CASSIO EDUARDO ADAMI RAPOSO DO AMARAL

Análise da neoformação óssea em transplantes de osso autólogo, osso bovino mineral e tricálcio fosfato com e sem o emprego de células-tronco mesenquimais humanas no reparo de falhas ósseas alveolares por meio de histomorfometria e imagens radiológicas: estudo experimental em ratos

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de: Clínica Cirúrgica
Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Alonso

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Raposo do Amaral, Cassio Eduardo Adami

Análise da neoformação óssea em transplantes de osso autólogo, osso bovino mineral e tricálcio fosfato com e sem o emprego de células-tronco mesenquimais humanas no reparo de falhas ósseas alveolares por meio de histomorfometria e imagens radiológicas: estudo experimental em ratos / Cassio Eduardo Adami Raposo do Amaral. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientador: Nivaldo Alonso.

Aos doadores eméritos e beneméritos, membros dos conselhos consultivo e fiscal, membros da diretoria, amigos, membros da equipe multidisciplinar, colaboradores e funcionários do Hospital de Crânio e Face SOBRAPAR.

Aos meus pais, Cassio Menezes Raposo do Amaral (in memoriam) e Vera Lucia Adami Raposo do Amaral, que fizeram das suas vidas uma luta para tornar o projeto SOBRAPAR um hospital viável.

Ao meu irmão Cesar que representa o genuíno significado da palavra irmão.

À minha Tatiana, minha fonte de equilíbrio e felicidade.

Agradecimentos Especiais

Agradecimentos ao Prof. Dr. Nivaldo Alonso

O cirurgião plástico John Mulliken descreveu, em seu artigo intitulado "The molders of this plastic surgeon and his quest for symmetry"¹, a importância que seus professores tiveram durante o seu período de formação acadêmico-científica. Com mais de 30 anos de experiência como cirurgião plástico e centenas de contribuições no campo da cirurgia plástica, o autor fez nesse artigo uma reflexão sobre três características profissionais que são de extrema relevância e que representam os pilares para o avanço da medicina e da cirurgia plástica como especialidade: 1- Reconheça e honre as contribuições e os profissionais que o antecederam; 2- Comprometa-se com a especialidade e realize suas próprias contribuições para que haja o avanço da cirurgia plástica; e 3- Ensine e dê oportunidade aos profissionais mais novos, acreditando que eles também farão suas contribuições e poderão perpetuar os ensinamentos adquiridos, que, por sua vez, poderão servir como base para os próximos avanços e novas técnicas na especialidade.

Esses pilares descritos por Mulliken são utilizados como alicerce de muitos Serviços de Cirurgia Plástica no mundo, cujo objetivo atual é formar cirurgiões-cientistas, ou seja, jovens profissionais com capacidade de navegar tanto na ciência quanto na clínica.² Com as dificuldades e demandas financeiras do nosso cotidiano, o jovem cirurgião tende a privilegiar a clínica em detrimento da dedicação à ciência, traduzida pela capacidade de elaborar trabalhos científicos que possam não só contribuir para o avanço da especialidade, como também confrontar os próprios resultados com os resultados de outros grupos de excelência reconhecida. Esta é a chave do crescimento profissional e exige disciplina, persistência e uma dose de humildade.

A trajetória profissional do Prof. Dr. Nivaldo Alonso serve como exemplo para os jovens cirurgiões plásticos que buscam uma carreira pautada nos três pilares descritos por Mulliken e que almejam aproximar-se da ciência de maneira que esta seja um braço da clínica diária, representada pela assistência aos pacientes. Nesse sentido, deixo registrada minha gratidão ao Dr. Nivaldo por ter me orientado, por ter me oferecido a oportunidade de desenvolver este projeto dentro do campo da ciência básica, e, por fim, por ter me ajudado a encontrar, na ciência, respostas às perguntas da clínica.

REFERÊNCIAS:

1. Mulliken JB. The molders of this plastic surgeon and his quest for symmetry. *J Craniofac Surg.* 2004;15:898-908.
2. Wan DC, Wang KC, Longaker MT. Training the contemporary surgeon-scientist. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129:1023-1025.

À Profa. Maria Rita Passos Bueno

O início da carreira da grande maioria dos cirurgiões plásticos é marcado por inseguranças, medos e incertezas. Esses sentimentos são inerentes àqueles que, desprotegidos de seus egos, reconhecem sua falta de experiência profissional e pessoal. Confúcius¹ foi um filósofo Chinês que viveu quase 500 anos antes de Cristo e descreveu três formas de se adquirir sabedoria: a primeira por meio da reflexão - que segundo o filósofo é a mais nobre; a segunda, por meio da imitação - que segundo o filósofo é a mais fácil; e a terceira, por experiência - que segundo o filósofo é a mais árdua.

No início da minha carreira, o Dr. Henry K. Kawamoto², cirurgião plástico norte-americano pioneiro no mundo na cirurgia craniofacial, durante meu período de formação nos Estados Unidos, me disse: "Cassio, você vai saber que ganhou experiência quando cometer o mesmo erro duas vezes". Desde então, tento utilizar com maior frequência o segundo método de Confúcius que a princípio parece ser o mais fácil, a imitação. No entanto, durante as minhas reflexões, constatei que o mais difícil talvez seja identificar as pessoas que genuinamente são exemplos a serem imitados.

Outro artigo publicado por John Mulliken³, intitulado "Sense of wonder" é leitura obrigatória a todos os jovens cirurgiões plásticos. A palavra inglesa "wonder" foi definida por Mulliken como admiração profunda àqueles que serviram como exemplo de dedicação, persistência, disciplina e ética durante sua trajetória profissional.

Meu início de profissão não foi diferente do de qualquer outro jovem cirurgião plástico, pautado por medos, inseguranças e incertezas. Nesse cenário, a Profa. Maria Rita Passos Bueno, a quem tenho profunda admiração,

foi um exemplo para mim, a pessoa a ser imitada. Foi ela quem me ajudou quando precisei e me aproximou do Dr. Nivaldo. Deixo aqui registrada minha gratidão à Profa. Maria Rita Passos Bueno, que evoca o sentimento descrito por Mulliken como "wonder", não só em mim, mas com certeza em todos que a conhecem, que recebem suas orientações e seus ensinamentos.

REFERÊNCIAS:

1. Confucius. Filósofo Chinês. 500 aC.
2. Henry K. Kawamoto. Comunicação pessoal.
3. Mulliken JB. Sense of wonder. J Craniofac Surg. 2009;20: 1629-30.

Agradecimentos

À Dra. Daniela Franco Bueno, por me transmitir seus conhecimentos sobre células-tronco, pela constante ajuda no planejamento e execução dos experimentos, pela amizade, consideração e respeito.

À Dra. Ana Beatriz de Almeida, pela constante ajuda na execução dos experimentos, pela amizade, consideração e respeito.

À Profa. Dra Vanda Jorgetti, pela paciência e gentileza com que me recebeu no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP). Expresso minha gratidão por todas as tardes de domingo que ela abdicou do seu tempo para interpretar os resultados deste trabalho. Expresso minha admiração por sua sabedoria e altruísmo durante nosso período de convivência.

Ao Gerson Shigeru Kobayashi, pela constante ajuda no desenvolvimento do modelo animal deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Vulcano, por permitir a utilização das instalações do setor de radiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Ao Heraldo André Catalan Rosa, tecnólogo em radiologia, pela realização dos exames de tomografia computadorizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

À Cristiane C. Costa, pela constante ajuda no desenvolvimento do modelo animal deste trabalho, no planejamento e execução das etapas subsequentes.

