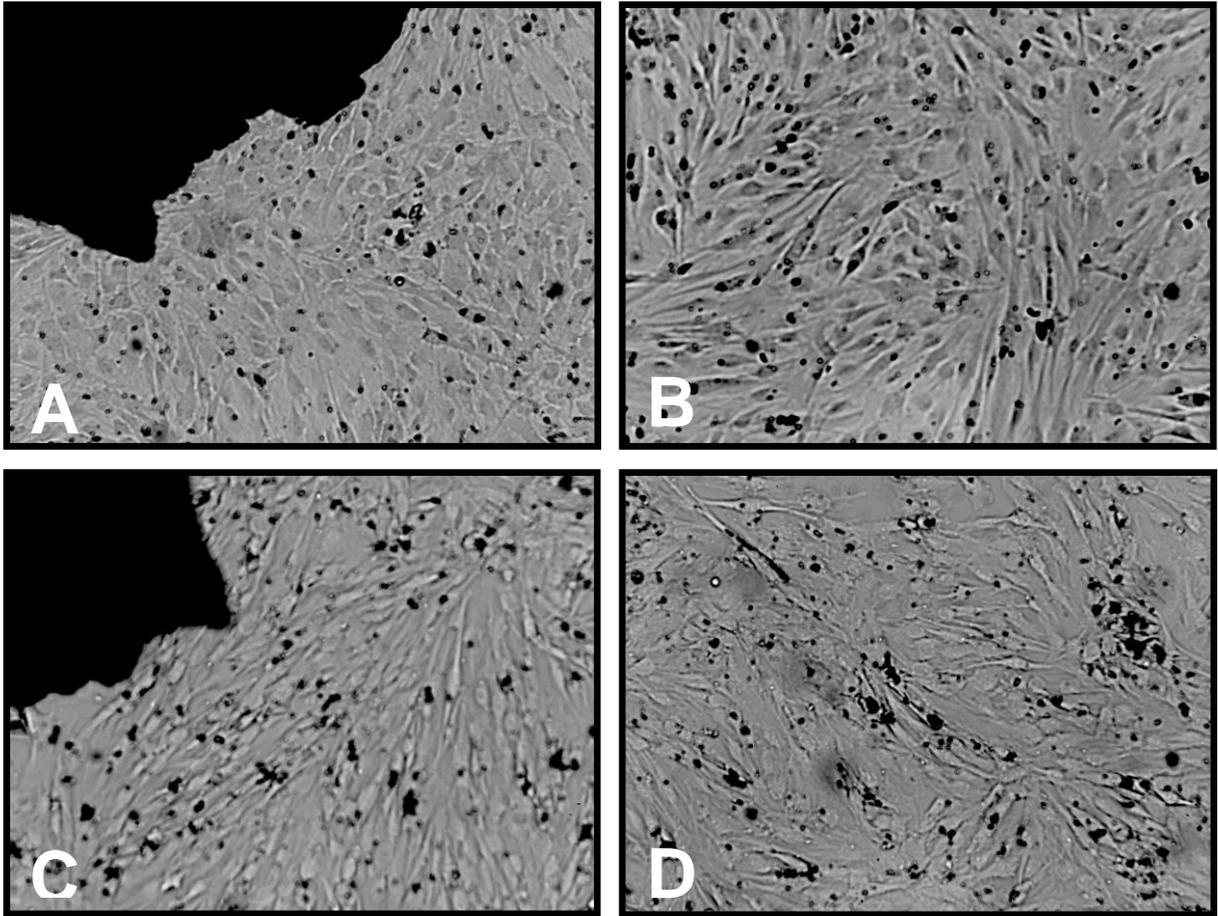
Figura 4 - SHED de 14<sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 2. Microscópio invertido - Aumento de 100X.



Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Meio de cultura convencional próximo ao grânulo; (B) Meio de cultura convencional distante do grânulo; (C) Meio de cultura osteogênico próximo ao grânulo; (D) Meio de cultura osteogênico distante do grânulo.

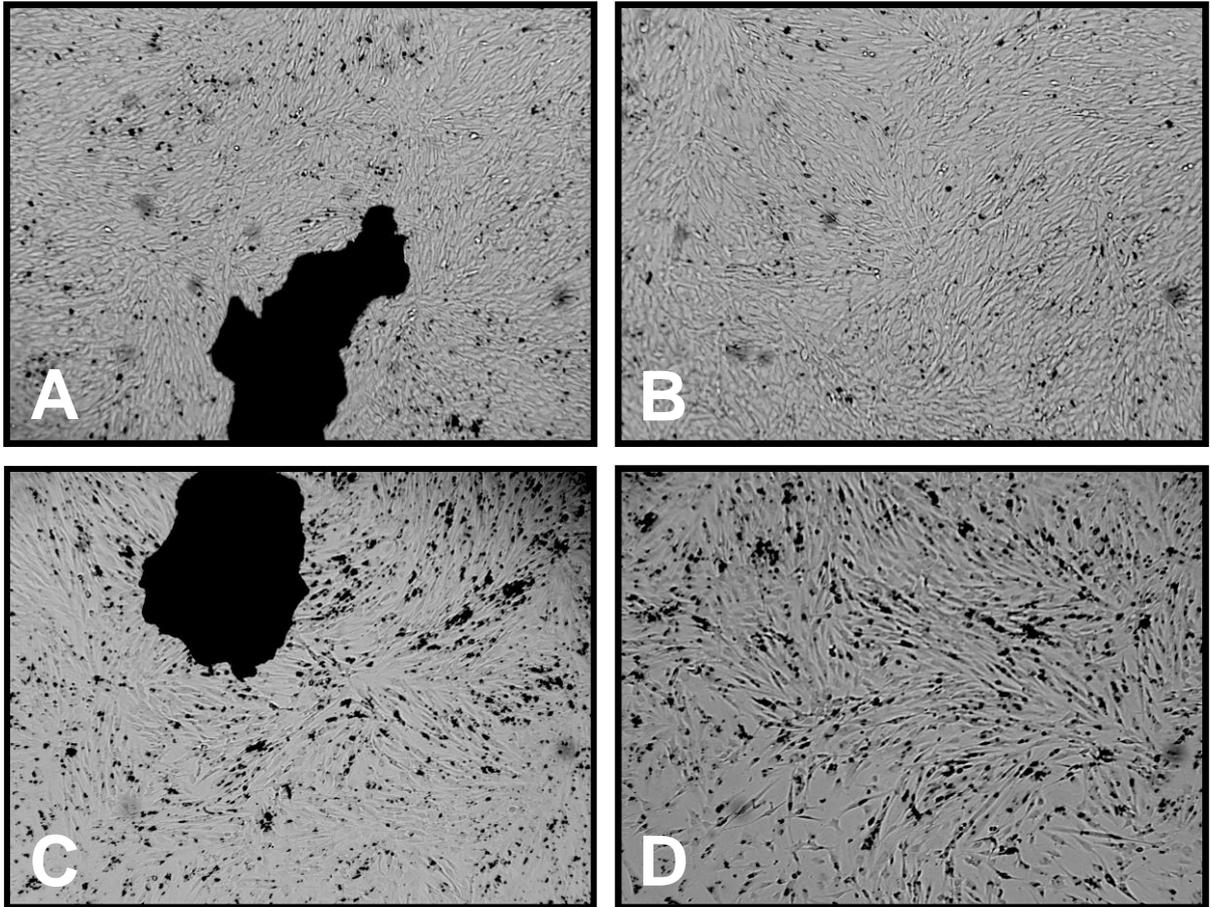
Figura 5 - SHED de 14ª passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 2. Microscópio invertido - Aumento de 400X.



Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Meio de cultura convencional próximo ao grânulo; (B) Meio de cultura convencional distante do grânulo; (C) Meio de cultura osteogênico próximo ao grânulo; (D) Meio de cultura osteogênico distante do grânulo.

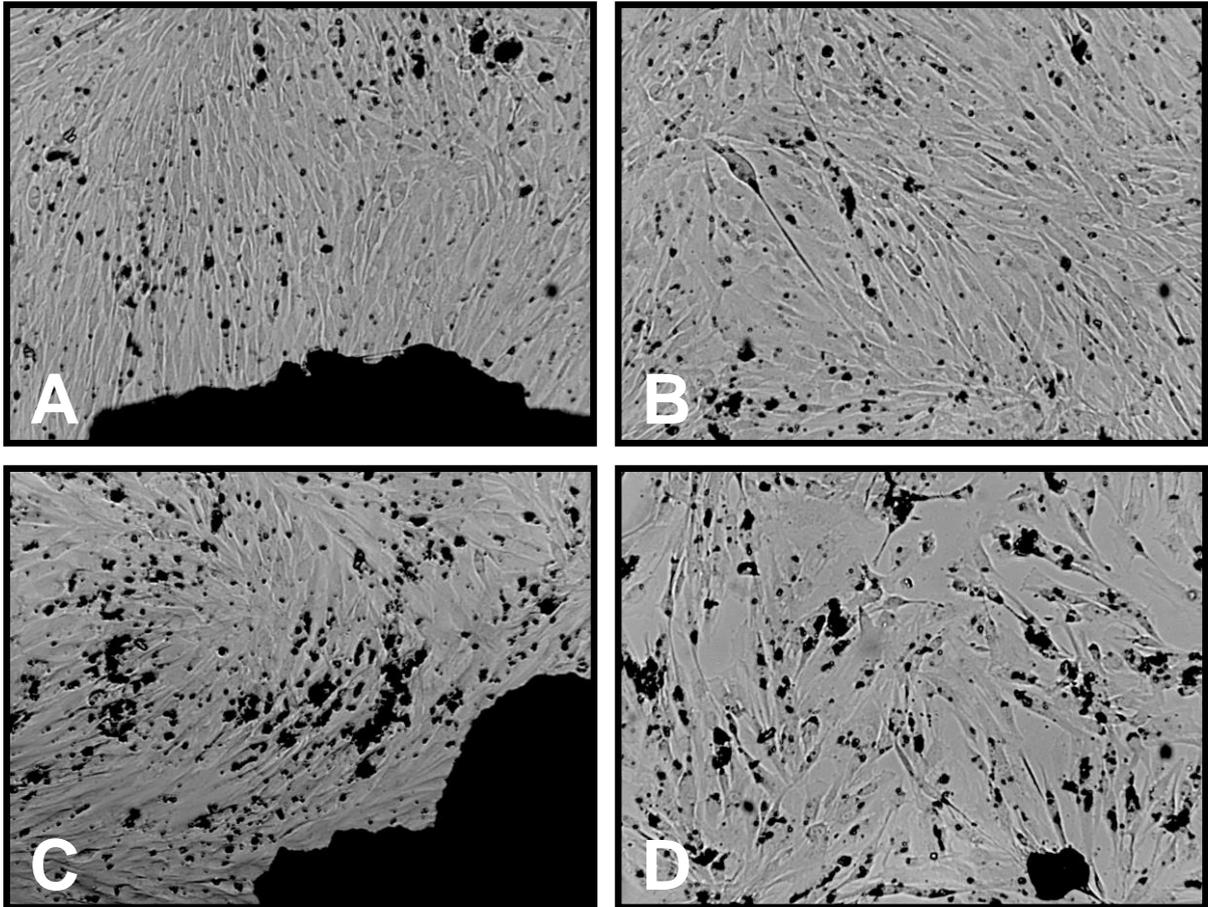
Figura 6 - SHED de 14<sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 7. Microscópio invertido - Aumento de 100X.



Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Meio de cultura convencional próximo ao grânulo; (B) Meio de cultura convencional distante do grânulo; (C) Meio de cultura osteogênico próximo ao grânulo; (D) Meio de cultura osteogênico distante do grânulo.

Figura 7 - SHED de 14<sup>a</sup> passagem + grânulos HA/ $\beta$ -TCP no dia 7. Microscópio invertido - Aumento de 400X.

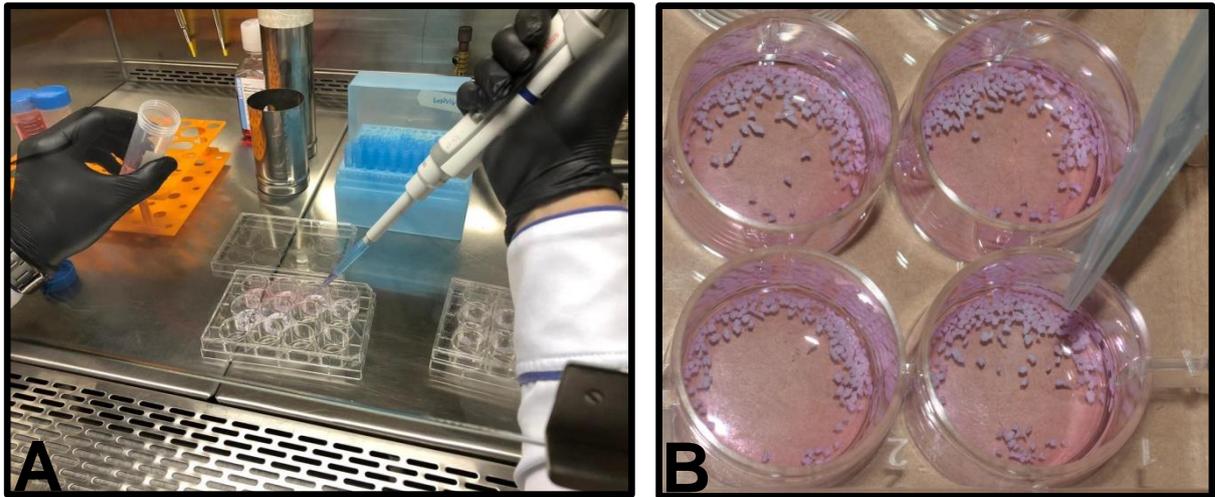


Fonte: Acervo da coorientadora.

Legendas: (A) Meio de cultura convencional próximo ao grânulo; (B) Meio de cultura convencional distante do grânulo; (C) Meio de cultura osteogênico próximo ao grânulo; (D) Meio de cultura osteogênico distante do grânulo.

Após 7 dias de cultivo, os meios de cultura foram descartados através de uma pipeta e os grânulos associados às células foram coletados com o auxílio de um descolador de Molt e levados diretamente para o preenchimento dos defeitos ósseos de tamanho crítico em calvárias de ratos (FIGURA 8).

Figura 8 - Grânulos de HA/ $\beta$ -TCP após 7 dias incorporados a SHED cultivadas em meio de cultura convencional ou osteogênico.



Fonte: Acervo da coorientadora.

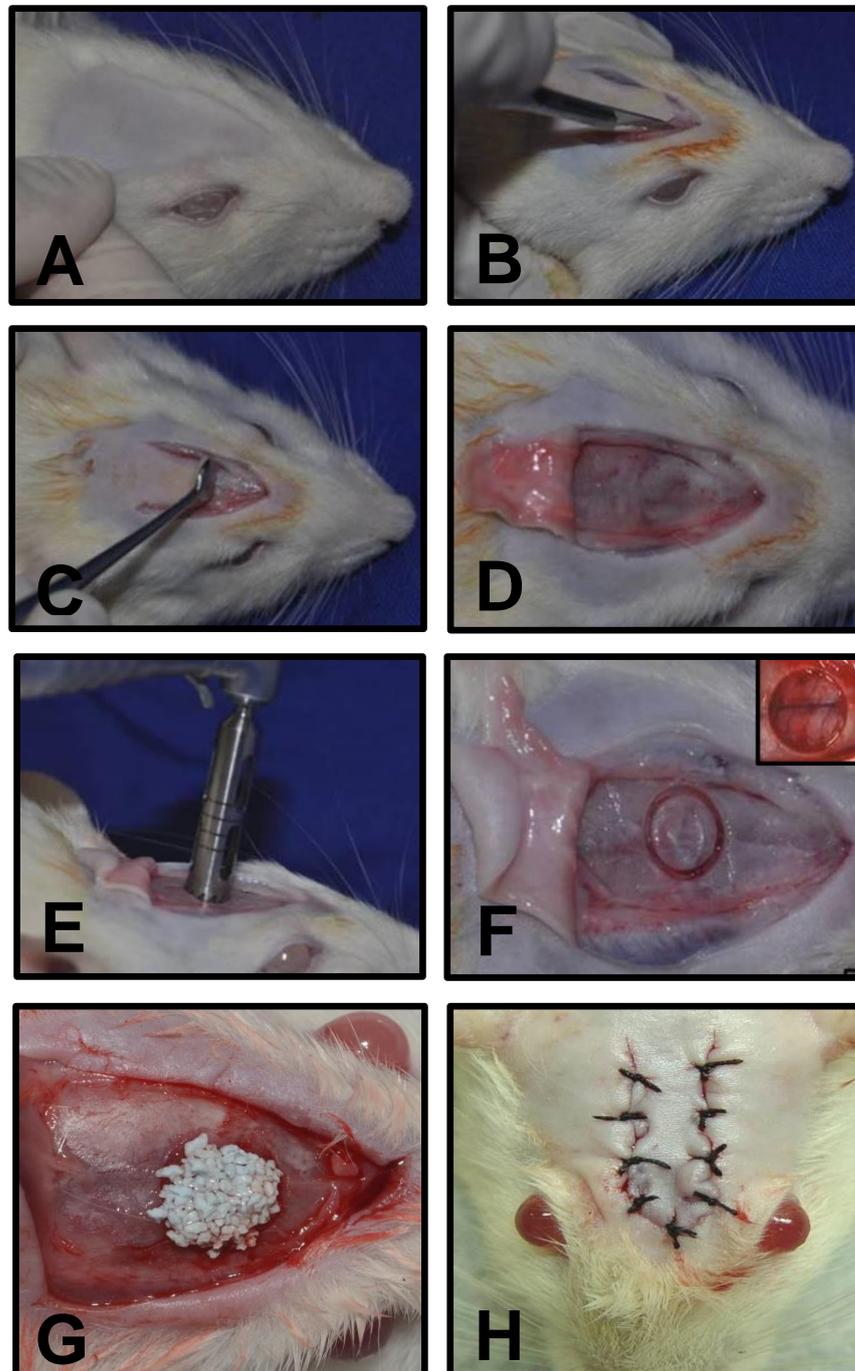
Legendas: (A) Manipulação do meio de cultura; (B) Biomaterial pronto para uso nos defeitos ósseos em calvárias de ratos.

### 4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo pesquisador. Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (6 mg/kg) e quetamina (70 mg/kg). Analgesia por injeção subcutânea com cloridrato de tramadol (12,5 mg/Kg) em dose única e profilaxia antibiótica por via intramuscular com pentabiótico veterinário 1.200.000UI (0,1 ml/Kg). Inicialmente foi realizada tricotomia na região frontoparietal da calvária dos animais e antissepsia feita com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo. A seguir, com uma lâmina de bisturi n<sup>o</sup> 15 foi realizada uma incisão em “U”, com base caudal na calvária do rato. A incisão atingiu o periósteo, permitindo o deslocamento de um retalho de espessura total em direção posterior. Com broca trefina de 6 mm de diâmetro externo (3i), acoplada em motor BLM 600 plus (Driller) e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril, foi preparado uma cavidade cirúrgica circular bicortical com 6 mm de diâmetro, com remoção da cortical externa e interna na calvária do rato com o cuidado de evitar perfuração ou lesão na dura-máter. O defeito foi realizado na região central da calvária do animal de tal forma que a sutura sagital mediana representasse o centro do defeito cirúrgico. Depois de preenchidos

os defeitos, de acordo com cada grupo, os tecidos moles foram reposicionados e suturados com suturas interrompidas simples com fio de nylon 5-0 (FIGURA 9).

Figura 9 - Técnica cirúrgica para o preparo do defeito ósseo de tamanho crítico na calvária dos ratos.



Fonte: Acervo do orientador.

Legendas: (A) Tricotomia; (B) Incisão com base caudal; (C) Divulsão de retalho total; (D) Retalho afastado; (E) Osteotomia com broca trefina de 6 mm de diâmetro externo; (F) Defeito ósseo de 6 mm de diâmetro demarcado no centro da imagem e no canto superior direito a membrana dura-máter exposta e íntegra após remoção da cortical externa e interna da calvária; (G) Preenchimento do defeito com material a depender do grupo; (H) Sutura interrompida simples com fio de nylon 5.0.

#### 4.4 EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados com 4 e 8 semanas de pós-operatório por dose excessiva de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

#### 4.5 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS

As peças obtidas dos ratos foram fixadas em formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18%. Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original representado pela sutura sagital mediana. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrometros de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (HE) para análise com microscopia de luz.

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina foram avaliados qualitativamente em microscopia óptica, observando os aspectos:

- a) qualidade e intensidade da reação inflamatória crônica desenvolvida;
- b) tipo e qualidade do tecido formado no interior do defeito cirúrgico.

#### 4.7 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Os cortes histológicos foram selecionados de maneira que o defeito cirúrgico original pudesse ser avaliado histometricamente em toda a sua extensão. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) utilizando as lentes objetivas com aumento de 10X e 40X (lente objetiva N - Achromplan) e uma lente ocular com aumento de 10X, resultando em ampliação de 100X e 400X das

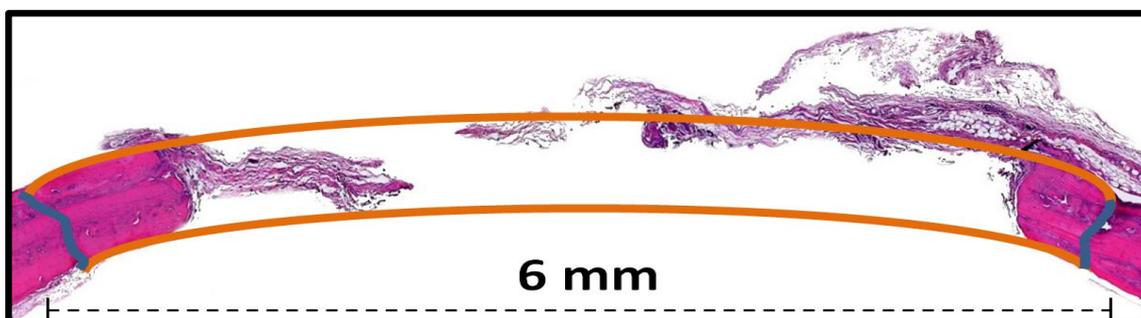
imagens capturadas salvas em um computador. A análise histométrica foi realizada com o auxílio do “*software Image J - Versão 1.51p*”. Os seguintes critérios baseados nos trabalhos de Melo *et al.* (2005) e Messoria *et al.* (2008) foram utilizados para padronizar a análise histométrica das imagens digitalizadas:

a) a área total (AT) analisada corresponde à área total do defeito cirúrgico. Esta área é determinada pela identificação das superfícies interna e externa da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies são conectadas com linhas desenhadas seguindo suas curvaturas, de tal forma que a espessura da calvária determina a altura da AT. A área de tecido ósseo neoformado, designada de área de osso (AO) e a área de partículas residuais do biomaterial, designada de área de partículas (AP) são delineadas dentro dos limites da AT (FIGURA 10).

b) a AT é medida em  $\mu\text{m}^2$  e considerada 100% da área a ser analisada. A AO e a AP são também medidas em  $\mu\text{m}^2$  e calculadas como porcentagem da AT.

A AO e AP foram representadas respectivamente pelas porcentagens da área de novo tecido osso e de partículas residuais do biomaterial em relação à AT, envolvendo os cortes histológicos localizados em toda a extensão do defeito cirúrgico original. Foram realizadas 3 mensurações, sendo cada uma em dias diferentes, para se obter a média percentual referente a cada imagem digitalizada no tocante a AT, AO e AP.

Figura 10 - Padronização da delimitação da área total (AT) para realização da análise histométrica.



Fonte: Do autor.

Notas: Considerando um comprimento total de 6 mm do defeito ósseo, utilizamos o *software Image J*, para estabelecer a área total (AT) do defeito cirúrgico. Em altura, realizamos o prolongamento das corticais externa e interna da calota craniana do rato seguindo suas curvaturas (linhas em laranja). Então é identificada a junção entre o osso nativo da calvária com a formação de novo tecido ósseo (linhas em azul). A partir desta junção dos dois lados do defeito ósseo e entre os prolongamentos das corticais externa e interna da calvária mensuramos a área de osso (AO) e a área de partículas (AP).

#### 4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância – ANOVA ( $p < 0,05$ ) para avaliar as diferenças estatísticas em relação às médias da AO e AP entre os grupos no modelo experimental. Quando a ANOVA identificou diferença significativa, o teste de Tukey a 5% de significância ( $p < 0,05$ ) foi aplicado para determinar entre quais grupos havia diferença estatística significativa. Para a realização das referidas análises foi utilizando o *software Graphpad Prism* - versão 8.4.3 para *Windows*.

## 5 RESULTADOS

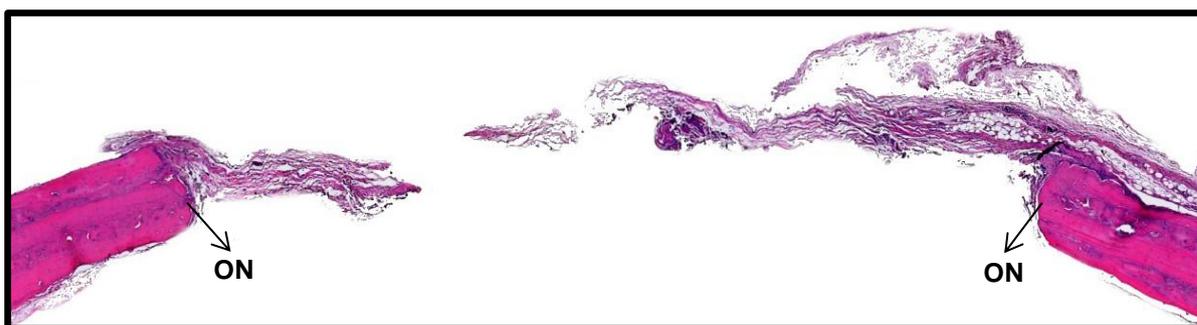
Todos os animais mantiveram-se em bom estado geral durante todo o período experimental, demonstrando boa tolerabilidade ao procedimento cirúrgico e não foi detectado presença de sinais de infecção após as intervenções.

### 5.1 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS

#### 5.1.1 Grupo coágulo (CO)

Não foi constatada a reparação óssea total do defeito cirúrgico em nenhum dos espécimes. Neoformação óssea discreta foi observada apenas nas margens do defeito (FIGURA 11 e 12). A região central do defeito mostrou espessura menor que a espessura da calvária original, sendo predominante a presença de tecido conjuntivo com um grande número de fibroblastos e poucas fibras colágenas. Infiltrado inflamatório crônico e discreto pode ser notado em algumas localizações ao longo do defeito ósseo.

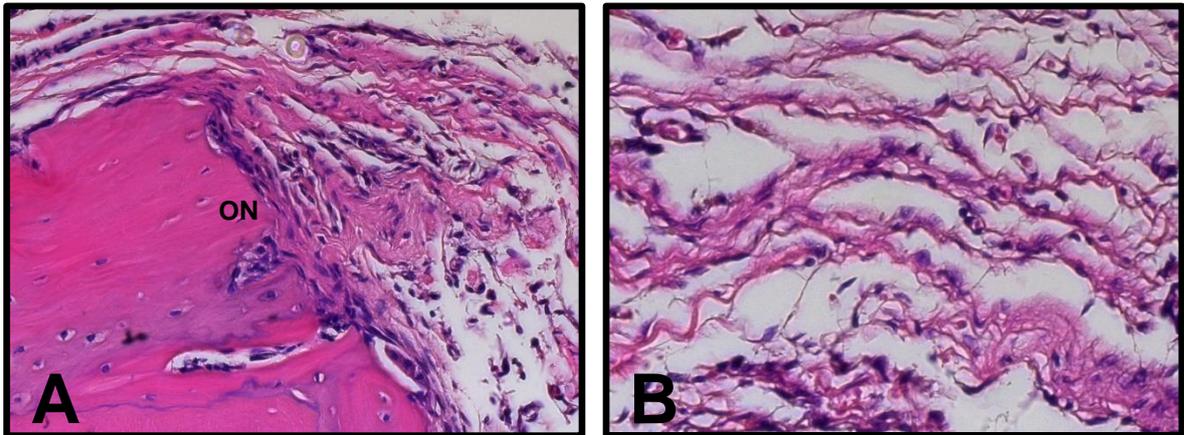
Figura 11 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Nota: (ON) Osso neoformado.

Figura 12 - Aumento de 400X em HE do grupo CO no período experimental de 4 semanas.



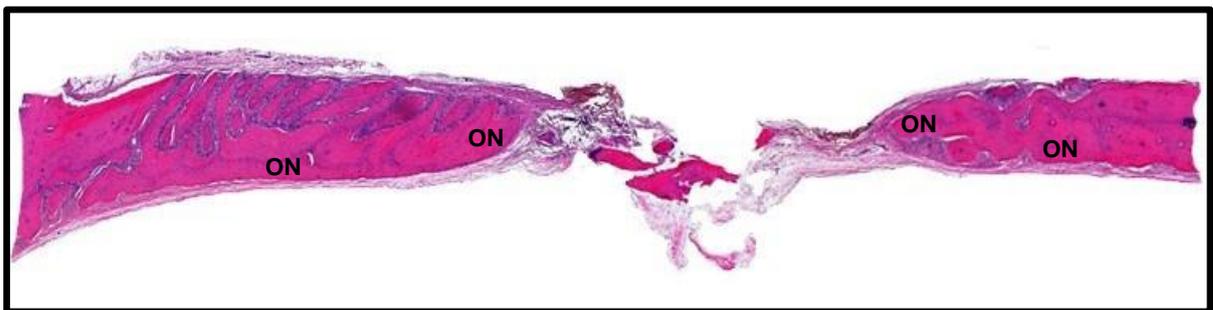
Fonte: Do autor.

Legendas: (A) Borda do defeito: pequena aposição de osso neoformado - ON e presença de infiltrado inflamatório discreto; (B) Tecido conjuntivo mostrando a presença de fibroblastos numa área de pouca formação de fibras colágenas no centro do defeito ósseo.

#### 5.1.2 Grupo autógeno (AUT)

Não foi constatada a reparação completa do defeito em nenhum espécime deste grupo, mas foi evidenciada na microscopia uma neoformação óssea a partir das bordas do defeito em direção ao centro. Observou-se na região do osso neoformado manutenção da espessura da calota craniana original (FIGURA 13). O tecido ósseo neoformado apresentou um aspecto menos denso e mais vascularizado em relação ao osso nativo da calvária, permitindo a diferenciação da interface do osso neoformado com o osso nativo, bem como presença de fibroblastos e osteoblastos (FIGURA 14).