À Profa. Dra. Cecília H. Gouveia, pelo apoio e sugestões no desenho metodológico deste trabalho.

Ao Dr. Roberto D. Fanganiello, pelas sugestões editoriais, apoio e amizade durante nosso período de convivência no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto dos Santos pela doação dos biomateriais.

Ao artista Patrick Braga, pela confecção das ilustrações.

À Eliane Falconi Monico Gazetto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, pelas orientações durante este período.

Ao Prof. Dr. Dov Charles Goldenberg, membro da banca de qualificação desta tese, pelas valiosas sugestões editoriais, críticas e orientações acadêmicas.

Ao Prof. Dr. Alexandre Mendonça Munhoz, membro da banca de qualificação desta tese, pelas valiosas sugestões editoriais, críticas e orientações acadêmicas.

Ao Prof. Dr. César Isaac, membro da banca de qualificação desta tese, pelas valiosas sugestões editoriais, críticas e orientações acadêmicas.

Ao Prof. Dr. Marcus Castro Ferreira, Professor Titular e Chefe da Disciplina de Cirurgia Plástica e Queimaduras da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento na Disciplina de Cirurgia Plástica da USP e pelas palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Rolf Gemperli, Chefe do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela oportunidade e acolhimento neste Programa de Pós-Graduação.

Normatização Adotada

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

LISTA DE ABREVIATURAS**LISTA DE SÍMBOLOS****LISTA DE SIGLAS****LISTA DE TABELAS****LISTA DE FIGURAS****RESUMO****SUMMARY**

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações gerais.....	2
1.2	Fontes de células-tronco.....	4
1.2.1	Aspirado de medula óssea.....	4
1.2.2	Gordura.....	5
1.2.3	Polpa dentária.....	7
1.2.4	Musculatura esquelética.....	7
1.3	Biomateriais carreadores.....	8
1.4	Conceito de falha óssea crítica.....	11
1.5	O emprego de técnicas de bioengenharia de tecido ósseo: a necessidade clínica.....	12
1.6	Os princípios da construção de uma técnica em bioengenharia de tecidos.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
3	MÉTODOS.....	20
3.1	Desenho do estudo.....	21
3.2	Casuística/Amostra.....	21
3.3	Modelo de preparo das células-tronco mesenquimais humanas.....	23
3.3.1	Coleta dos tecidos de sujeitos portadores de fissura lábio-palatina.....	24
3.3.2	Identificação e isolamento de células-tronco do músculo <i>orbicularis-oris</i> de sujeitos portadores de fissura lábio-palatina.....	26
3.3.3	Cultura das células.....	26
3.3.4	Processo de caracterização do perfil imunofenotípico das células-tronco derivadas do músculo <i>orbicularis-oris</i>	27
3.3.5	Preparação dos biomateriais.....	29

3.3.6	Inoculação das células-tronco mesenquimais nos biomateriais carreadores.....	30
3.4	Modelo animal e técnica operatória.....	31
3.4.1	Período pós-operatório.....	33
3.5	Preparação para histomorfometria: cortes dos fragmentos ósseos incluídos em blocos de acrílico de metilmetacrilato e coloração com azul de Toluidina.....	34
3.5.1	Mensuração quantitativa da neoformação óssea na falha óssea alveolar realizada por meio de histomorfometria.....	34
3.5.2	Mensuração qualitativa da neoformação óssea realizada por meio da avaliação das imagens radiológicas.....	35
3.5.3	Avaliação estatística.....	37
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Resultados da mensuração da neoformação óssea obtidos por meio da avaliação das imagens radiológicas.....	39
4.2	Resultados da mensuração da neoformação óssea obtidos por meio das análises histomorfométricas.....	43
5	DISCUSSÃO.....	46
5.1	A região anatômica do animal.....	50
5.2	O período de tempo de neoformação óssea dos animais das diferentes espécies.....	52
5.3	A idade do animal.....	53
5.4	Limitações do estudo.....	63
5.5	Perspectivas futuras.....	65
6	CONCLUSÕES.....	69
7	ANEXOS.....	72
8	REFERÊNCIAS.....	76
9	APÊNDICE.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

BV	do inglês: bone volume
CD	do inglês: cluster differentiation
cols.	colaboradores
CTM	células-tronco mesenquimais
D-MEM	do inglês: Dulbecco's modified Eagle's medium
Dr.	doutor
et al.	e outros
FBS	do inglês: Fetal bovine serum
Fb.V	do inglês: fibrosis volume
FLP	fissura lábio-palatina
HA	hidroxiapatita
PBS	do inglês: Sterile phosphate buffered saline
Prof	professor
Profa.	professora
TC	tomografia computadorizada
TV	do inglês: tissue volume
α-TCP	alpha-tricálcio fosfato
β-TCP	beta-tricálcio fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	mais ou menos
%	porcentagem
>	maior que
<	menor
cm	centímetro
mg	miligrama
ml	mililitro
mM	milimol
mm	milímetros
nm	nanômetro
®	marca registrada
p	nível de significância estatístico
μm	micrômetro
100x	cem vezes

LISTA DE SIGLAS

CAPPEsq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

FMUSP Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

USP Universidade de São Paulo

UCLA do inglês: University of California Los Angeles

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ratos da linhagem Wistar e o respectivo esqueleto craniofacial..	21
Figura 2. Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o transplante de osso autógeno da região da calvária nos animais do grupo 1.....	22
Figura 3. Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o osso bovino mineral sem e com o emprego das CTM (grupos 2 e 3).....	22
Figura 4. Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o α -TCP sem e com o emprego das CTM (grupos 4 e 5).....	23
Figura 5. Sujeito portador de FLP submetido a queiloplastia primária (esquerda) e pequeno fragmento de músculo <i>orbicularis-oris</i> inserido em meio de cultura específico (direita) antes de ser enviado para o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP).....	25
Figura 6. Característica morfológica de fibroblastos das células-tronco mesenquimais humanas vistos ao microscópio com aumento de 100x.....	28
Figura 7. Reação positiva aos marcadores de superfície das células-tronco mesenquimais.....	29
Figura 8. Reação negativa aos marcadores de superfície das células-tronco hematopoéticas.....	29
Figura 9. Fotografia intraoperatória da falha óssea alveolar e exposição dos tecidos moles.....	32
Figura 10. Região alveolar destacada do esqueleto craniofacial com a micro Serra recíprocante. Após os cortes ósseos para destacar a região alveolar (esquerda) e após a retirada do fragmento ósseo (direita).....	33
Figura 11. Exame de tomografia computadorizada realizado no primeiro dia após a cirurgia. A seta azul indica a falha óssea alveolar no primeiro dia após a cirurgia.....	39
Figura 12. Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo	

	1 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso autógeno.....	39
Figura 13.	Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 2 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso bovino mineral.....	40
Figura 14.	Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 3 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso bovino mineral e as CTM.....	40
Figura 15.	Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 4 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o α -TCP.....	41
Figura 16.	Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 5 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o α -TCP e as CTM.....	41
Figura 17.	Gráfico ilustrando a porcentagem de volume ósseo na falha óssea alveolar nos animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. (**demonstra a relevância estatística com $p < 0,05$ para a comparação entre os animais do grupo 1 e 2).....	44
Figura 18.	Gráfico ilustrando a porcentagem de volume de fibrose na falha óssea alveolar nos animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. A comparação entre o grupo 1 e os demais grupos demonstrou que o grupo de animais reparados com osso autógeno apresentou uma tendência estatística de formar menor quantidade porcentual de fibrose em comparação aos animais dos grupos 2 e 3 (respectivamente; $p = 0,06$ e $0,05$). Esta tendência não foi confirmada para a comparação entre os animais dos grupos 4 e 5 (respectivamente; $p = 0,3$ e $0,62$).....	45