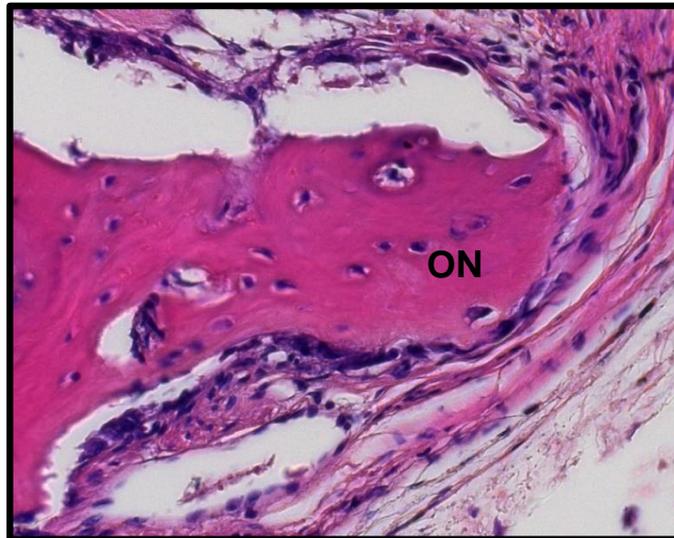
Figura 13 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Nota: (ON) Osso neoformado.

Figura 14 - Osso neoformado (ON) junto ao osso nativo, com boa mineralização, circundado por tecido conjuntivo maduro com fibroblastos e osteoblastos em meio a um infiltrado inflamatório discreto no grupo AUT no período de 4 semanas (Borda do defeito. Aumento de 400X - HE).

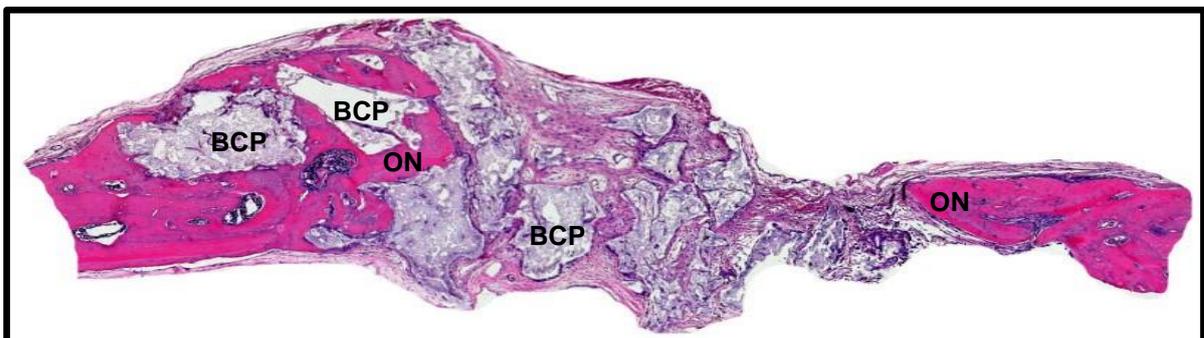


Fonte: Do autor.

### 5.1.3 Grupo BCP

Neoformação óssea foi observada somente em localizações adjacentes às margens do defeito ósseo. As partículas de BCP preenchem a maior parte do defeito (FIGURA 15), mantendo a espessura da calvária original e apresentavam-se circundadas por tecido conjuntivo contendo poucos fibroblastos com presença de matriz osteóide e osteoblastos em algumas regiões. Muitas partículas do biomaterial apresentavam invaginação de tecido conjuntivo e áreas de infiltrado inflamatório crônico não intenso foram observadas em algumas localizações (FIGURA 16).

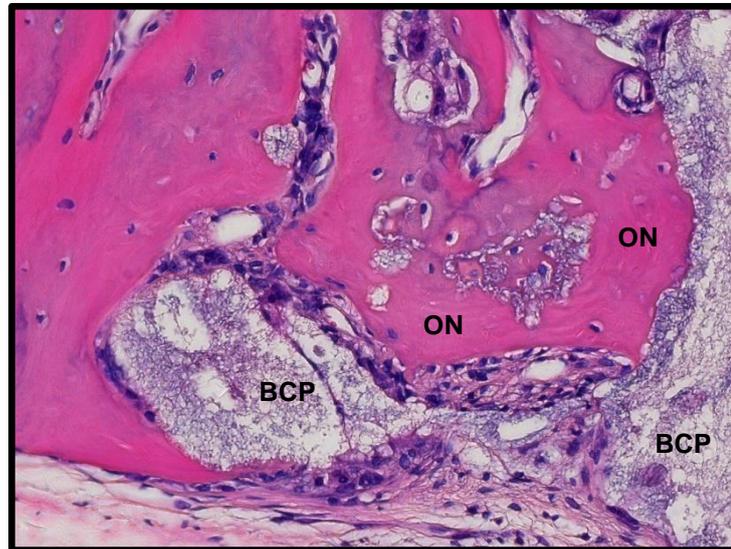
Figura 15 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 16 - Osso neoformado (ON) junto à margem do defeito circundado por tecido conjuntivo contendo fibroblastos, osteoblastos e partículas residuais de BCP no período experimental de 4 semanas (Aumento de 400X - HE).

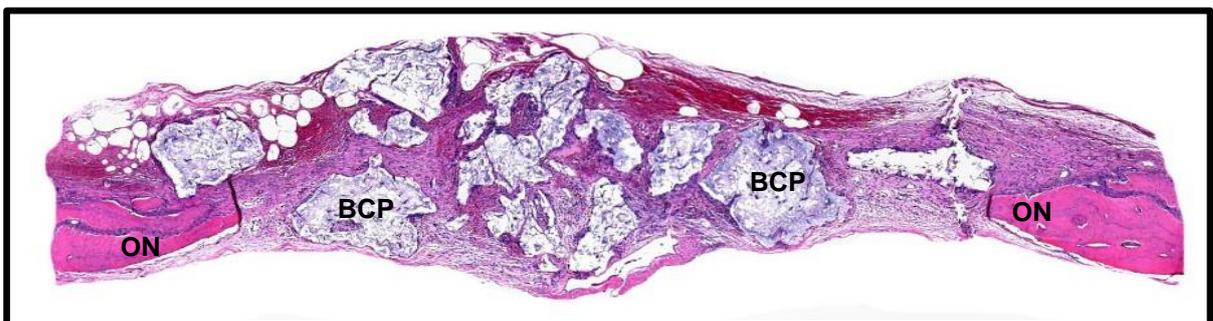


Fonte: Do autor.

#### 5.1.4 Grupo BCP-MC

A formação de novo tecido ósseo se restringiu às proximidades das margens do defeito ósseo. As partículas de BCP se localizaram ao longo do defeito mantendo a espessura da calvária e apresentavam-se circundadas por tecido conjuntivo desorganizado contendo fibroblastos e osteoblastos. Também foi constatado que muitas das partículas do material exógeno de preenchimento apresentavam invaginação de tecido conjuntivo em meio a áreas localizadas de infiltrado inflamatório crônico e discreto ao longo do defeito ósseo (FIGURAS 17 e 18).

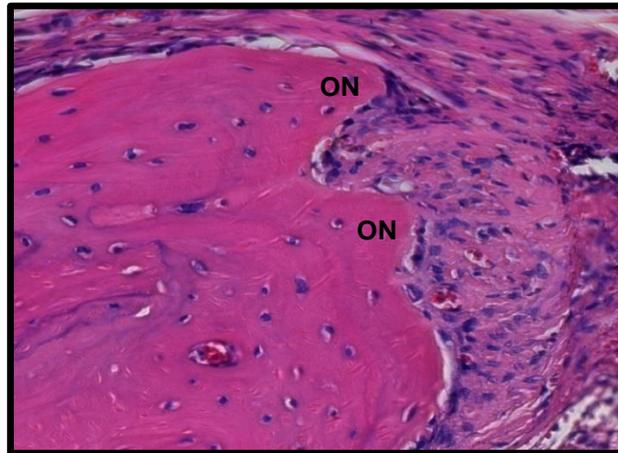
Figura 17 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MC no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 18 - Margem do defeito evidenciando pequena formação óssea circundado por tecido conjuntivo com presença de fibroblastos e osteoblastos em meio a fibras colágenas pouco organizadas no grupo BCP-MC no período experimental de 4 semanas (Aumento de 400X - HE).



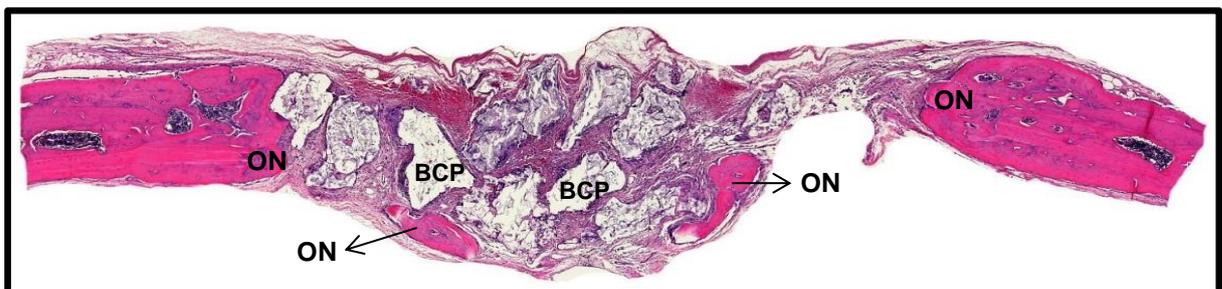
Fonte: Do autor.

Nota: (ON) Osso neoformado.

#### 5.1.5 Grupo BCP-MO

Foi observada formação de novo tecido ósseo nas proximidades das margens do defeito e em locais isolados do centro do defeito, porém, nenhum espécime teve reparação completa. As partículas de BCP se distribuíram ao longo do defeito contribuindo para a manutenção da espessura da calvária e apresentavam-se circundadas por tecido conjuntivo contendo fibroblastos e presença de matriz osteóide associadas a osteoblastos. Também foi constatado que muitas das partículas de BCP apresentavam invaginação de tecido conjuntivo em meio a áreas localizadas com discreto infiltrado inflamatório crônico (FIGURAS 19 e 20).

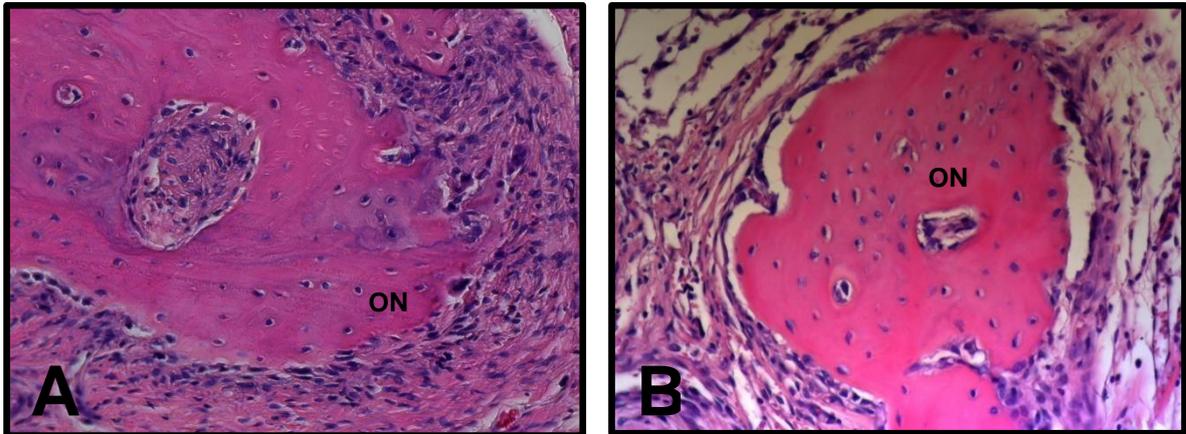
Figura 19 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MO no período experimental de 4 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 20 - Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MO no período experimental de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

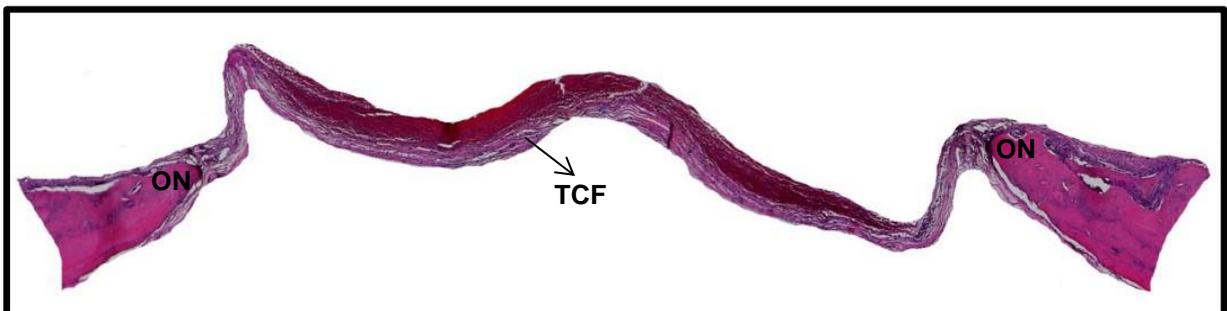
Legendas: (A) Osso neoformado - ON à margem do defeito circundado por tecido conjuntivo com presença de fibroblastos e osteoblastos; (B) Osso neoformado (ON) no centro do defeito envolvida por fibras colágenas e presença de fibroblastos e osteoblastos.

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS

### 5.2.1 Grupo coágulo (CO)

Assim como no período de 4 semanas, a área de novo osso formado após 8 semanas permaneceu restrita às margens do defeito. Um maior número de trabéculas ósseas foi verificado e o tecido ósseo apresentou-se melhor desenvolvido. Ao longo do defeito o tecido conjuntivo fibroso apresentou grande quantidade de fibras colágenas, mas com espessura menor que a da calvária original devido à falta total de tecido ósseo no centro do defeito (FIGURAS 21 e 22).

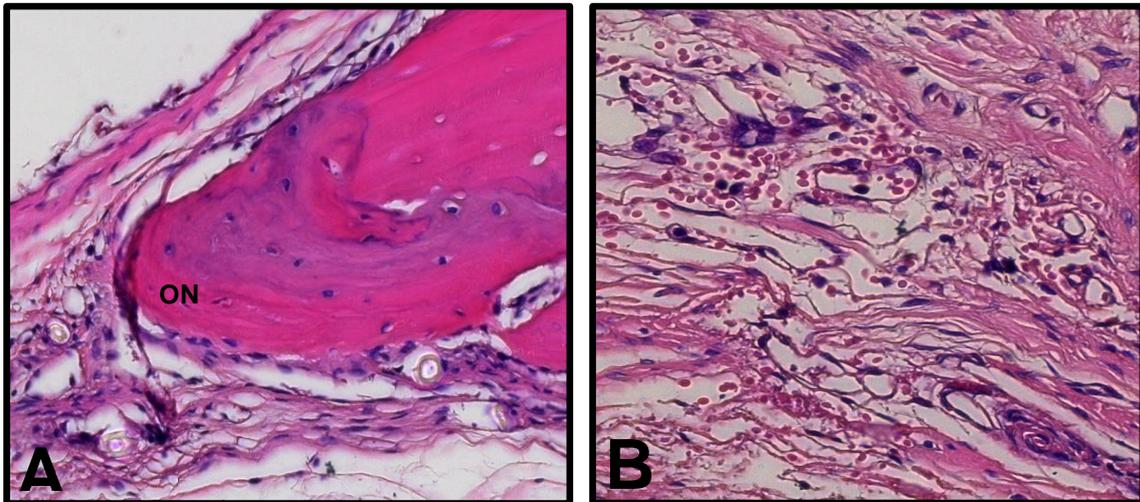
Figura 21 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CO no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (TCF) Tecido conjuntivo fibroso.