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Sistema de pontos obtido por meio de avaliação qualitativa dos animais de todos os grupos submetidos à exame de tomografia computadorizada.....	42
Tabela 2. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 1.....	73
Tabela 3. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 2.....	73
Tabela 4. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 3.....	74
Tabela 5. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 4.....	74
Tabela 6. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 5.....	75

Raposo do Amaral, CEA. *Análise da neoformação óssea em transplantes de osso autólogo, osso bovino mineral e tricálcio fosfato com e sem o emprego de células-tronco mesenquimais humanas no reparo de falhas ósseas alveolares por meio de histomorfometria e imagens radiológicas: estudo experimental em ratos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: O método padrão de reparo de falhas ósseas é o transplante de osso autólogo. No entanto, novas técnicas de bioengenharia de tecido ósseo poderão substituir o método padrão. A construção de uma técnica em bioengenharia de tecido ósseo é feita pela associação entre fatores ou células indutoras de osso e biomateriais carreadores. O objetivo do presente trabalho foi mensurar a neoformação óssea em falha óssea alveolar de modelo animal após o reparo com fontes diferentes de bioengenharia de tecido ósseo e compará-las com o reparo com o osso autólogo transplantado da região craniana. **MÉTODOS:** Foi criada uma falha óssea na região alveolar de 28 ratos Wistar medindo 5 mm de diâmetro. Quatro modalidades de reparo foram comparadas ao método padrão: No grupo 1 (método padrão), as falhas ósseas foram reparadas com o transplante de osso autólogo da região parietal da calvária; nos grupos 2 e 3, as falhas ósseas foram reparadas com o biomaterial carreador osso bovino mineral sem e com o emprego de células-tronco mesenquimais humanas indiferenciadas, respectivamente; nos grupos 4 e 5, as falhas ósseas foram reparadas com o biomaterial carreador α -tricálcio fosfato sem e com o emprego de células-tronco mesenquimais humanas indiferenciadas, respectivamente. A neoformação óssea na falha alveolar foi aferida por meio de imagens de tomografia computadorizada e avaliação histomorfométrica após 8 semanas da cirurgia. A neoformação óssea obtida por meio da avaliação histomorfométrica possibilitou a comparação dos grupos 2, 3, 4 e 5 com o grupo 1. Foi criado um sistema de pontos para determinar a distribuição do osso na falha óssea alveolar por meio das imagens de tomografia computadorizada em cinco animais por grupo, sendo 1 ponto para ossificação parcial, 2 pontos para ossificação total e heterogênea e 3 pontos para ossificação total e homogênea. O índice de significância estatístico $p < 0,05$ foi determinado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. **RESULTADOS:** Na avaliação histomorfométrica, o grupo 1 apresentou $60,27\% \pm 16,13\%$ de osso na falha ($n=7$). Os grupos 2 e 3 apresentaram respectivamente, $23,02\% \pm 8,6\%$ ($n=3$)

($p=0,01$) e $38,35\% \pm 19,59\%$ ($n=5$) ($p=0,06$) de osso na falha. Os grupos 4 e 5 apresentaram respectivamente, $51,48\% \pm 11,7\%$ ($n=3$) ($p=0,30$) e $61,8\% \pm 2,14\%$ ($n=6$) ($p=0,88$) de osso na falha. Na avaliação radiológica, os animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram média de pontos respectivamente igual a 2; 1,4; 1,5; 1,6, 1,8.

CONCLUSÕES: O grupo de animais cujas falhas ósseas alveolares foram reparadas com α -tricálcio fosfato e células-tronco mesenquimais apresentou a neoformação óssea mais semelhante a do grupo de animais cujas falhas ósseas foram reparadas com osso autólogo.

Descritores: Células-Tronco; Fissura palatina; Transplante heterólogo; Transplante autólogo

Raposo do Amaral, CEA. *Analysis of bone formation of autogenous bone transfer, bovine bone mineral and tricalcium phosphate with and without mesenchymal stem cells in the repair of alveolar osseous defect using histomorphometry and radiological imaging*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012.

INTRODUCTION: The current criterion standard to repair bone defects is an autogenous bone transfer. However, bone engineering strategies may become the first choice in the future. Bone bioengineering strategies are created through the association of inductive factors, stem cells and biomaterial matrices. The objective of this study was to measure the bone formation in an alveolar osseous defect animal model using different bone tissue engineering strategies and to compare them with the autogenous bone transfer. **METHODS:** Alveolar circular bone defects measuring 5 mm of diameter were created in 28 Wistar rats. Four alternative modalities were compared to the traditional modality of autogenous bone transfer: In group 1 (traditional modality), defects were repaired with autogenous bone graft from the calvarial region; in groups 2 and 3, defects were repaired using bovine bone mineral free of cells and loaded with undifferentiated mesenchymal stem cells, respectively; in groups 4 and 5, defects were repaired with α - tricalcium phosphate free of cells and loaded with mesenchymal stem cells, respectively. Groups 2, 3, 4 and 5 were compared with group 1. Bone formation was evaluated by computed tomography imaging, and by histomorphometry at 8 weeks after surgery. Radiologically, a score system was developed to determine the bone distribution measured by computed tomography imaging in five animals of each group. Statistical significance was determined as $p < 0.05$ by the non-parametric statistical hypothesis test called the Mann-Whitney test. **RESULTS:** Histomorphometrically, group 1 showed $60.27\% \pm 16.13\%$ of bone in the defect ($n=7$). Groups 2 and 3 showed respectively, $23.02\% \pm 8.6\%$ ($n=3$) ($p=0.01$) and $38.35\% \pm 19.59\%$ ($n=5$) ($p=0.06$) of bone in the defect. Groups 4 and 5 showed respectively, $51.48\% \pm 11.7\%$ ($n=3$) ($p=0.30$) and $61.80\% \pm 2.14\%$ ($n=6$) ($p=0.88$) of bone in the defect. Radiologically, groups 1, 2, 3, 4 and 5 scored on average 2, 1.4, 1.5, 1.6, 1.8, respectively. **CONCLUSION:** The group of animals whose alveolar osseous defects

were repaired with α -tricalcium phosphate and mesenchymal stem cells showed the most similar bone formation to the group whose alveolar osseous defects were repaired with autogenous bone.

Descriptors: Stem Cells; Cleft palate; Heterologous transplantation; Autologous transplantation.

1. Introdução

1.1 Considerações gerais

O campo da bioengenharia de tecidos é uma área multidisciplinar que utiliza as ferramentas da engenharia em benefício da medicina e da biologia com objetivo de restaurar, manter e melhorar a função tecidual.¹ Langer e Vacanti¹ definiram os princípios da bioengenharia tecidual como a interação entre a tríade representada pela associação de biomateriais carreadores, células e/ou moléculas bioativas (fatores de crescimento e proteínas), as quais combinadas podem regenerar tecidos.

Endoderma, mesoderma e ectoderma são os tecidos embriológicos que dão origem às células-tronco.²

O endoderma dá origem a tecidos do trato gastrointestinal, fígado, pâncreas, pulmões, faringe e tireóide. O mesoderma dá origem a tecidos musculares, ósseos, cartilaginosos, ao sistema cardiovascular, urogenital, derme e tecido conectivo. A ectoderme dá origem à epiderme, ao sistema nervoso central e periférico.²

As células-tronco mesenquimais (CTM) são definidas como um grupo heterogêneo de células cuja origem é o mesoderma e são encontradas em inúmeros tecidos.³ O Comitê de células-tronco da "*International Society for Cellular Therapy*" estabeleceu três características principais para definir as células-tronco mesenquimais.^{3, 4}

1. As CTM podem ser expandidas em meio de cultura específico.
2. A caracterização imunofenotípica das CTM é estabelecida pela reação positiva dos seguintes marcadores de células mesenquimais, que são considerados marcadores chaves: CD73, CD90, CD105, como

também reação negativa para os seguintes marcadores de células hematopoéticas: CD45 e CD34.⁵ As CTM também podem apresentar reação positiva para outros marcadores de células mesenquimais, que são: STRO-1, CD20, CD29, CD44, CD71, CD73, CD90, SH2/CD105, SH3, CD106, CD120a e CD124, como também reação negativa aos seguintes marcadores de células hematopoéticas: CD11b/CD79 e CD19/HLA-DR.

3. As CTM são capazes de se diferenciar *in vitro* em pelo menos três tipos de células: osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

As CTM exercem um papel fundamental dentro do campo da bioengenharia de tecidos ósseos (BTO) e têm sido exploradas pelos pesquisadores que as utilizam com objetivo de estimular a neoformação óssea em modelo animal contendo falha óssea induzida mecanicamente,⁶⁻⁹ uma vez que elas também apresentam a capacidade de se replicar em diferentes tipos de tecidos *in vivo*, atendendo à especificidade do tecido receptor que sofreu injúria, sem a necessidade de diferenciação celular prévia.¹⁰

As CTM podem ser extraídas de inúmeras fontes doadoras. A seleção das fontes doadoras, bem como o processo de extração e manuseio das CTM devem atender a cinco critérios já estabelecidos:¹¹

1. As fontes doadoras de CTM devem oferecer células em quantidade maior do que 1 bilhão de células por extração.
2. O processo de extração das CTM deve ser feito por meio de procedimentos minimamente invasivos.

3. As CTM extraídas devem ser capazes de se diferenciar em pelo menos quatro tipos de tecidos de maneira controlada e por meio de técnicas que possam ser reproduzidas.
4. As CTM devem estar aptas a serem transplantadas de maneira autóloga (transplante de tecidos entre o mesmo indivíduo) ou heteróloga (transplante de tecidos entre seres de espécie diferente).
5. O processo de isolamento, cultivo e caracterização das CTM deve ser realizado por meio de técnicas e estratégias de engenharia tecidual que obedeçam a critérios validados pela comunidade internacional.

As fontes de CTM mais tradicionais e que atendem aos critérios descritos são o aspirado de medula óssea, a gordura, a polpa dentária e a musculatura esquelética.⁵ Uma breve descrição sobre o histórico das fontes mais tradicionais de CTM é feita abaixo:

1.2 Fontes de células-tronco

1.2.1 Aspirado de medula óssea

Friedenstein et al,^{12, 13} em 1968, caracterizaram as CTM derivadas da medula óssea e mais recentemente sua capacidade de se replicar em múltiplos tecidos foi definida.^{14, 15} Atualmente, a medula óssea é identificada como a fonte mais utilizada para a extração de CTM adultas,¹⁶ uma vez que permite a retirada de um alto número de células, com baixa morbidade para a área doadora. As regiões

anatômicas amplamente utilizadas como área doadora são a crista ilíaca e a cabeça do fêmur.¹⁶ As CTM podem ser de natureza autóloga ou heteróloga.

Células autólogas ou autógenas são aquelas transferidas de uma região para outra em um mesmo indivíduo, e células heterólogas ou xenógenas são aquelas transferidas entre indivíduos de espécies diferentes.

Estas CTM de natureza autógena e xenógena derivadas da medula óssea foram associadas aos biomateriais carreadores para reparar falhas ósseas em modelos animais.^{9, 17-19}

A aplicabilidade clínica desta fonte de CTM da medula óssea cresceu devido à facilidade e comodidade de sua obtenção na população adulta, bem como pela sua alta capacidade de diferenciação tecidual.²⁰ No entanto, as vantagens técnicas advindas da fácil obtenção de células por meio de procedimentos clássicos e conservadores não podem ser estendidas à população infantil. A alta morbidade cirúrgica da retirada de CTM da crista ilíaca ou dos membros inferiores de crianças impede a utilização rotineira desta fonte de CTM nesta população.

1.2.2 Gordura

A presença de CTM na gordura foi inicialmente descrita por Rodbell²¹ em 1964 e caracterizadas por Zuk et al.^{22, 23} Algumas subpopulações de células de gordura também expressam reação positiva aos marcadores CD44, CD105 e STRO1.²⁴ Portanto, estas células são multipotentes e capazes de se diferenciar em gordura, músculo, osso e cartilagem, e vêm sendo utilizadas para reparar falhas

ósseas induzidas em modelo animal.^{6, 7} Elas são particularmente interessantes para o campo da bioengenharia de tecidos ósseos, uma vez que podem ser extraídas por meio de lipoaspiração, um procedimento relativamente simples e com baixa morbidade. Lee et al.²⁵ conduziram um estudo pioneiro para demonstrar a indução da neoformação óssea em falhas ósseas críticas na calvária de ratos com o uso de CTM derivadas da gordura. Os dados desse estudo demonstraram neoformação óssea no período de tempo de 8 semanas após a cirurgia de confecção da falha óssea. Embora esse estudo pioneiro não tenha quantificado o volume ósseo neoformado presente na falha óssea induzida,²⁵ este foi o primeiro passo para determinar o período ideal de sacrifício dos animais, como também a potencial aplicabilidade das células-tronco mesenquimais derivadas da gordura para regeneração de falhas ósseas críticas.

Cowan et al.²⁶ foram os primeiros autores a utilizar as CTM derivadas da gordura para reparar falhas ósseas de crânios de ratos e, desde então, diferentes protocolos e densidades celulares têm sido utilizadas no campo da bioengenharia de tecidos ósseos. Mais recentemente, o grupo da "*University of California Los Angeles*" (UCLA) demonstrou que as CTM derivadas da gordura não apresentaram boa capacidade de indução da neoformação de osso em falhas ósseas em fêmures de modelo animal.²⁷ Portanto, novas fontes de CTM com potencial para induzir a neoformação de osso devem ser identificadas e testadas em modelo animal.

1.2.3 Polpa dentária

A polpa dentária e os tecidos periodontais foram identificados como fonte doadora de CTM. As CTM isoladas de dentes foram capazes de se diferenciar em gordura, músculo, osso e cartilagem.²⁸⁻³⁰ Trata-se de uma fonte interessante para a bioengenharia de tecido ósseo, uma vez que sua capacidade de replicação se assemelha à capacidade de replicação das CTM derivadas da medula óssea.³¹ Portanto, as células extraídas destes dentes decíduos poderão ser utilizadas dentro do campo da bioengenharia de tecidos ósseos para reabilitar falhas ósseas de crianças portadoras de anomalias congênitas ou vítima de acidentes.

1.2.4 Musculatura esquelética

O tecido muscular corresponde aproximadamente a 30-40% da massa total do corpo e tem sido reconhecido como fonte de CTM adultas de fácil acesso.³² As CTM podem ser isoladas da musculatura esquelética por meio de pequenos fragmentos obtidos por biópsia. Após o isolamento, essas células normalmente apresentam características morfológicas de fibroblastos. No entanto, inúmeros autores³³⁻³⁶ demonstraram o perfil imunofenotípico dessas CTM obtido por meio de avaliação por citometria de fluxo, que revelou reação positiva para os marcadores de células mesenquimais e negativo para os marcadores de células endoteliais e hematopoéticas.