Figura 22 - Aumento de 400X em HE do grupo CO no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Legendas: (A) Osso neoformado - ON mais desenvolvido e maduro nas proximidades da borda do defeito com presença de fibroblastos e poucos osteoblastos; (B) Fibras colágenas em maior quantidade na região central do defeito ósseo.

### 5.2.2 Grupo Autógeno (AUT)

Nenhum espécime mostrou reparação completa do defeito, mas ocorreu uma neoformação óssea mais densa nas margens do defeito cirúrgico em direção ao centro com maior intensidade em relação ao período de 4 semanas, sendo que uma das margens apresentava maior neoformação óssea que a outra. A maior parte do defeito estava preenchida por novo tecido ósseo e com manutenção da espessura da calvária (FIGURA 23). Presença de osteoblastos e fibroblastos em meio a fibras colágenas mais organizadas podiam ser notados (FIGURA 24).

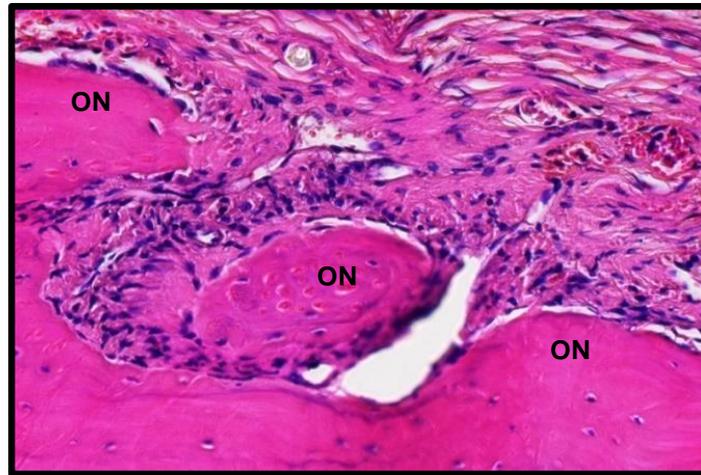
Figura 23 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Nota: (ON) Osso neoformado.

Figura 24 - Osso neoformado (ON) próximo à região central do defeito ósseo onde observamos a presença de osteoblastos, fibroblastos e fibras colágenas mais organizadas do grupo AUT no período experimental de 8 semanas (Aumento de 400X - HE).

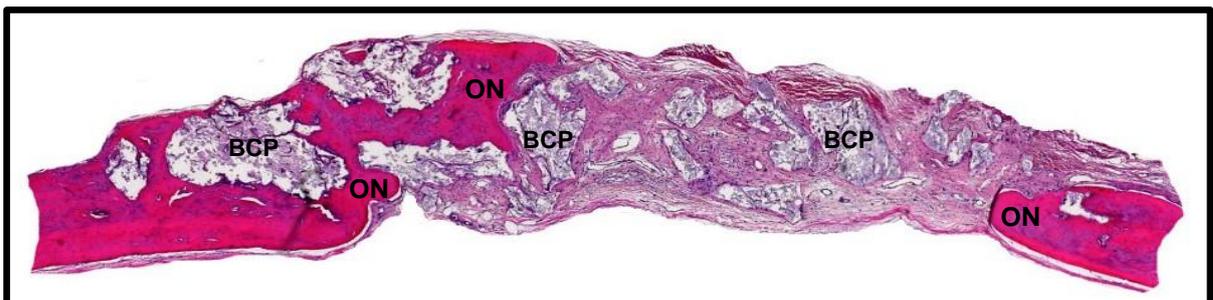


Fonte: Do autor.

### 5.2.3 Grupo BCP

A formação de novo tecido ósseo foi observada principalmente em localizações próximas às margens do defeito ósseo, contudo, houve mais formação óssea em direção ao centro do defeito, sem reparação da calvária, que no grupo BCP no período experimental de 4 semanas. A espessura da calvária foi mantida e as partículas de BCP estavam envoltas por tecido conjuntivo contendo fibroblastos com presença de poucos osteoblastos. Muitas partículas de BCP apresentavam invaginação de tecido conjuntivo como em todos os grupos que envolveram material exógeno. Áreas de infiltrado inflamatório crônico de menor intensidade foram observadas em algumas localizações (FIGURA 25 e 26).

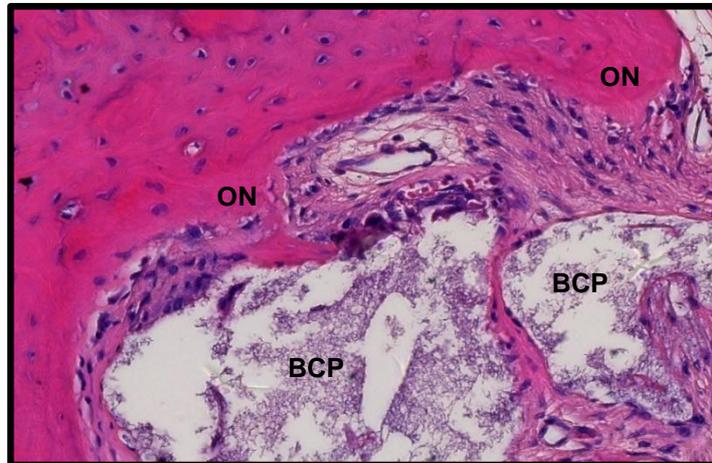
Figura 25 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 26 - Osso neoformado (ON) na margem do defeito circundado por tecido conjuntivo contendo poucos fibroblastos e osteoblastos nas adjacências de partículas residuais de BCP no período experimental de 8 semanas (Aumento de 400X - HE).

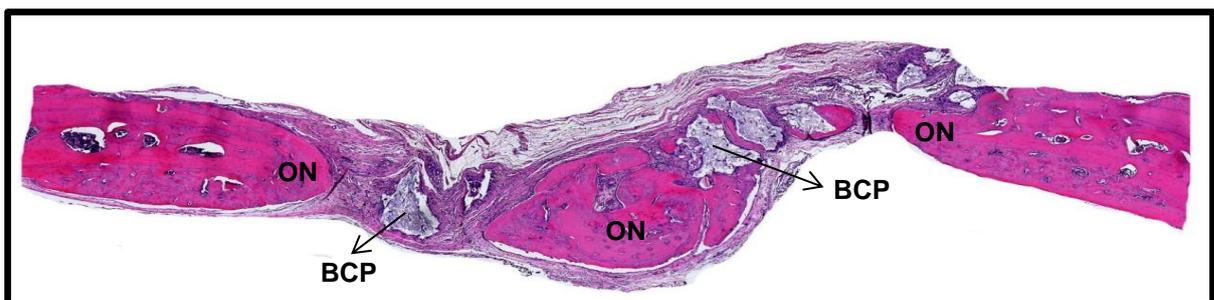


Fonte: Do autor.

#### 5.2.4 Grupo BCP-MC

Constatou-se neoformação óssea nas proximidades das margens do defeito ósseo em maior intensidade que no período de 4 semanas, bem como houve áreas de formação de novo tecido ósseo no centro do defeito, todavia, sem reparação total na calota craniana (FIGURA 27). As partículas de BCP se localizaram ao longo do defeito contribuindo junto com o osso neoformado para manter a espessura da calvária e ambos apresentavam-se circundados por tecido conjuntivo organizado contendo fibroblastos e osteoblastos. Foi observado que as partículas do biomaterial de preenchimento apresentavam invaginação de tecido conjuntivo e um discreto infiltrado inflamatório crônico, assim como no período de 4 semanas (FIGURA 28).

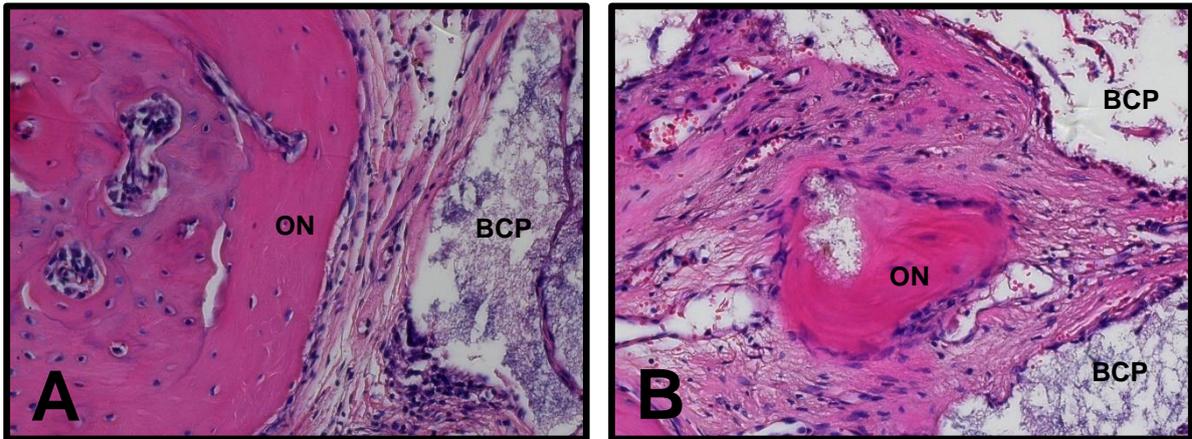
Figura 27 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MC no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 28 - Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MC no período experimental de 8 semanas.



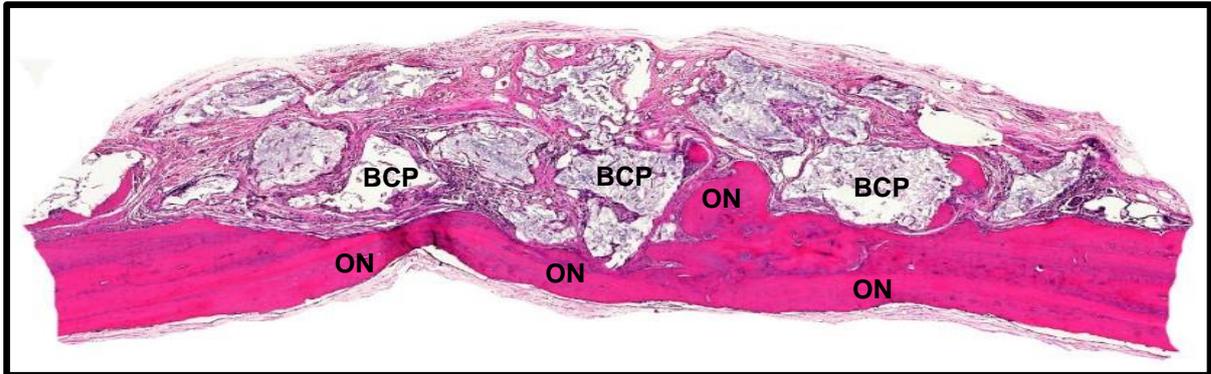
Fonte: Do autor.

Legendas: (A) Osso neoformado - ON nas bordas do defeito mostrando presença de fibras colágenas melhores organizadas com fibroblastos e osteoblastos entre partículas residuais de BCP e o novo tecido ósseo; (B) Osso neoformado - ON no centro do defeito em meio a partículas residuais de BCP envolvidas por tecido conjuntivo com fibroblastos e osteoblastos.

### 5.2.5 Grupo BCP-MO

Uma neoformação óssea mais densa foi observada nas adjacências das margens do defeito em direção ao centro e também em locais isolados do centro do defeito e em um espécime foi verificado um reparo total do defeito, no entanto, a formação de novo tecido ósseo no centro do defeito apresentava espessura inferior a calvária original, mas quando considerávamos também as partículas de BCP a espessura da calvaria estava preservada (FIGURA 29). As partículas do biomaterial apresentavam-se circundadas por tecido conjuntivo contendo muitos fibroblastos e presença de matriz osteóide associadas a muitos osteoblastos. Também foi constatado que muitas das partículas do material exógeno de preenchimento apresentavam invaginação de tecido conjuntivo e tecido ósseo neoformado pode ser observado circundando algumas partículas. (FIGURAS 30).

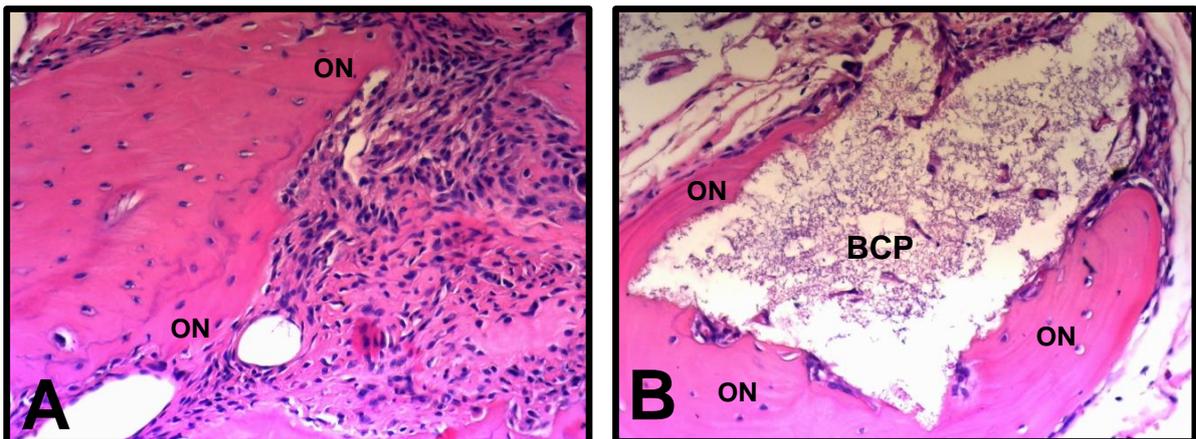
Figura 29 - Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BCP-MO no período experimental de 8 semanas (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Notas: (ON) Osso neoformado. (BCP) Partícula residual de BCP.

Figura 30 - Aumento de 400X em HE do grupo BCP-MO no período experimental de 8 semanas.

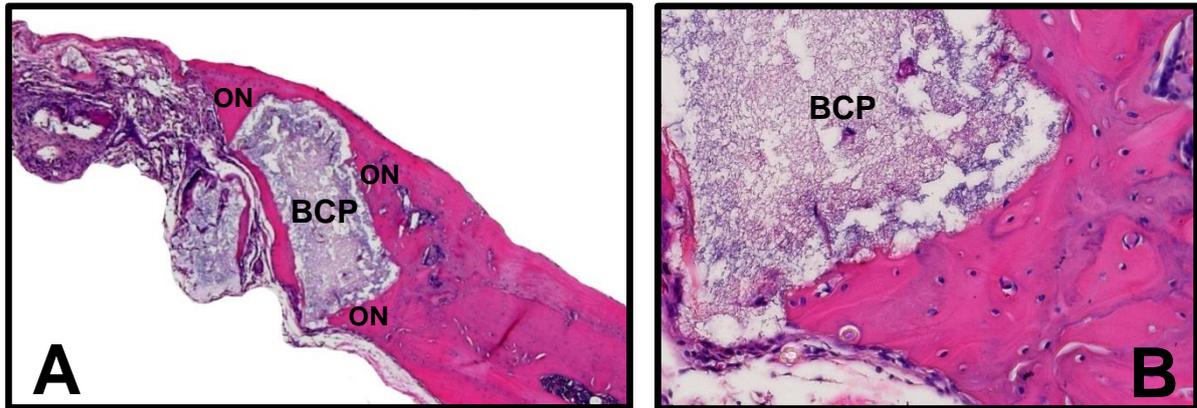


Fonte: Do autor.