Essa fonte foi utilizada para regenerar a musculatura esquelética de animais portadores de distrofia muscular progressiva de Duchenne.³⁷

Nosso grupo de pesquisa isolou e caracterizou CTM derivadas de pequenos fragmentos de músculo *orbicularis-oris* de crianças portadoras de fissura lábio-palatina obtidas durante a cirurgia de queiloplastia primária.³⁸ Após o estabelecimento do perfil imunofenotípico das CTM derivadas do músculo *orbicularis-oris*, essas células foram associadas a biomateriais carreadores para regenerar tecidos ósseos em falhas ósseas mecanicamente induzidas em crânios de ratos.³⁹

1.3 Biomateriais carreadores

Os biomateriais carreadores devem apresentar quatro características básicas para possibilitar a neoformação de osso na falha óssea: 1. Capacidade de preencher falhas ósseas tridimensionais; 2. Promover um fechamento temporário dentro da falha óssea nas fases iniciais de ossificação; 3. Permanecer inerte e estável no sítio receptor; 4. Promover a indução óssea por meio de liberação de células ou agentes indutores.⁴⁰⁻⁴² Essas quatro características dos biomateriais direcionadas à bioengenharia de tecido ósseo são definidas pelas propriedades de osteocondução e osteoindução.⁴³

Osteocondução é o processo pelo qual o tecido ósseo cresce das margens de uma falha óssea sobre um biomaterial carreador, ocorrendo migração das células

osteoprogenitoras.^{44, 45} As propriedades de osteocondução são encontradas no osso autógeno, osso bovino mineral e biomateriais cerâmicos.⁴⁶

Osteoindução é definida como a indução de células progenitoras não diferenciadas que não estão comprometidas com a linhagem osteogênica a formar células osteoprogenitoras.⁴⁵ O fenômeno da osteoindução é definido pela capacidade de um agente composto pela associação de células-tronco e/ou moléculas indutoras e biomateriais carreadores de induzir a formação de osso em regiões extraesqueléticas ectópicas, onde não existem células progenitoras comprometidas com a linhagem osteogênica.^{45, 47}

A composição química de um biomaterial carreador é de fundamental importância no estímulo à neoformação óssea. A densidade dos poros aproximando-se de 90% e o tamanho dos poros medindo entre 300 a 500 μm facilitam o transporte de células, bem como a liberação e osteoindução no leito receptor.^{42, 48}

Os biomateriais cerâmicos e osso bovino mineral são considerados substitutos ósseos e frequentemente utilizados na bioengenharia de tecidos para carrear células e moléculas indutoras.⁴⁹⁻⁵⁴

A hidroxiapatita^{55, 56}, o α -tricálcio fosfato (α -TCP)⁵⁷⁻⁵⁹ e o β -tricálcio fosfato (β -TCP)⁶⁰ são os principais representantes da família de biomateriais cerâmicos. O α -TCP e o β -TCP são os principais representantes do subgrupo fosfato de cálcio da família dos cerâmicos, que estão recebendo contínua atenção devido a sua grande aplicabilidade dentro das técnicas de BTO.⁴² Em 1920, Albee⁶¹ foi o primeiro autor a demonstrar o reparo de falhas ósseas nos membros inferiores de cachorros obtido por meio da utilização do β -tricálcio fosfato e, desde o século passado, os biomateriais compostos por fosfato de cálcio são frequentemente utilizados em cirurgias

ortopédicas e crânio-maxilo-faciais.^{62, 63} A capacidade osteoindutora dos fosfatos de cálcio também já foi demonstrada por meio de sua inserção em tecidos musculares⁶⁴ de modelos animais.

O α -tricálcio fosfato (α -TCP) e o β -tricálcio fosfato (β -TCP) apresentam estrutura química semelhante, mas diferem em sua estrutura cristalina (α -Ca₃(PO₄)₂ e β -Ca₃(PO₄)₂) e por este motivo apresentam período de tempo de absorção *in vivo* diferente.⁶⁵ O α -TCP é absorvido em menor período de tempo que o β -TCP.⁶⁵

Recentemente, Grandi et al.⁶⁶ compararam o efeito osteocondutor e osteoindutor de ambos os biomateriais (α -TCP e β -TCP) no reparo de falhas ósseas na região craniana de ratos e encontraram um volume de osso neoformado de 50,29% após 120 dias da cirurgia para o grupo de animais reparados com o α -TCP e 48,50% para o grupo de animais reparados com o β -TCP. Os valores elevados de volume de osso neoformado presente nas falhas ósseas dos animais reparados com ambos os biomateriais compostos por fosfato de cálcio enfatizam as qualidades de suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e biocompatíveis, o que os torna uma boa opção para o transporte de células-tronco mesenquimais e/ou de moléculas indutoras de osso e uma alternativa promissora dentro do campo da bioengenharia tecidual.⁶⁵

O osso bovino mineral é frequentemente utilizado como substituto ósseo para reparar falhas ósseas em estudos experimentais e clínicos.⁶⁷⁻⁶⁹ Um produto constituído por osso bovino mineral é comercializado sob o nome comercial de Bio-oss collagen[®].⁷⁰ Trata-se de um produto inorgânico, desproteinado e sintetizado a uma reação de 300°C, com objetivo de eliminar os componentes orgânicos.⁷¹ Existem dados conflitantes na literatura sobre a presença de proteínas e materiais

orgânicos na constituição química do biomaterial Bio-oss collagen[®].⁷¹ A arquitetura desse biomaterial consiste em poros largos de diferentes tamanhos que variam de 300-1500 μm , espaços intra-cristalinos que variam de 3 a 26 nm em sistemas interconectados resultando em porosidade de 70-75% com área de superfície interna de 100 m^2/g .⁷⁰ Devido a essa característica física, esse biomaterial pode ser utilizado para transportar e liberar CTM e moléculas indutoras para o sítio receptor em humanos.^{70, 72} Alguns estudos sugerem que esse biomaterial tem a capacidade de facilitar a diferenciação *in vivo* de células osteoprogenitoras por meio da liberação de proteínas indutoras de osso.⁷²

1.4 Conceito de falha óssea crítica

Em 1986, Schmitz e Hollinger⁷³ definiram o termo "falha óssea crítica" como a menor falha óssea possível que não apresenta neoformação óssea completa e espontânea ao longo da vida do animal ou do indivíduo. Três variáveis podem alterar o volume de osso neoformado em uma falha óssea: 1) A espécie do animal; 2) A idade do animal ou indivíduo; 3) A região anatômica onde foi realizada a falha óssea.^{74, 75}

Animais menores e com metabolismo mais acelerado como os ratos apresentam o período de tempo para a neoformação óssea após a confecção de uma falha óssea significativamente menor do que indivíduos da espécie humana.^{74, 75} Da mesma maneira, indivíduos mais jovens tendem a apresentar menor período de tempo para a neoformação óssea em uma falha óssea em comparação a indivíduos

mais velhos da mesma espécie.^{74, 75} Aalami et al.⁷⁶ compararam o volume de osso de falhas ósseas circulares medindo 3mm, 4mm e 5mm na calvária de animais jovens com 6 dias de idade com animais mais velhos, com 60 dias de idade. Os animais foram sacrificados após 8 semanas de cirurgia e submetidos a exame de imagem e histologia com objetivo de mensuração do volume de osso neoformado dentro da falha óssea. Os autores identificaram uma capacidade de neoformação óssea significativamente maior para os animais jovens em comparação aos animais mais velhos nas falhas ósseas dos três diferentes tamanhos.

O volume de osso neoformado em uma falha óssea também depende da região anatômica do animal. Falhas ósseas induzidas na região da calvária sob a influência da dura-máter e periósteo também tendem a apresentar volume de osso neoformado significativamente maior do que falhas ósseas em outras regiões, como, por exemplo, a região maxilar e alveolar sem a influência do efeito osteoindutor da dura-máter.⁷⁷ Essas três variáveis relacionadas ao modelo animal podem interferir no sucesso de uma terapia de bioengenharia de tecidos ósseos. Portanto, a padronização das dimensões de uma falha óssea induzida, bem como da espécie e idade do modelo animal são essenciais para testar fontes promissoras de CTM e novos biomateriais carreadores.

1.5 O emprego de técnicas de bioengenharia de tecido ósseo: a necessidade clínica

Pacientes portadores de deformidades craniofaciais necessitam de reconstruções complexas do esqueleto craniofacial. Atualmente, as falhas ósseas presentes nesses pacientes são preferencialmente tratados por meio de transplantes de osso autógeno.⁷⁸

A fissura lábio-palatina (FLP) é a deformidade craniofacial congênita mais prevalente e apresenta uma ampla variabilidade clínica. Dentro deste amplo espectro clínico, todos os pacientes portadores de fissura no palato primário irão necessitar de transplante de osso em alguma etapa da vida para a sua completa reabilitação. O transplante de osso na população portadora de fissura lábio-palatina é normalmente realizado entre 7 e 9 anos de idade, quando o dente canino está próximo a sua irrupção.⁷⁹ Esta etapa do protocolo de tratamento é crucial pois permite o alinhamento ósseo da arcada alveolar, além de permitir suporte ósseo para a região nasal. No entanto, as áreas doadoras de enxertos na população infantil são escassas.⁷⁸ A retirada cirúrgica de enxertos ósseos pode aumentar a morbidade da cirurgia, levando à dor, infecção, e demora na recuperação e deambulação do paciente no período pós-operatório.⁸⁰⁻⁸² Além disso, baixos índices de sucesso na integração do enxerto ósseo na região alveolar têm sido relatados nos pacientes portadores de fissura lábio-palatina.^{83, 84} Muitos pacientes necessitam de uma segunda ou terceira cirurgia de transplante ósseo para a fissura alveolar, com objetivo de levar um aporte adicional de osso para o estabelecimento completo da arcada óssea alveolar.^{81, 85, 86}

A bioengenharia de tecido ósseo poderá substituir o tratamento padrão realizado por meio do transplante de osso autógeno e diminuir significativamente a morbidade da cirurgia e evitar a necessidade de áreas doadoras de enxertos ósseos.

1.6 Os princípios da construção de uma técnica em bioengenharia de tecidos

Os princípios da construção de uma técnica dentro do campo da bioengenharia de tecido podem ser divididos didaticamente em cinco etapas: 1. Seleção e processamento do biomaterial carreador; 2. Isolamento e caracterização das células-tronco *in vitro*; 3. Inoculação de células-tronco de natureza autógena ou xenógena ou de bio-fatores dentro dos biomateriais carreadores; 4. Reimplante cirúrgico da terapia tecidual escolhida no modelo experimental; e 5. Período de assimilação da terapia tecidual escolhida.^{1, 87-91}

Atualmente, todos os esforços dos pesquisadores são direcionados a maximizar a neoformação de tecido ósseo no ambiente receptor e diminuir a morbidade da cirurgia, evitando a retirada de tecidos de uma área doadora. Portanto, esse objetivo pode ser alcançado por meio da otimização da eficácia de cada uma das cinco etapas.⁵

A escolha da região anatômica da falha óssea induzida em modelo animal é uma pré-etapa crucial na definição de possíveis fontes de bioengenharia de tecidos ósseos. Portanto, fontes alternativas de BTO destinadas a substituir o enxerto ósseo alveolar no tratamento de crianças portadoras de fissura lábio-palatina devem ser testadas previamente em região alveolar do modelo animal. A avaliação do comportamento dessas fontes de BTO por meio de sua inserção em falhas ósseas induzidas em modelo animal é uma etapa obrigatória antes da referida técnica ser considerada para uso em humanos.

Nguyen et al.⁹² foram os pioneiros a padronizar falhas ósseas alveolares em ratos com arquitetura retangular e dimensões de 7X4X3 mm. Quatro grupos de quatro animais foram sacrificados nos períodos de tempo de 0, 4, 8 e 12 semanas respectivamente. A quantificação do osso neoformado na falha óssea por meio de microtomografia computadorizada demonstrou a presença de volume ósseo de 43%, 53% e 48% para os respectivos períodos de tempo de 4, 8 e 12 semanas. Nosso grupo de pesquisa simultaneamente também padronizou uma falha óssea na região alveolar de ratos adultos da raça Wistar com dimensões semelhantes e quantificou o volume de osso neoformado por meio de tomografia computadorizada.⁹³

O objetivo do nosso grupo foi inicialmente encontrar um modelo animal de pequeno porte, de fácil armazenamento e manipulação e que pudesse mimetizar as falhas ósseas alveolares presentes nas crianças portadoras de fissura lábio-palatina unilateral completa. Previamente ao desenvolvimento do modelo animal, nosso grupo de pesquisa direcionou os esforços para cumprir a primeira etapa da construção de uma nova técnica de bioengenharia de tecidos ósseos que pudesse ser utilizada durante a reabilitação das crianças portadoras de FLP. A primeira cirurgia do protocolo de tratamento destas crianças é a queiloplastia primária.⁹⁴ Durante essa cirurgia, o cirurgião tem a oportunidade de retirar microfragmentos de músculo *orbicularis-oris*, que são usualmente descartados no reparo final do vermelho labial.³⁸ Esses fragmentos são enviados ao laboratório, submetidos a procedimentos específicos de lavagem e subsequentemente inseridos em placa de Petri e meio de cultura específico para que haja a liberação das células com características morfológicas de fibroblastos.³⁸

A segunda etapa da construção de nossa técnica de bioengenharia de tecidos ósseos foi a caracterização imunofenotípica das células com as características morfológicas de fibroblastos. Subsequentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as células apresentavam reação positiva para os marcadores celulares de células mesenquimais e reação negativa para os marcadores celulares de células hematopoéticas e endoteliais por meio de citometria de fluxo. Além disso, as células foram capazes de se diferenciar em pelo menos quatro tecidos: gordura, músculo, osso e cartilagem. Portanto, as presentes células apresentaram perfil imunofenotípico de células-tronco mesenquimais humanas adultas.³⁸

Seong et al.¹⁰ descreveram um trabalho de revisão de literatura sobre as fontes promissoras de bioengenharia de tecidos e reconheceram o pioneirismo do nosso grupo de pesquisa ao descrever o protocolo de identificação, isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais adultas derivadas do músculo *orbicularis-oris* de crianças portadoras de FLP. Portanto, nosso grupo de pesquisa, convencido de que esta nova fonte de BTO poderia ser utilizada para induzir a neoformação de osso na falha óssea alveolar de crianças portadoras de FLP, seguiu para a terceira etapa da inoculação de células-tronco mesenquimais adultas dentro dos biomateriais carreadores.⁹⁵

Os biomateriais carreadores eleitos foram o osso mineral de origem bovina e α -tricálcio fosfato. Ambos os biomateriais carreadores apresentam características osteocondutoras e alguns estudos demonstraram a capacidade química desses biomateriais carreadores de facilitar a diferenciação celular e de permanecer estáveis e inertes em um sítio anatômico receptor.^{43, 96}

Modelos de animais não imunossuprimidos estão sendo utilizados para testar abordagens envolvendo técnicas de BTO com a presença de células-tronco mesenquimais humanas.^{39, 97} Essas células apresentam a capacidade de secretar fatores que inibem a resposta imunogênica do receptor.^{98, 99} Portanto, tais células não provocam rejeição do receptor.⁹⁸⁻¹⁰⁰ Por esse motivo, torna-se provável que modalidades alternativas de BTO possam suplantiar a atual utilização de osso autógeno para o tratamento de falhas ósseas alveolares em animais. No entanto, revisões sistemáticas recentes da literatura ainda apontam controvérsias sobre a técnica de BTO mais efetiva para ser utilizada em falhas ósseas induzidas em modelos animais.^{101, 102} Portanto, a técnica de BTO a ser considerada padrão para o reparo de falhas ósseas alveolares ainda está por ser descrita.