Legendas: (A) Região da borda do defeito onde observamos tecido ósseo neoformado - ON envolto por um tecido conjuntivo denso e muitos fibroblastos e osteoblastos; (B) Região do centro do defeito onde verificamos uma partícula residual de BCP circundada por osso neoformado - ON.

Em ambos os grupos com grânulos de BCP, associados ou não com SHED em meio osteogênico ou convencional, nos períodos experimentais estudados de 4 e 8 semanas, as partículas do biomaterial apresentaram boa biocompatibilidade com formação de novo tecido ósseo ao redor e em íntimo contato em algumas delas, no entanto, uma grande quantidade de partículas residuais do biomaterial pode ser observado (FIGURA 31).

Figura 31 - Partícula de BCP envolvida por neoformação óssea após 8 semanas no grupo BCP-MO.



Fonte: Do autor.

Legendas: (A) Partícula de BCP na proporção de HA e  $\beta$ -TCP de respectivamente 60:40 com tamanho médio dos grânulos de 250 a 420  $\mu$ m envolvida por osso neoformado - ON (Aumento de 100X - HE); (B) Mesma partícula descrita na figura A, onde observamos uma boa biocompatibilidade e osteocondução, mas baixa capacidade de reabsorção da mesma após um tempo de metabolismo ósseo suficiente para uma maturação adequada do mesmo (Aumento de 400X - HE).

### 5.3 ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

#### 5.3.1 Área de neoformação óssea

A percentagem de formação óssea levando-se em conta a AT (área total do defeito) e AO (área de osso) de cada espécime segundo os períodos e grupos experimentais serviram para o cálculo das médias percentuais e desvio padrão da histometria da AO (TABELA 2). Podemos verificar que a maior média percentual de formação óssea tanto no período de 4 e 8 semanas foi encontrada no grupo AUT, correspondendo respectivamente a 41,23% e 81,51%. A menor média percentual foi observada no grupo CO para 4 e 8 semanas com médias respectivamente de 16,53% e 20,09% e sem diferença estatística significativa ( $p = 0,9996$ ) (TABELA 6). Este resultado encontrado no grupo CO, que representou o controle negativo, reforça que o defeito bicortical na calvária de 6 mm pode ser considerado um defeito de tamanho crítico.

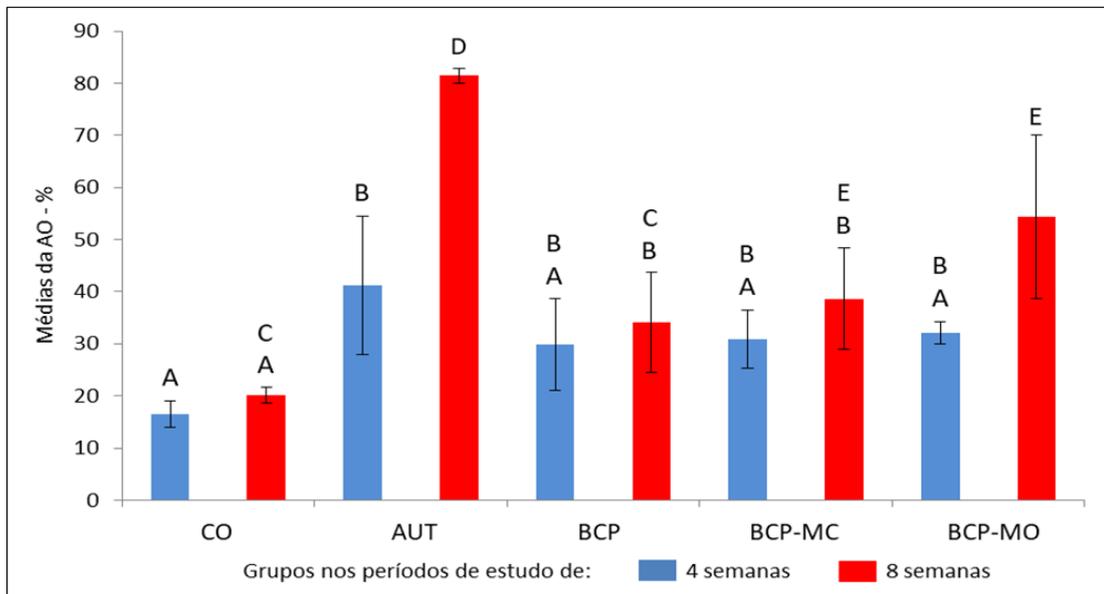
Tabela 2 - Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AO segundo os períodos do modelo experimental.

|        |   | 4 semanas |               | 8 semanas |       |               |
|--------|---|-----------|---------------|-----------|-------|---------------|
| Grupo  | n | AO        | Desvio padrão | n         | AO    | Desvio padrão |
| CO     | 5 | 16,53     | 2,5424        | 5         | 20,09 | 1,5172        |
| AUT    | 5 | 41,23     | 13,2580       | 5         | 81,51 | 1,4100        |
| BCP    | 5 | 29,88     | 8,8463        | 5         | 34,11 | 9,6050        |
| BCP-MC | 5 | 30,85     | 5,6385        | 5         | 38,60 | 9,7211        |
| BCP-MO | 5 | 31,96     | 2,1622        | 5         | 54,38 | 15,6650       |

Fonte: Do autor.

O Gráfico 1 ilustra respectivamente as médias percentuais da AO nos diferentes grupos, considerando os períodos de estudo de 4 e 8 semanas. O Gráfico 2 mostra as médias percentuais da AO nos diferentes grupos em todo período de estudo.

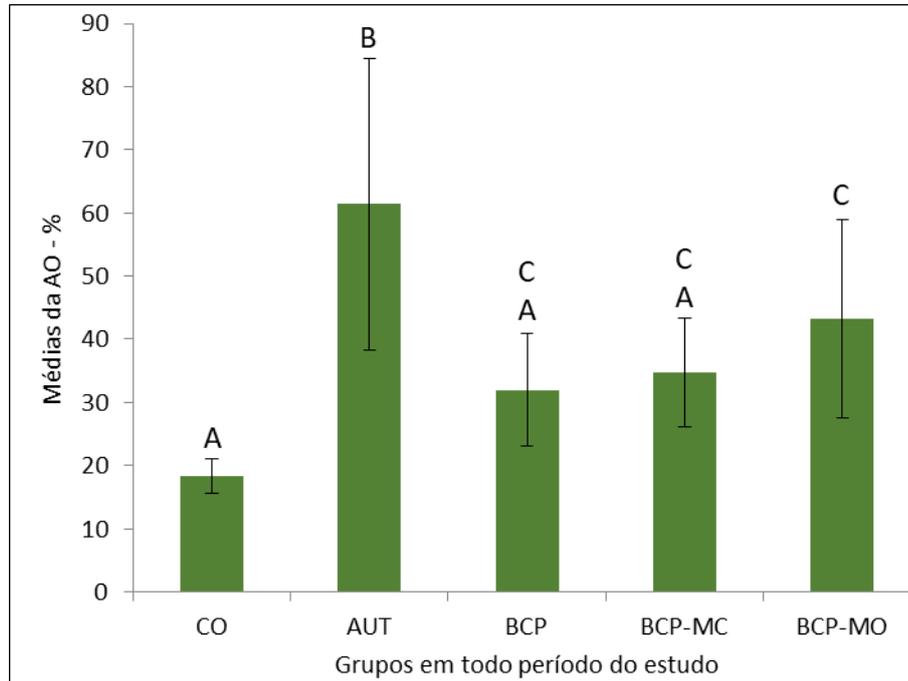
Gráfico 1 - Representação gráfica das médias percentuais da AO e do desvio padrão nos diferentes grupos, considerando os períodos de avaliação do modelo experimental.



Fonte: Do autor.

Notas: Teste de Tukey a 5% de significância. As verificações de presença ou ausência de homogeneidade são feitas dentro do mesmo grupo nos diferentes períodos de estudo de 4 e 8 semanas e também entre grupos diferentes no mesmo período de análise. Letras iguais em grupos ou períodos de estudo demonstram médias homogêneas do ponto de vista estatístico ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 2 - Representação gráfica das médias percentuais da AO e do desvio padrão nos diferentes grupos em todo o período do modelo experimental.



Fonte: Do autor.

Notas: Teste de Tukey a 5% de significância. (B) significa que o grupo AUT obteve média superior estatisticamente diferente dos demais grupos ( $p < 0,05$ ); (A) e (C) significam grupos homogêneos do ponto de vista estatístico ( $p > 0,05$ ).

Após a submissão dos dados de histometria da AO dos diferentes grupos do modelo experimental à análise de variância (ANOVA), levando em consideração todo o período do estudo, foi observada diferença estatística entre os dados ( $\alpha < 0,05$ ) (TABELA 3). Então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar onde ocorreram estas diferenças entre os grupos. A comparação entre os grupos mostrou diferenças estatísticas significantes que colocam o grupo AUT como o melhor em formação de novo tecido ósseo em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os grupos BCP, BCP-MC e BCP-MO demonstraram homogeneidade não sendo estatisticamente diferentes ( $p > 0,05$ ), porém, com média percentual maior no grupo BCP-MO de 43,17%, sendo este último, o único entre os grupos com biomaterial que foi estatisticamente diferente do grupo CO (TABELA 4).

Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os grupos do modelo experimental.

| ANOVA                |      |       |       |            |          |
|----------------------|------|-------|-------|------------|----------|
| Causas da variação   | G.L. | S.Q.  | Q.M.  | Valor de f | $\alpha$ |
| Histometria X Grupos | 4    | 10074 | 2518  | 13,37      | 0,0001   |
| Resíduo              | 45   | 8477  | 188,4 |            |          |
| Total corrigido      | 49   | 18551 |       |            |          |

Fonte: Do autor.

Notas: G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma dos quadrados; Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 4 - Teste de Tukey para as médias percentuais da AO segundo os grupos do modelo experimental.

| Grupos    | N  | Média | Homogeneidade |
|-----------|----|-------|---------------|
| 1- CO     | 10 | 18,31 | A             |
| 2- AUT    | 10 | 61,37 | B             |
| 3- BCP    | 10 | 31,99 | AC            |
| 4- BCP-MC | 10 | 34,72 | AC            |
| 5- BCP-MO | 10 | 43,17 | C             |

| Contraste | Diferença | Q      | (p)       |
|-----------|-----------|--------|-----------|
| 1-2       | -43,06    | 9,921  | <0,0001   |
| 1-3       | -13,69    | 3,154  | 0,1875 ns |
| 1-4       | -16,42    | 3,782  | 0,0740 ns |
| 1-5       | -24,86    | 5,728  | 0,0018    |
| 2-3       | 29,37     | 6,768  | 0,0002    |
| 2-4       | 26,65     | 6,139  | 0,0007    |
| 2-5       | 18,20     | 4,193  | 0,0369    |
| 3-4       | -2,728    | 0,6284 | 0,9916 ns |
| 3-5       | -11,17    | 2,574  | 0,3750 ns |
| 4-5       | -8,445    | 1,946  | 0,6459 ns |

Fonte: Do autor.

Nota: ns: não significante.

Após as análises histométrica e estatística dos grupos da AO foi realizada as análises dos mesmos por período de estudo em 4 e 8 semanas, através da submissão dos dados de histometria da AO dos diferentes grupos e períodos, do modelo experimental, à análise de variância (ANOVA), sendo então observada diferença estatística entre os dados ( $\alpha < 0,05$ ) (TABELA 5). Então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar nos grupos e períodos onde ocorreram as diferenças, sendo importante reforçar que não se justifica comparar grupos diferentes em períodos também diferentes. No período de 4 semanas o grupo coágulo só foi diferente estatisticamente do grupo autógeno ( $p = 0,0018$ ) e o grupo autógeno obteve a maior média percentual em neoformação óssea (41,23%), mas foi homogêneo em relação a todos os outros grupos ( $p > 0,05$ ) com exceção do grupo coágulo. Os grupos BCP, BCP-MC e BCP-MO tiveram comportamento similar em 4 semanas ( $p > 0,05$ ). No período de 8 semanas o grupo AUT se destacou melhor estatisticamente em relação a todos os demais grupos ( $p < 0,05$ ) e os grupos BCP-MC e BCP-MO demonstraram homogeneidade, não sendo estatisticamente diferentes ( $p = 0,1363$ ), mas em números percentuais o grupo BCP-MO apresentou uma maior área de neoformação óssea com média percentual de 54,38% contra 38,60% do grupo BCP-MC. Quando comparado os resultados em 4 e 8 semanas dentro dos respectivos grupos, o grupo autógeno apresentou uma média percentual muito superior em 8 semanas de 81,51% ( $p < 0,0001$ ), o grupo BCP foi similar ( $p = 0,9985$ ), o grupo BCP-MC também foi igual ( $p = 0,9104$ ) e o grupo BCP-MO foi superior em média percentual em 8 semanas ( $p = 0,0061$ ) (TABELA 6).

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para AO segundo os períodos de avaliação do modelo experimental.

| ANOVA              |      |       |       |            |          |
|--------------------|------|-------|-------|------------|----------|
| Causas da variação | G.L. | S.Q.  | Q.M.  | Valor de f | $\alpha$ |
| Períodos           | 9    | 15611 | 1735  | 23,60      | 0,0001   |
| Resíduo            | 40   | 2940  | 73,49 |            |          |
| Total corrigido    | 49   | 18551 |       |            |          |

Fonte: Do autor.

Notas: G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma dos quadrados; Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 6 - Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos de avaliação do modelo experimental.

(Continua)

| Grupos        | N | Média | Homogeneidade |  |  |
|---------------|---|-------|---------------|--|--|
| 1- CO 4S      | 5 | 16,53 | A             |  |  |
| 2- AUT 4S     | 5 | 41,23 | B             |  |  |
| 3- BCP 4S     | 5 | 29,88 | AB            |  |  |
| 4- BCP-MC 4S  | 5 | 30,85 | AB            |  |  |
| 5- BCP-MO 4S  | 5 | 31,96 | AB            |  |  |
| 6- CO 8S      | 5 | 20,09 | AC            |  |  |
| 7- AUT 8S     | 5 | 81,51 | D             |  |  |
| 8- BCP 8S     | 5 | 34,11 | BC            |  |  |
| 9- BCP-MC 8S  | 5 | 38,60 | BE            |  |  |
| 10- BCP-MO 8S | 5 | 54,38 | E             |  |  |

| Contraste | Q      | (p)      | Contraste | Q      | (p)      |
|-----------|--------|----------|-----------|--------|----------|
| 1-2       | -24,71 | 0,0018*  | 3-10      | -24,49 | 0,0020*  |
| 1-3       | -13,36 | 0,3179   | 4-5       | -1,111 | >0,9999  |
| 1-4       | -14,32 | 0,2325   | 4-6       | 10,76  | 0,6144   |
| 1-5       | -15,43 | 0,1557   | 4-7       | -50,66 | <0,0001* |
| 1-6       | -3,565 | 0,9996   | 4-8       | -3,258 | 0,9998   |
| 1-7       | -64,98 | <0,0001* | 4-9       | -7,750 | 0,9104   |
| 1-8       | -17,58 | 0,0645   | 4-10      | -23,53 | 0,0034*  |
| 1-9       | -22,07 | 0,0073*  | 5-6       | 11,87  | 0,4804   |
| 1-10      | -37,85 | <0,0001* | 5-7       | -49,55 | <0,0001* |
| 2-3       | 11,35  | 0,5428   | 5-8       | -2,147 | >0,9999  |
| 2-4       | 10,38  | 0,6591   | 5-9       | -6,639 | 0,9638   |
| 2-5       | 9,274  | 0,7831   | 5-10      | -22,42 | 0,0061*  |
| 2-6       | 21,14  | 0,0118*  | 6-7       | -61,42 | <0,0001* |
| 2-7       | -40,27 | <0,0001* | 6-8       | -14,02 | 0,2579   |
| 2-8       | 7,127  | 0,9443   | 6-9       | -18,51 | 0,0425*  |
| 2-9       | 2,635  | >0,9999  | 6-10      | -34,29 | <0,0001* |
| 2-10      | -13,14 | 0,3392   | 7-8       | 47,40  | <0,0001* |

Tabela 6 - Teste de Tukey para as médias percentuais de AO segundo os períodos de avaliação do modelo experimental.

|           |        |          |           |        | (Conclusão) |
|-----------|--------|----------|-----------|--------|-------------|
| Contraste | Q      | (p)      | Contraste | Q      | (p)         |
| 3-5       | -2,073 | >0,9999  | 7-10      | 27,13  | 0,0005*     |
| 3-6       | 9,795  | 0,7273   | 8-9       | -4,492 | 0,9976      |
| 3-7       | -51,62 | <0,0001* | 8-10      | -20,27 | 0,0183*     |
| 3-8       | -4,220 | 0,9985   | 9-10      | -15,78 | 0,1363      |
| 3-9       | -8,713 | 0,8370   |           |        |             |

Fonte: Do autor.

Nota: \*:  $p < 0.05$

### 5.3.2 Área de partículas residuais do biomaterial

A percentagem de presença de partículas residuais do biomaterial levando-se em conta a AT (área total do defeito) e AP (área de partículas) de cada espécime segundo os períodos e grupos experimentais serviu para o cálculo das médias percentuais e desvio padrão da histometria da AP. Observamos que nos períodos de 4 e 8 semanas o grupo BCP-MO foi o que apresentou a menor média percentual de AP e o grupo BCP apresentou a maior nos mesmos períodos (TABELA 7).

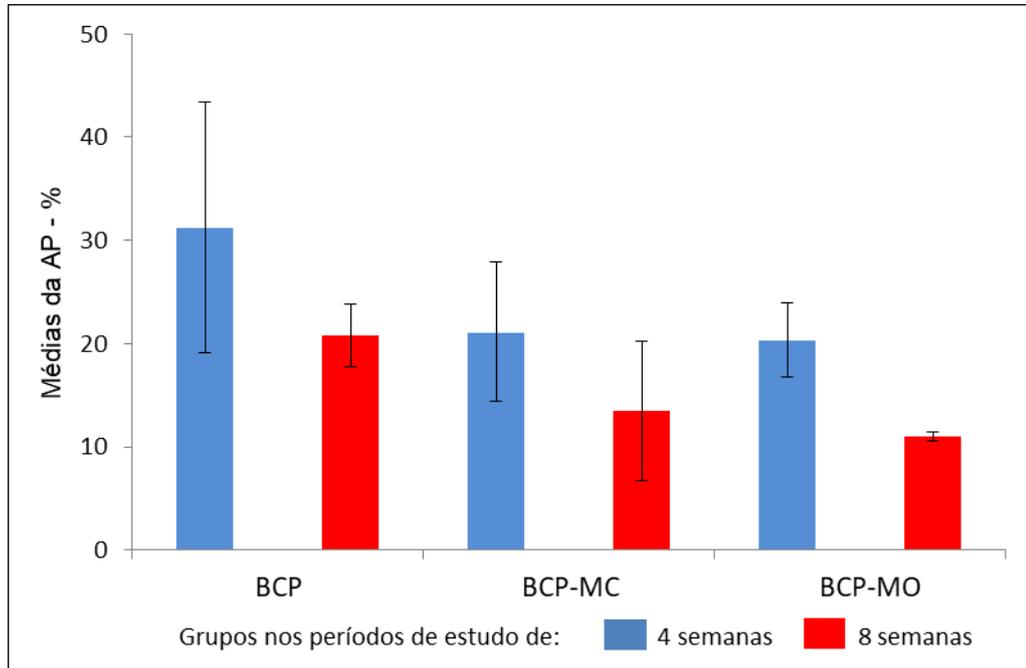
Tabela 7 - Médias percentuais e desvio padrão dos dados da histometria da AP segundo os períodos do modelo experimental.

| 4 semanas |   |       |               | 8 semanas |       |               |
|-----------|---|-------|---------------|-----------|-------|---------------|
| Grupo     | n | AP    | Desvio padrão | n         | AP    | Desvio padrão |
| BCP       | 5 | 31,24 | 12,1318       | 5         | 20,80 | 3,0597        |
| BCP-MC    | 5 | 21,14 | 6,7732        | 5         | 13,49 | 6,7309        |
| BCP-MO    | 5 | 20,35 | 3,6453        | 5         | 11,00 | 0,4412        |

Fonte: Do autor.

Os Gráficos 3 e 4 apresentam respectivamente as médias percentuais da AP nos diferentes grupos, considerando os períodos de avaliação do modelo experimental, e as médias percentuais da AP nos diferentes grupos em todo período de estudo.

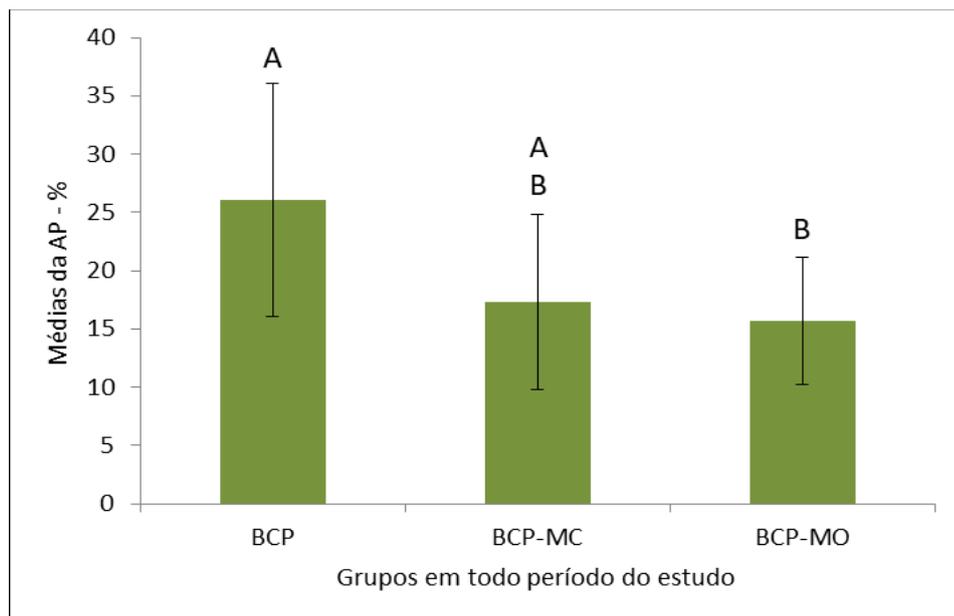
Gráfico 3 - Representação gráfica das médias percentuais da AP e do desvio padrão nos diferentes grupos, considerando os períodos de avaliação do modelo experimental.



Fonte: Do autor.

Notas: Teste de Tukey a 5% de significância. A análise das médias dentro dos 3 grupos em seus respectivos períodos de estudo de 4 e 8 semanas não evidenciou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). A análise entre os grupos considerando os mesmos períodos de avaliação também identificou homogeneidade ( $p > 0,05$ ).

Gráfico 4 - Representação gráfica das médias percentuais da AP e do desvio padrão nos diferentes grupos em todo o período do modelo experimental.



Fonte: Do autor.

Notas: Teste de Tukey a 5% de significância. Letras iguais demonstram médias percentuais homogêneas do ponto de vista estatístico entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

Após a submissão dos dados de histometria da AP dos diferentes grupos do modelo experimental que receberam grânulos de BCP à análise de variância (ANOVA), levando em consideração todo o período do estudo, foi observada diferença estatística entre os dados ( $\alpha < 0,05$ ) (TABELA 8). Então o teste de Tukey a 5% de significância foi realizado, sendo que o grupo BCP apresentou a maior média percentual de partículas residuais com 25,97%, sendo estatisticamente igual ( $p = 0,0604$ ) ao grupo BCP-MC com 17,31% e diferente ( $p = 0,0104$ ) do grupo BCP-MO com 15,67%. Os grupos BCP-MC e BCP-MO apresentaram homogeneidade considerando todo o período de estudo ( $p = 0,5920$ ) (TABELA 9).

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para AP segundo os grupos do modelo experimental.

| ANOVA                |      |        |        |            |          |
|----------------------|------|--------|--------|------------|----------|
| Causas da variação   | G.L. | S.Q.   | Q.M.   | Valor de f | $\alpha$ |
| Histometria X Grupos | 2    | 612,83 | 306,41 | 4,8964     | 0,0151   |
| Resíduo              | 27   | 169    | 62,58  |            |          |
| Total corrigido      | 29   | 781,83 |        |            |          |

Fonte: Do autor.

Notas: G.L.: graus de liberdade; S.Q.: soma dos quadrados; Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 9 - Teste de Tukey para as médias percentuais da AP segundo os grupos do modelo experimental.

| Grupos    | N  | Média | Homogeneidade |
|-----------|----|-------|---------------|
| 1- BCP    | 10 | 25,97 | A             |
| 2- BCP-MC | 10 | 17,31 | AB            |
| 3- BCP-MO | 10 | 15,67 | B             |

| Contraste | Diferença | Q     | (p)       |
|-----------|-----------|-------|-----------|
| 1-2       | 8,66      | 3,463 | 0,0604 ns |
| 1-3       | 10,30     | 4,117 | 0,0104    |
| 2-3       | 1,63      | 0,654 | 0,5920 ns |

Fonte: Do autor.

Nota: ns: não significativa.

Após as análises histométrica e estatística dos grupos da AP foi realizada as análises dos mesmos por período de estudo em 4 e 8 semanas, através da submissão dos dados de histometria da AP dos diferentes grupos e períodos, do modelo experimental, à análise de variância (ANOVA), sendo então observado que houve diferença estatística dentro dos grupos considerando os períodos de avaliações de 4 e 8 semanas ( $\alpha < 0,05$ ), mas quando realizado o teste de Tukey a 5% foi constatado que estas diferenças foram apenas entre grupos diferentes em períodos de análise também diferentes (BCP 4 semanas com BCP-MC 8 semanas e BCP 4 semanas com BCP-MO 8 semanas). As comparações entre os diferentes grupos no mesmo período de análise e dentro do mesmo grupo em períodos de avaliações diferentes obtiveram resultados estatisticamente homogêneos no que diz respeito a AP ( $p > 0,05$ ) (GRÁFICO 3).

## 6 DISCUSSÃO

O defeito ósseo de tamanho crítico é aquele não consegue reparo espontâneo, sem que se realize procedimentos para otimizar a regeneração óssea (COOPER *et al.*, 2011; CARDOSO *et al.*, 2019; DO LAGO *et al.*, 2020). A localização do defeito crítico e o modelo animal escolhido são aspectos extremamente importantes para o estudo da regeneração óssea. O fato do osso onde o defeito crítico foi realizado estiver exposto à função e sujeito a cargas pode interferir diretamente na neoformação óssea obtida com a enxertia. Cardoso *et al.* (2019) pesquisando os mesmos biomateriais em defeitos ósseos críticos, na calvária e na tíbia de ratos wistar, verificaram uma maior formação de novo tecido ósseo nos defeitos críticos da tíbia quando comparados com os da calvária, atribuindo estes resultados a função precoce e a carga que ocorria na tíbia gerada pelo estímulo da deambulação do animal, fato este que não ocorre com o osso da calota craniana. Além disso, acrescentam os autores, a dificuldade técnica em realizar o defeito na calvária por ela apresentar pouca espessura (muita vezes inferior a 1 mm), podendo ocorrer a lesão da dura-máter durante a confecção do defeito que poderia contribuir negativamente para a neoformação óssea. Mas mesmo com esta dificuldade técnica, o defeito crítico de calvária de ratos é consagrado, sendo um dos mais utilizados e aceito pela comunidade científica para estudo da regeneração óssea devido à praticidade de se trabalhar com pequenos roedores e por ser possível adquirir, por parte do pesquisador, treinamento adequado para esta cirurgia, minimizando intercorrências.

Cooper *et al.* (2011) definiram como defeito de tamanho crítico em ratos um defeito de 8 mm de diâmetro, no entanto, outros pesquisadores comprovaram que 5 mm de diâmetro na calvária de ratos wistar já seria um defeito crítico (CARDOSO *et al.*, 2019; DO LAGO *et al.*, 2020). Em nosso estudo todas as cirurgias foram realizadas pelo mesmo pesquisador e comprovamos que um defeito de 6 mm de diâmetro na calvária de ratos wistar era crítico, ou seja, não apresentava reparação espontânea no grupo controle negativo, representado pelo preenchimento do defeito apenas com o próprio coágulo sanguíneo do animal. Neste grupo nos períodos experimentais de 4 e 8 semanas a média percentual de neoformação óssea foi muito baixa, com valores respectivamente de  $16,53\% \pm 2,5424$  e  $20,09\% \pm 1,5172$ , sendo estatisticamente não significativa ( $p = 0,9996$ ), e o pouco osso neoformado se

restringiu às bordas do defeito e todo o centro foi preenchido com tecido conjuntivo fibroso. Sabendo que a reparação do defeito ósseo crítico apresenta melhores resultados em ossos submetidos à carga e função precoce, a neoformação óssea em defeitos críticos na calvária de ratos deve ser interpretada com cautela e resultados mais baixos em relação a outros modelos experimentais não são necessariamente ruins. Assim sendo, é importante explorar os diversos tipos de modelos experimentais para o estudo da regeneração óssea de arcabouços incorporados às células-tronco.

Há um consenso que um arcabouço ideal para ser utilizado como substituto ósseo e ser incorporado com células-tronco, precisa ter características adequadas, como uma rede interconectada de poros que possibilitem retenção necessária para a adesão, sobrevivência, proliferação e diferenciação das células transplantadas. A pesquisa e desenvolvimento por um biomaterial que melhor apresente arcabouços ideais tem sido uma constante (LOBO *et al.*, 2015; MEBARKI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018;). No entanto, o microambiente encontrado em um enxerto ósseo autógeno é algo extremamente difícil de conseguirmos reproduzir, uma vez que este proporciona um microambiente completo e dinâmico composto por células nativas, indiferenciadas e maduras, associadas a vasos sanguíneos já formados, que mantêm sua viabilidade, diferenciação e proliferação celular em um estágio mais avançado quando comparado aos substitutos ósseos incorporados às células-tronco, onde primeiro há a necessidade de sobrevivência das células transplantadas que não são nativas deste microambiente, representado pelo arcabouço do biomaterial. Deste modo, a pesquisa por um arcabouço de biomaterial ideal para ser associado às células-tronco continua sendo uma busca extremamente necessária (LEE; HIRASAWA; GARCIA, 2019).

Entre os substitutos ósseos disponíveis para contrapor ao enxerto autógeno, os de origem sintética à base de HA e  $\beta$ -TCP vem sendo amplamente utilizados. Eles são comprovadamente biocompatíveis e osteocondutores para a formação óssea, sendo importante considerarmos três características de extrema relevância deste biomaterial para serem utilizados em associação com células-tronco, que são: a proporção de HA e  $\beta$ -TCP, o tamanho das partículas que se pretende utilizar e as dimensões dos poros em cada partícula (LOBO; ARINZEH, 2010; MARRELLA *et al.*, 2018).