A elaboração de uma nova fonte de BTO é um processo lento, trabalhoso e depende do esforço de um grupo de pesquisa multidisciplinar com profissionais especializados nas áreas básicas e clínicas. As três etapas elementares para a sua confecção foram previamente validadas. Esse trabalho foi realizado com o objetivo de concluir as duas últimas etapas para a construção de uma nova técnica de BTO que pudesse ser direcionada ao tratamento de falhas ósseas alveolares de ratos que mimetizam a situação clínica existente nas crianças portadoras de fissura lábio-palatina.

2. Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi mensurar a neoformação óssea em falha óssea alveolar de modelo animal após o reparo com osso bovino mineral e tricálcio fosfato com e sem o emprego de células-tronco mesenquimais humanas e compará-las com o reparo com o osso autógeno transplantado da região craniana.

3. Métodos

3.1 Desenho do estudo

Estudo experimental prospectivo do tipo caso-controle envolvendo 28 ratos submetidos à reparação de falhas ósseas na região alveolar.

3.2 Casuística/Amostra

Para o experimento, foram selecionados ratos adultos (*Rattus Norvegicus Albinus*), da linhagem Wistar, machos, com o peso variando entre 300 a 370g.

Figura 1- Ratos da linhagem Wistar e o respectivo esqueleto craniofacial

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com o controle de temperatura, ciclo de luz e umidade ambiente. Ratos da linhagem Wistar, não imunossuprimidos, foram divididos em 5 grupos. Grupo 1, as falhas ósseas foram reparadas com o transplante do osso autógeno da região parietal (n=7).

Figura 2- Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o transplante de osso autólogo da região da calvária nos animais do grupo 1

No grupo 2, as falhas ósseas foram reparadas com o osso bovino mineral (n=5); no grupo 3, as falhas ósseas foram reparadas com o osso bovino mineral com o emprego das CTM (n=5);

Figura 3- Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o osso bovino mineral, sem e com o emprego das CTM (grupos 2 e 3)

Figura 4- Desenho esquemático ilustrando o reparo da falha óssea alveolar com o α -TCP, sem e com o emprego das CTM (grupos 4 e 5)

No grupo 4, as falhas ósseas foram reparadas com o α -TCP (n=5); no grupo 5, as falhas ósseas foram reparadas com o α -TCP com emprego das CTM (n=6).

3.3 Modelo de preparo das células-tronco mesenquimais humanas

O modelo de preparo das células-tronco mesenquimais humanas passou pelas seguintes etapas: coleta dos tecidos de sujeitos portadores de fissura lábio-palatina, isolamento das células, cultura das células, caracterização das células, preparação dos biomateriais, inoculação das células nos biomateriais. As características de cada uma das etapas deste preparo estão descritas abaixo:

3.3.1 Coleta dos tecidos de sujeitos portadores de fissura lábio-palatina

Os sujeitos portadores de fissura lábio-palatina aos 3 meses de idade são anestesiados para serem submetidos à primeira cirurgia do tratamento do paciente portador de fissura lábio-palatina, que é a queiloplastia primária. Ao término da cirurgia, realiza-se uma manobra operatória de rotação de retalhos na região do vermelho labial com objetivo de diminuir a retração cicatricial que é relativamente frequente nos pacientes submetidos à queiloplastia primária pela técnica de Millard e suas variações.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Ao realizar essa técnica de sutura do vermelho labial, um pequeno fragmento do vermelho labial contendo o músculo *orbicularis-oris* é comumente descartado. Esse pequeno fragmento é colocado em meio de cultura de PBS e enviado no mesmo momento ao laboratório de Biociências da Universidade de São Paulo. O período de tempo da retirada do material, inserção no meio de cultura, transporte do material e chegada no laboratório foi menor que 4 horas para todas as amostras.

Figura 5- Sujeito portador de FLP submetido a queiloplastia primária (esquerda) e pequeno fragmento de músculo *orbicularis-oris* inserido em meio de cultura específico (direita) antes de ser enviado para o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (USP)

Foram selecionados ao acaso 20 sujeitos portadores de fissura lábio-palatina não sindrômicos, com ausência de infecções sistêmicas e locais. Os pais foram devidamente informados sobre o destino do fragmento de músculo *orbicularis-oris* e assinaram termo de consentimento livre-esclarecido de acordo com o Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (nº 037/2005).

3.3.2 Identificação e isolamento de células-tronco do músculo *orbicularis-oris* de sujeitos portadores de fissura lábio-palatina

Os tecidos musculares das amostras de tecido muscular de 3 sujeitos com fissura lábio-palatina, com 3 meses de idade foram selecionados aleatoriamente entre amostras de tecido muscular de 20 sujeitos com fissura lábio-palatina para a etapa de caracterização do perfil imunofenotípico das células.

3.3.3 Cultura das células

As linhagens celulares dos três sujeitos portadores de FLP foram incluídas em meio específico composto por D-MEM=F12 (Invitrogen[®]) associado a soro fetal bovino 15% (FBS; Hyclone, Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamine, 2 mM de aminoácidos não essenciais (Invitrogen[®]), 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (Invitrogen[®]). A troca do meio foi realizada a cada três dias por outro meio semelhante. Esse protocolo de cultura de células já foi previamente descrito por nosso grupo de pesquisa em estudos anteriores.^{38, 39}

3.3.4 Processo de caracterização do perfil imunofenotípico das células-tronco derivadas do músculo *orbicularis-oris*

O processo de caracterização do perfil imunofenotípico das células advindas do músculo *orbicularis-oris* de sujeitos portadores de FLP foi realizado com auxílio do aparelho citômetro de fluxo (Guava Technologies[®], Hayward, CA) com emissão de ondas que variam de 488 a 532 nm. Nesse processo, as células são alinhadas pelo citômetro e analisadas uma a uma por um feixe de *laser* capaz de detectar a fluorescência emitida pelas células. As linhagens foram cultivadas até a obtenção do número satisfatório de células com uma concentração de $1,0 \times 10^6$ cels/mL, emergidas e coradas em uma concentração de anticorpos específicos. Após 45 minutos de incubação em sala escura e temperatura ambiente, as células foram removidas da superfície da placa de cultivo utilizando tripsina e lavadas por três vezes com o meio PBS (Gibco, Invitrogen[®], Carlsbad, CA). As células-tronco mesenquimais apresentaram inicialmente característica morfológica de fibroblasto, visto ao microscópio.