A proporção ideal de HA e  $\beta$ -TCP dependem fundamentalmente da finalidade do seu uso ou do tipo de defeito ósseo que se pretende reconstruir. Quanto maior for a quantidade de HA em relação ao  $\beta$ -TCP, maior será a estabilidade e a capacidade de suportar cargas do biomaterial, mas apresentará uma velocidade de reabsorção diminuída, sendo que uma maior concentração de  $\beta$ -TCP em relação a HA proporciona menos estabilidade, suporta menos cargas nas fases iniciais após a reconstrução óssea, porém, apresenta uma reabsorção pelo organismo mais acelerada (LOBO; ARINZEH, 2010; LOBO *et al.*, 2015). Pereira *et al.* (2019) em um estudo *in vitro* e *in vivo*, compararam os grânulos de BCP, na proporção de HA e  $\beta$ -TCP respectivamente de 60:40 e 20:80, associados às células-tronco mesenquimais da medula óssea. Os autores verificaram que na relação de 20:80, com maior predomínio de  $\beta$ -TCP, houve maior liberação de íons de cálcio *in vitro* e uma neoformação óssea e vascular melhor e mais rápida *in vivo* quando utilizados no subcutâneo de camundongos, acreditando os autores que a liberação dos íons de cálcio pelos arcabouços de BCP são responsáveis para ativar uma proteína receptora sensível ao cálcio (CaSr) presente na superfície das células-tronco semeadas nesses arcabouços. No entanto, há a necessidade de analisarmos as características do tipo de defeito ósseo que pretendemos reconstruir. Mesmo sabendo que um maior predomínio de  $\beta$ -TCP em relação a HA, nos grânulos de BCP, pode possibilitar uma reabsorção mais rápida do BCP pelo organismo, com conseqüente formação óssea também mais rápida, nós perdemos muito a capacidade do biomaterial suportar cargas e permanecer estável com o mínimo de alterações dimensionais, fazendo com que o substituto ósseo possa não permanecer no leito receptor pelo tempo necessário para o início da reparação óssea. Isto é extremamente válido quando pensamos em reconstruir defeitos ósseos na região bucomaxilofacial, ou mais especificamente nos processos alveolares atróficos dos maxilares, onde muitas vezes temos a necessidade de reconstruir largura e altura óssea para posterior colocação de implantes dentários. Em tal situação não temos um defeito constituído por duas ou mais paredes ósseas para servirem de contenção para a acomodação do biomaterial. Nestas situações rotineiras é importante pensarmos no uso de um substituto ósseo com maior capacidade de estabilidade e resistência à compressão, podendo permanecer no local reconstruído, com maior segurança, nas fases iniciais do processo de reparo ósseo. Assim sendo, em nosso trabalho escolhemos grânulos de BCP com a

proporção de HA e  $\beta$ -TCP de respectivamente 60:40, para termos maior capacidade de estabilidade e resistência a compressão fornecido pela HA, sem perder a capacidade mais rápida de reabsorção do biomaterial oriunda do  $\beta$ -TCP, todavia, observamos que após o período de 8 semanas, que representa um estágio de maturação do metabolismo ósseo em ratos bastante avançado, nos grupos com partículas com esta proporção, seja no grupo somente com o biomaterial ou associado com culturas de SHED em meio convencional ou odontogênico, a permanência de uma grande número de grânulos residuais na análise histológica, entretanto, foi observado que muitas destas partículas residuais demonstravam boa biocompatibilidade e osteocondução com presença de tecido ósseo neoformado ao redor delas, contudo, uma baixa capacidade de reabsorção e substituição das mesmas por tecido ósseo (FIGURA 35). Diante disso, faz-se necessários novos estudos com o BCP e também com outros biomateriais, com e sem células-tronco, diversificando o modelo animal e a localização do defeito ósseo crítico com o objetivo de observar resultados de osteoindução e osteogênese com redução de partículas residuais dos biomateriais.

O tamanho médio das partículas ou grânulos, bem como dos poros em cada grânulo do biomaterial, são fatores que podem interferir diretamente na capacidade de adesão, sobrevivência e diferenciação das células-tronco semeadas (CECCARELLI *et al.*, 2017; WONGSUPA *et al.*, 2017). O tamanho das partículas deve ser compatível com a extensão do defeito ósseo que se deseja reconstruir, ou seja, quanto maior o defeito ósseo, maior será a tendência em se utilizar grânulos maiores para um preenchimento mais adequado do leito receptor e, quanto menor for a área a ser reconstruída, menores devem ser os grânulos do substituto ósseo, sendo este princípio utilizado em nosso estudo para definição da escolha do tamanho dos grânulos (JAFARI *et al.*, 2017).

Marrella *et al.* (2018) analisando as partículas de BCP conjugadas com células-tronco, chamam atenção para o desenvolvimento de biomateriais porosos, sendo que o tamanho dos poros poderia influenciar a neoformação óssea e vascular. O diâmetro mínimo de poro para se obter uma formação adequada de novo tecido ósseo seria de 100  $\mu\text{m}$  e que grânulos com diâmetro médio de seus poros inferior a esta mensuração poderiam induzir a formação de tecido osteóide. Ainda de acordo com os autores, poros maiores que 200  $\mu\text{m}$  parecem facilitar a penetração de osteoblastos, contudo, chamam a atenção para o fato que uma alta

porosidade apesar de facilitar a difusão de nutrientes, adesão, diferenciação e migração celular, pode conferir uma baixa resistência mecânica ao biomaterial, devendo ser evitado em áreas de reconstrução de defeitos ósseos sujeitos a carga.

Lobo *et al.* (2015) em um estudo *in vitro* onde estudaram células-tronco de diferentes origens cultivadas em arcabouços de BCP com uma proporção de HA e  $\beta$ -TCP respectivamente de 65% e 35%, verificaram que ocorreu maior adesão, proliferação e diferenciação celular em pré-osteoblastos em arcabouços de BCP com grânulos cujo diâmetro médio das partículas era de 0,6 mm (420 a 850  $\mu$ m), o que representa um diâmetro médio dos poros entre 100 e 300  $\mu$ m. Estes resultados estão em concordância com os estudos de Marrella *et al.* (2018) e com os nossos resultados *in vivo*, onde nos experimentos que utilizamos partículas de HA/ $\beta$ -TCP na proporção de HA e  $\beta$ -TCP respectivamente de 60% e 40%, com tamanho médio de 0,3 mm (250 a 420  $\mu$ m) dos grânulos e de 100 a 200  $\mu$ m de diâmetro dos poros associados a SHED cultivadas em meio osteogênico (grupo BCP-MO), foi evidenciado uma neoformação óssea na reparação de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos após 8 semanas que só foi inferior ao grupo do enxerto ósseo autógeno, que é considerado o padrão ouro para reconstruções ósseas.

Além dos substitutos ósseos de origem sintética, representado pelas cerâmicas de HA e  $\beta$ -TCP, os de origem alógena e xenógena, para serem utilizados no ser humano, vêm sendo estudados para o emprego associado às células-tronco. Mebarki *et al.* (2017) comparando dois diferentes tipos de arcabouços, o BCP e o osso humano liofilizado, concluíram que a adesão celular aos poros do arcabouço e a neoformação óssea foram duas vezes maiores respectivamente, *in vitro* e *in vivo*, no grupo do osso humano liofilizado quando comparado ao grupo da combinação de HA e  $\beta$ -TCP, atribuindo este resultado a uma rede com poros mais abertos e com conteúdo de colágeno no osso humano liofilizado, sendo mais propício para adesão, proliferação e sobrevivência das células-tronco *in vivo*. Entretanto, verificamos na metodologia deste estudo que os grânulos de BCP utilizados tinham tamanho médio de 2 a 3 mm e que, apesar de serem grandes, apresentavam um diâmetro médio dos poros menores de 10  $\mu$ m em aproximadamente 40% da superfície do biomaterial. Isto pode explicar, ao menos parcialmente, os resultados inferiores obtidos do BCP em relação ao osso liofilizado humano, uma vez que *in vitro*, Lobo *et al.* (2015) comprovaram uma maior taxa de adesão e diferenciação celular das células

semeadas em grânulos com diâmetro médio dos poros entre 100 e 300  $\mu\text{m}$  quando comparado com outras cerâmicas de BCP.

No campo da regeneração óssea, o cultivo de células-tronco *in vitro* pode ser realizado, por exemplo, em meio de cultura convencional ou osteogênico, como descritos na metodologia desta dissertação. A maioria dos estudos que visam à reconstrução de defeitos ósseos com biomateriais associados a células-tronco, tiveram as células cultivadas em meio osteogênico, obtendo resultados promissores quanto à neoformação óssea *in vivo* (NAKAJIMA *et al.*, 2018; CHU *et al.*, 2018). Mebarki *et al.* (2017) utilizaram células-tronco da medula óssea cultivadas em meio de cultura convencional para comparar a associação dessas células com grânulos de BCP e com o osso liofilizado humano quando implantados no subcutâneo de camundongos, sendo os resultados mais desfavoráveis para os grânulos de BCP. Qiao *et al.* (2015) comprovaram que o meio osteogênico apresentava melhores condições para a diferenciação osteogênica *in vitro*. Lobo *et al.* (2015) em um estudo também *in vitro*, cultivando células-tronco de diferentes origens, incluindo de polpa de dentes humanos em meio de cultura osteogênico associadas às partículas de HA/ $\beta$ -TCP, verificaram a diferenciação celular em pré-osteoblastos em média após 14 dias. Novais *et al.* (2019) cultivando SHED em meio de cultura osteogênico junto com fator de crescimento de fibroblastos tipo 2 em arcabouços de gel de colágeno obtiveram diferenciação osteogênica *in vitro* em 21 dias. Yang *et al.* (2019) estudaram *in vitro* os derivados do grafeno (óxido de grafeno e pontos quânticos de óxido de grafeno) em culturas de SHED em meio osteogênico. Estes derivados do grafeno são conhecidos por apresentarem fatores bioativos na diferenciação osteogênica de células-tronco. Após 7 dias de cultivo ambos facilitaram a proliferação de SHED, mas só ocorreu diferenciação osteogênica no grupo com pontos quânticos de óxido de grafeno. Em nosso estudo, cujo objetivo era avaliar os resultados de neoformação óssea *in vivo*, não foi avaliado a diferenciação osteogênica *in vitro*, mas o grupo onde os grânulos de HA/ $\beta$ -TCP foram incorporados as SHED cultivadas em meio osteogênico durante 7 dias (grupo BCP-MO) apresentaram resultados superiores, em média percentual, na formação de novo tecido ósseo após 8 semanas quando comparado ao grupo onde o cultivo foi em meio convencional no mesmo período (grupo BCP-MC), mas o teste de Tukey a 5% de significância não evidenciou diferenças estatísticas significantes ( $p = 0,1363$ ). Quando avaliado todo o período de estudo no modelo experimental, os

grupos BCP-MC e BCP-MO também apresentaram homogeneidade ( $p = 0,6459$ ), apesar de uma média percentual maior para o grupo BCP-MO.

Diversos estudos relatam que as células-tronco podem ser obtidas de várias localizações diferentes como medula óssea, tecido adiposo, pele, cordão umbilical e tecidos dentários. Devido ao fato de se tratar de células mesenquimais indiferenciadas, independentemente do tecido de origem, todas teriam potencial para se diferenciarem em qualquer outro tipo de célula a depender do estímulo *in vitro* e do local *in vivo* para onde elas são transplantadas, ou seja, a origem tecidual das células-tronco não seria um fator importante para a obtenção de resultados satisfatórios *in vivo* (DE MIGUEL *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2019). Entretanto, na área do estudo da regeneração óssea, alguns autores têm demonstrado resultados que parecem ser mais promissores quando se utiliza células-tronco de uma origem específica. Nakajima *et al.* (2018) compararam HMSC com as SHED para reconstruir defeitos ósseos de tamanho crítico em calvárias de camundongos, concluindo que ambas proporcionaram um reparo satisfatório do defeito ósseo, mas que as células com origem nos dentes decíduos esfoliados mostraram maiores fibras de colágeno osteóide e também com melhor distribuição na área óssea neoformada. Du *et al.* (2016) estudaram as HMSC de duas diferentes origens, sendo uma da medula óssea da região da crista ilíaca e a outra da região medular da maxila. As propriedades angiogênicas de ambas foram testadas, uma vez que para os autores, a formação de novos vasos sanguíneos seria fundamental para que a neoformação óssea possa ser adequada. Analisando *in vitro* o fator de crescimento vascular endotelial e o fator de crescimento básico de fibroblastos (BFGF), verificaram que os resultados mostraram uma expressão significativamente mais alta da proteína BFGF no sistema de cultura de HMSC provenientes da maxila quando comparados com o de HMSC originários da crista íliaca, sugerindo que esta proteína poderia promover a migração e proliferação de células endoteliais que são fundamentais para a neovascularização. Esse resultado indicou que as HMSC obtidas da maxila pareciam ter maior capacidade de angiogênese do que as HMSC da crista ilíaca e isso pode estar associado aos diferentes níveis de expressão da proteína BFGF, portanto, acreditam os autores, que uma melhor neoformação vascular contribuiria de forma significativa para uma melhor formação de novo tecido ósseo.

Vários estudos tem demonstrado bons resultados *in vivo* em termos de neoformação óssea através do emprego de vários tipos de arcabouços incorporados às células-tronco de diferentes origens, entre elas as SHED (PEREIRA *et al.*, 2019; CHU *et al.*, 2018; NAKAJIMA *et al.*, 2018; MERBARKI *et al.*, 2017; ZENG *et al.*, 2009). Todavia, se faz necessário para extrapolar o emprego de um substituto ósseo incorporado às células-tronco para aplicação em humanos, que esta associação seja comparada com o padrão ouro de neoformação óssea proporcionada pelo enxerto ósseo autógeno, fato que nenhum dos trabalhos citados acima o fez, sendo esta uma das pretenções do presente estudo, onde constatamos que apesar dos resultados promissores no campo da regeneração óssea proporcionado por arcabouços incorporados com células-tronco, a neoformação óssea para reparação de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratos foi superior para o enxerto ósseo autógeno.

Muitos estudos *in vivo* tem a preocupação de minimizar o efeito quando células-tronco de uma espécie são transplantadas para outra espécie, supondo que um transplante xenógeno de células poderia interferir negativamente na reparação tecidual, devido a um processo inflamatório mais intenso que poderia ocorrer nesta situação. Dessa forma, é comum quando células-tronco de origem humana são utilizadas em modelos experimentais, a escolha por animais imunodeficientes, acreditando que um sistema imunológico normal poderia ser um fator agravante para um processo inflamatório mais intenso em um transplante celular xenógeno, com consequente alteração do processo de reparação tecidual (SAKAI *et al.*, 2010; NAKAJIMA *et al.*, 2018). Há também estudos *in vivo* que para evitar esta variável, utiliza-se de um transplante celular autógeno, onde células-tronco são obtidas de um animal, que após cultivo *in vitro* associado a um biomaterial, são utilizados para o preenchimento de defeitos ósseos no mesmo animal (ZHENG *et al.*, 2009; CHU *et al.*, 2018). Em ambas as situações, sejam em modelos animais com sistema imune deficiente ou em transplantes celulares autógenos, os resultados tem sido promissores para o uso das células-tronco como um mecanismo de auxílio na reparação óssea. Todavia, nosso estudo utilizou SHED em ratos metabolicamente normais, ou seja, sem imunodeficiência, e a análise qualitativa do processo inflamatório crônico nos grupos com HA/ $\beta$ -TCP associados com células-tronco, em meio convencional ou osteogênico, não evidenciou nos periodos de 4 e 8 semanas um infiltrado inflamatório mais intenso que nos demais grupos controles,

representados pelo coágulo sanguíneo, osso autógeno e também da HA/ $\beta$ -TCP isoladamente, sendo o grupo com HA/ $\beta$ -TCP associado a SHED cultivadas em meio osteogênico após 8 semanas (grupo BCP-MO), o que obteve a maior taxa de formação de novo tecido ósseo após o grupo considerado como padrão ouro, representado pelo enxerto autógeno. Assim, em um modelo animal sem imunodeficiência, a terapia com SHED se mostrou animadora, no entanto, faz se necessários outros estudos envolvendo transplantes xenógenos de células-tronco para outros modelos experimentais envolvendo animais metabolicamente normais para elucidar e consolidar a intensidade da reação inflamatória aguda e crônica, sendo que a falta da avaliação do infiltrado inflamatório agudo foi uma limitação do presente estudo. Portanto, se mesmo em um transplante celular xenógeno, do homem para ratos sem imunodeficiência, os resultados foram promissores após 8 semanas, quando extrapolamos a ideia ou intenção de usarmos as SHED em um transplante celular autógeno ou mesmo alógeno, envolvendo o ser humano, associado ao desenvolvimento de novos arcabouços de biomateriais que possibilitem a sobrevivência e diferenciação das células-tronco, deslumbramos uma opção muito interessante e viável no campo da regeneração óssea para nos aproximarmos cada vez mais dos resultados proporcionados pelo enxerto ósseo autógeno.

## 7 CONCLUSÃO

Analisando a metodologia empregada, as limitações deste estudo e os resultados nos períodos de avaliações, foi possível concluir que os grânulos da associação de HA e  $\beta$ -TCP incorporados em culturas de SHED em meio convencional ou osteogênico apresentaram resultados homogêneos, porém, inferiores ao enxerto ósseo autógeno para a reparação de defeito ósseo de tamanho crítico em calvárias de ratos adultos metabolicamente normais.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. N.; CUNHA, K. S. Dental stem cells and their application in dentistry: a literature review. **Rev Bras Odontol**, v. 73, n. 4, p. 331-335, 2016.
- ATALA, A. **Principles of regenerative medicine**. Amsterdam: Elsevier, 2011.
- BOSE, S.; TARAFDER, S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: a review. **Acta Biomater**, v. 8, n. 4, p.1401-1421, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.017>.
- BOUXSEIN, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.
- CARDOSO, G. B. C. *et al.* The importance of understanding differences in a critical size model: a preliminary *in vivo* study using tibia and parietal bone to evaluate the reaction with different biomaterials. **Mater Res**, v. 22, n.1, p. e20180491, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2018-0491>.
- CARVALHO, P. S. P. *et al.* Biomateriais aplicados à implantodontia. **Revista Implant News**, n. 7, p. 56-65, 2010.
- CECCARELLI, G. *et al.* Emerging perspectives in scaffold for tissue engineering in oral surgery. **Stem Cells Int**, v. 2017, n. 10, p. 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4585401>.
- CHEN, S. T.; DARBY, I. Alveolar ridge preservation and early implant placement at maxillary central incisor sites: a prospective case series study. **Clin Oral Impl Res**, v.31, p. 803-813, 2020. <https://doi.org/10.1111/clr.13619>.
- CHIH-SHENG, K.; JEN-HAO, C.; WEN-TA, S. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth: a concise review. **Curr Stem Cell Res Ther**, v. 15, n. 1, p. 61-76, 2020. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666191018122109>.
- CHU, W. *et al.* Mesenchymal stem cells and porous  $\beta$ -tricalcium phosphate composites prepared through stem cell screen-enrich-combine(-biomaterials) circulating system for the repair of critical size bone defects in goat tibia. **Stem Cell Res Ther**, v.9, n. 157, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0906-1>.
- CONZ, M. B. *et al.* Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na implantodontia. **Revista Implant News**, v. 7, n. 4, p. 541-546, 2010.
- COOPER, G. M. *et al.* Testing the critical-size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect (CSD). **Plastic Reconst Surg**, v. 125, n. 6, p. 1685-1692, 2011. <https://doi.org/10.1097/prs.0b013e3181cb63a3>.

DAHAKI, P.T. *et al.* Response of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) to three bioinductive materials - an in vitro experimental study. **Saudi Dent J**, v. 32, p. 43-51, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.05.005>.

DE MIGUEL, M. P. *et al.* Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. **Curr Mol Med**, v.12, n. 5, p. 574-591, 2012. <https://doi.org/10.2174/156652412800619950>.

DEMPSTER, D. W. *et al.* Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 1, p. 2-17, 2013.

DO LAGO, E. S. *et al.* Improvement of bone repair with I-PRF and bovine bone in calvaria of rats: histometric and immunohistochemical study. **Clin Oral Invest**, v. 24, n. 5, p. 1637-1650, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00784-019-03018-4>.

DU, Y. *et al.* The angiogenic variation of skeletal site-specific human BMSCs from same alveolar cleft patients: a comparative study. **J Mol Hist**, v. 47, p. 153-168, 2016. <https://doi.org/10.1007/s10735-016-9662-7>.

FARDIN, A. C. *et al.* Bone graft in dentistry: review of literatura. **Innov Implant J Biomater Esthet**, v. 5, n. 3, p. 48-52, 2010.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: an R package for ANOVA and experimental designs. **Appl Math**, v. 2014, n. 5, p. 2952-2958, 2018. <https://doi.org/10.4236/am.2014.519280>.

FERREIRA, J. R. M.; GRECK, A. P. Adult mesenchymal stem cells and their possibilities for dentistry: what to expect? **Dental Press J Orthod**, v. 25, n. 3, p. 85-92, 2020. <https://doi.org/10.1590/2177-6709.25.3.085-092.sar>.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J Bone Joint Surg**, v. 84, n.3, p. 454-464, 2002.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update injury. **Injury Int J Care Injured**, v. 365, p. 520-527, 2005.

HERNIGOU, P. *et al.* Beta-tricalcium phosphate for orthopedic reconstructions as an alternative to autogenous bone graft. **Morphologie**, v. 101, n. 334, p. 173-179, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2017.03.005>.

HO-SHUI-LING, A. *et al.* Bone regeneration strategies: engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. **Biomaterials**, v. 180, p.143-162, 2018.

HUANG, G. T. J.; THESLEFF, I. **Stem cells in craniofacial development and regeneration**. Somerset: Wiley-Blackwell, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118498026>.

IWATA, T. *et al.* Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. **Biomaterials**, v. 30, n. 14, p. 2716-2723, 2009.

JAFARI, M. *et al.* Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 105, n. 2, p. 431-459, 2017. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33547>.

JENSEN, T. *et al.* Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, p. 114-120, 2012.

KHOJASTEH, A. *et al.* Polymeric vs hydroxyapatite-based scaffolds on dental pulp stem cell proliferation and differentiation. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 10, p.1215-1221, 2015. <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v7.i10.1215>.

KHOJASTEH, A.; MOTAMEDIAN, S. R. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of craniofacial bone defects: 10 years of experience. **Regen Reconstr Restor**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.22037/rrr.v1i1.9777>.

KOUHESTANI, F. *et al.* Allogenic vs. synthetic granules for bone tissue engineering: an in vitro study. **Prog Biomater**, v. 7, n. 2, p. 133-141, 2018. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0092-3>.

LEE, C.C.; HIRASAWA, N.; GARCIA, K.G. Stem and progenitor cell microenvironment for bone regeneration and repair. **Regen Med**, v. 14, n. 7, p. 693-702, 2019. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0044>.

LEE, J. M. *et al.* Developing palatal bone using human mesenchymal stem cell and stem cells from exfoliated deciduous teeth cell sheets. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 13, n.2, p. 319-327, 2019. <https://doi.org/10.1002/term.2811>.

LIU, Y. *et al.* Acetylsalicylic acid treatment improves differentiation and immunomodulation of SHED. **J Dent Res**, v. 94, n.1, p. 209-218, 2015.

LIU, J. *et al.* Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone. **Stem Cell Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 79, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0817-1>.

LOBO, S. E.; ARINZEH, T. L. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, n. 2, p. 815-826, 2010.

LOBO, S. E. *et al.* Response of stem cells from different origins to biphasic calcium phosphate bioceramics. **Cell Tissue Res**, v. 361, n. 2, p. 477-495, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2116-9>.

LOMELINO, R. O. *et al.* The association of human primary bone cells with biphasic calcium phosphate (betaTCP/HA 70:30) granules increases bone repair. **J Mater Sci**

**Mater Med**, v. 23, n. 3, p. 781-788, 2012.  
<https://doi.org/10.1007/s10856-011-4530-1>.

LOURENÇO, E. J. V. **Avaliação da osteogênese com proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs): análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio de coelhos**. 2002. 191 f. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade Federal de São Paulo, Bauru, 2002.

LUBY, A. O. *et al.* Stem cells for bone regeneration: current state and future directions. **J Craniofac Surg**, v. 30, n. 3, p. 730-735, 2019.  
<https://doi.org/10.1097/scs.00000000000005250>.

MARRELLA, A. *et al.* Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. **Mater Today**, v. 21, n. 4, p. 363-376, 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.10.005>.

MEBARKI, M. *et al.* Enhanced human bone marrow mesenchymal stromal cell adhesion on scaffolds promotes cell survival and bone formation. **Acta Biomater**, v. 59, p. 94-107, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.018>.

MELO, L. G. N. *et al.* Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. **Clin Oral Implant Res**, v. 16, n. 6, p. 683-691, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01090.x>.

MENASCHE, P. *et al.* Myoblast transplantation for heart failure. **Lancet**, v. 357, p. 279-280, 2001.

MENDES, L. C.; SAUVIGNE, T.; GUIOL, J. Morbidity of autologous bone harvesting in implantology: literature review from 1990 to 2015. **Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale**, v. 117, n. 6, p. 388-402, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.revsto.2016.09.003>.

MESSORA, M. R. *et al.* Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria, **J Periodontol Res**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2008.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01084.x>.

MIURA, M. *et al.* SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.100, n. 10, p. 5807-5812, 2003.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>.

MOTAMEDIAN, S. R. *et al.* Smart scaffolds in bone tissue engineering: a systematic review of literature. **World J Stem Cells**, v. 7, n. 3, p. 657-668, 2015.  
<https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.657>.

NAKAJIMA, K. *et al.* Comparison of the bone regeneration ability between stem cells from human exfoliated deciduous teeth, human dental pulp stem cells and human

bone marrow mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 497, n. 3, p. 876-882, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.156>.

NOVAIS, A. *et al.* Priming dental pulp stem cells from human exfoliated deciduous teeth with fibroblast growth factor-2 enhances mineralization within tissue-engineered constructs implanted in craniofacial bone defects. **Stem Cell Transl Med**, v. 8, n. 8, p.844-857, 2019. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0182>.

OGUNSAKU, C. **Bone Substitutes and Validation**. New York: InTech, 2011. p. 481-488.

OHASHI, K. *et al.* Engineering functional two- and threedimensional liver systems in vivo using hepatic tissue sheets. **Nat Med**, v. 13, n. 7, p. 880-885, 2007. <https://doi.org/10.1038/nm1576>.

PARFITT, A. M. *et al.* Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units: report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. **J Bone Miner Res**, v. 2, n. 6, p. 595-610, 2009.

PERCIE DU SERT, N. *et al.* The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol**, v. 18, n. 7, p. e3000410. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>.

PEREIRA, R. C. *et al.* Beta-tricalcium phosphate ceramic triggers fast and robust bone formation by human mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng Regen Med**, v. 13, n. 6, p. 1007-1018, 2019. <https://doi.org/10.1002/term.2848>.

QIAO, X. *et al.* Compositional and in vitro evaluation of nonwoven type I collagen/polydl-lactic acid scaffolds for bone regeneration. **J Funct Biomater**, v. 6, n. 3, p. 667-686, 2015. <https://doi.org/10.3390/jfb6030667>.

ROBERTS, S. J. *et al.* The combined bone forming capacity of human periosteal derived cells and calcium phosphates. **Biomaterials**, v. 32, n.19, p. 4393-4405, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.02.047>.

SAKAI, V. T. *et al.* SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **J Dent Res**, v.89, n. 8, p. 791-796, 2010. <https://doi.org/10.1177/0022034510368647>.

SALGADO, A. J.; COUTINHO O. P.; REIS R. L. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromol Biosci**, v. 4, n. 8, p. 743-765, 2004. <https://doi.org/10.1002/mabi.200400026>.

SALVI, G. E.; MONJE, A.; TOMASI, C. Long- term biological complications of dental implants placed either in pristine or in augmented sites: a systematic review and meta-analysis. **Clin Oral Impl Res**, v. 29(Suppl. 16), p. 294-310, 2018.

SCHROPP, L. *et al.* Bone healing soft tissue contour changes following single- tooth extraction: a clinical and radiographic 12- month prospective study. **Int J Periodontics Restor Dent**, v. 23, n. 4, p. 313-323, 2013.

SEKIYA, N. *et al.* Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 138, n. 4, p. 985-993, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.02.004>.

SEO, B. M. *et al.* SHED repair critical-size calvarial defects in mice. **Oral Dis**, v. 14, n. 5, p. 428-434, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01396.x>.

SESMA, N.; PANNUTI, C.; CARDAROPOLI, G. Retrospective clinical study of 988 dual acid-etched implants placed in grafted and native bone for single-tooth replacement. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 27, n. 5, p.1243-1248, 2012.

SHI, X.; MAO, J.; LIU, Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: biological characteristics and therapeutic applications. **Stem Cell Transl Med**, v. 9, n. 4, p. 445-464, 2020. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>.

TANAKA, T. *et al.* Basic research and clinical application of beta-tricalcium phosphate (beta-TCP). **Morphologie**, v. 101, n. 334, p. 164-172, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2017.03.002>.

TRAN, D. T. *et al.* Survival of dental implants placed in grafted and nongrafted bone: a retrospective study in a university setting. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 31, n. 2, p. 310-317, 2016. <https://doi.org/10.11607/jomi.4681>.

VENKATESH, D.; KUMAR, K. M.; ALUR, J. Gingival mesenchymal stem cells. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 21, n. 2, p. 296, 2017.

WONGSUPA, N. *et al.* Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly( $\epsilon$ -caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. **J Mater Sci Mater Med**, v.28, p. 77, 2017. <https://doi.org/10.1007/s10856-017-5883-x>.

YANG, X. *et al.* Effects of graphene oxide and graphene oxide quantum dots on the osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Artif Cell Nanomed Biotechnol**, v. 47, n. 1, p. 822-832, 2019. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1576706>.

ZHENG, Y. *et al.* Stem cells from deciduous tooth repair mandibular defect in swine. **J Dent Res**, v. 88, n. 3, p. 249-254, 2009. <https://doi.org/10.1177/0022034509333804>.

## ANEXO

### ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA).



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG**  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL**



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso da hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato incorporados em culturas de células-tronco, obtidas de dentes decíduos esfoliados humanos, em defeitos de calvária de ratos", registrada com o nº 32/2019, sob a responsabilidade de Ronaldo Célio Mariano, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade              | ( ) Ensino (X) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 01/08/2019 a 31/12/2020         |
| Espécie/linhagem/raça   | Rato Wistar / heterogênico         |
| Nº de animais           | 50                                 |
| Sexo                    | Machos                             |
| Origem                  | Biotério Central da UNIFAL         |

Alfenas, 29 de Julho de 2019.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida  
 Coordenador do CEUA/UNIFAL-MG