Figura 6- Característica morfológica de fibroblastos das células-tronco mesenquimais humanas vistos ao microscópio com aumento de 100x

Em seguida, as células foram incubadas com os seguintes anticorpos primários: CD29-PE-Cy5, CD31-PE, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-R-PE, CD105-PE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). As células incubadas apresentaram reação positiva aos marcadores de células mesenquimais CD73-PE, CD90-R-PE e CD105-PE e reação negativa aos marcadores de células hematopoéticas CD29-PE-Cy5, CD31-PE, e CD45-FITC. Os sinais gerados foram interpretados por um sistema computacional que os transformou em dados e permitiu as análises.

Figura 7- Reação positiva aos marcadores de superfície das células-tronco mesenquimais

Figura 8- Reação negativa aos marcadores de superfície das células-tronco hematopoéticas

3.3.5 Preparação dos biomateriais

O biomaterial com a estrutura química formada de osso bovino mineral sob a apresentação comercial de Bio-oss collagen[®] de 100mg, (Geistlich Pharmaceutical, Wolheisen Switzerland) foi utilizado neste estudo. Os biomateriais foram comprados pelos pesquisadores das empresas fabricantes. Os biomateriais apresentam

consistência esponjosa e aspecto tridimensional pesando 100 mg. O biomaterial foi dividido em três partes iguais (33mg) antes da sua associação com as CTM.

Os biomateriais α -TCP (Labiomat[®], Brasil) foram doados pelos fabricantes. Esse biomaterial consiste em pó (75% de α -TCP e 15% de cálcio sulfato hemidratado) que foi adicionado a uma solução contendo acelerador (2,5% de Na_2HPO_4) até a obtenção de uma substância de consistência sólida. As placas sólidas circulares de α -TCP foram customizadas à falha óssea medindo 5 mm de diâmetro.

3.3.6 Inoculação das células-tronco mesenquimais nos biomateriais carreadores

Cada um dos fragmentos do osso bovino mineral foi embebido em $1,0 \times 10^6$ cels/mL de CTM indiferenciadas e subsequentemente inserido em placa de Petri de 35-mm (Corning[®]). As CTM foram implementadas com 2,5mL de meio e incubados a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas antes da inoculação nos biomateriais carreadores. Esse período foi importante para permitir a aderência das CTM na superfície dos biomateriais.

O mesmo meio de PBS foi utilizado para embeber os biomateriais carreadores sem a presença das CTM. Os biomateriais também foram inseridos no meio 24 horas antes da cirurgia nos animais.

3.4 Modelo animal e técnica operatória

No período pré-operatório, os animais foram pesados e submetidos à tricotomia.

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraoperatória de anestésico (0,3 mL/100g de massa corporal) com hidrocloreto de quetamina a 5% associada ao xilazina a 2%. Os ratos foram colocados em posição lateral para o procedimento cirúrgico. O anestésico local composto por lidocaína com vasoconstritor à base de adrenalina (0,3 mL) foi utilizado para a anestesia local da mucosa oral dos animais, onde subsequentemente foi realizada uma incisão medindo 2 cm. Os músculos e o periósteo da maxila e do zigoma foram completamente descolados. Uma broca trefina medindo 5 mm de diâmetro, acoplada a um motor de alta rotação foi utilizada para criar a falha óssea circular na região alveolar medindo 5 mm de diâmetro.

Figura 9- Fotografia intraoperatória da falha óssea alveolar e exposição dos tecidos moles

Nos animais dos grupos 3, 5, 2 e 4, as falhas ósseas foram imediatamente reparadas com as técnicas de bioengenharia de tecidos ósseos previamente descritas (grupos 3 e 5) ou com os biomateriais sem o emprego das CTM (grupos 2 e 4).

Nos animais do grupo 1, foi realizada uma incisão na região da calvária. O periósteo foi dissecado e realizou-se uma craniotomia com a mesma broca trefina de diâmetro de 5 mm. Os fragmentos ósseos retirados da região da calvária foram transplantados para a região alveolar. A região da calvária permaneceu aberta e nenhum tipo de reparo foi realizado nesta região.

As suturas dos tecidos profundos e da pele foram realizadas em todos os animais utilizando-se fio de sutura Nylon[®] 5-0 (Ethicon[®]-Brasil).

O protocolo cirúrgico experimental foi descrito em trabalho preliminar em anexo (**Apêndice**).⁹³ A falha óssea na região alveolar foi modificada em relação ao trabalho inicial, no qual foi utilizada uma falha óssea retangular.

3.4.1 Período pós-operatório

Durante o período pós-operatório, os animais receberam alimentação pastosa por sete dias e dieta normal para animais nos dias subsequentes.

Os animais foram sacrificados após 8 semanas da cirurgia. Após o sacrifício, a região da falha óssea alveolar foi isolada e cortada com a microsserra (Aesculap[®], German) em forma de quadrado.

Figura 10- Região alveolar destacada do esqueleto craniofacial com a microsserra recíprocante. Após os cortes ósseos para destacar a região alveolar (esquerda) e após a retirada do fragmento ósseo (direita)

3.5 Preparação para histomorfometria: cortes dos fragmentos ósseos incluídos em blocos de acrílico de metilmetacrilato e coloração com azul de Toluidina.

Os fragmentos ósseos cortados foram embebidos em álcool desidratado a 70%, incluídos em metilmetacrilato e processados conforme técnica previamente descrita.¹⁰⁶ Utilizou-se um micrótomo de impacto com navalha de tungstênio e foram obtidos cortes de 5µm para a confecção das lâminas de histologia. Os fragmentos foram preparados e corados com azul de Toluidina a 0,1% e pH de 6,4. Os resultados foram mensurados de forma quantitativa e qualitativa.

3.5.1 Mensuração quantitativa da neoformação óssea na falha óssea alveolar realizada por meio de histomorfometria

As variáveis quantitativas foram obtidas por meio da mensuração histomorfométrica da neoformação óssea presente na falha óssea alveolar.

A mensuração realizada por meio de histomorfometria utilizou parâmetros diretos e indiretos da neoformação óssea que avaliaram respectivamente o porcentual de volume de osso presente na falha óssea alveolar (parâmetro direto) e o porcentual de volume de fibrose presente na falha óssea alveolar (parâmetro indireto). Os índices estatísticos histomorfométricos utilizados para a quantificação do volume ósseo da falha óssea alveolar foram obtidos por meio das seguintes razões representadas pela divisão entre o volume ósseo total presente na falha óssea alveolar após o período de tempo determinado e o volume total da falha óssea alveolar

(parâmetro direto de neoformação óssea). Da mesma maneira, o volume total de fibrose presente na falha óssea alveolar foi dividido pelo volume total da falha óssea alveolar (parâmetro indireto de neoformação óssea).

Os cortes foram analisados em microscópio óptico comum Nikon com 125x de aumento (Nikon[®], Japan) por meio da utilização de um método semiautomático com programa específico (Osteometrics Inc[®], Atlanta, GA). Os índices histomorfométricos apresentados no presente estudo são baseados nos índices histomorfométricos padronizados e recomendados pela "*American Society of Bone and Mineral Research*".^{107, 108}

Todo o processo de histomorfometria foi realizado no Laboratório de Fisiopatologia Renal da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.5.2 Mensuração qualitativa da neoformação óssea realizada por meio da avaliação das imagens radiológicas

As variáveis qualitativas foram obtidas por meio da observação do aspecto radiológico da neoformação óssea da falha óssea alveolar. Cinco animais por grupo foram submetidos a exames de tomografia computadorizada no período de 8 semanas após a cirurgia. Os exames foram realizados na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. O aparelho utilizado foi o tomógrafo da marca Shimadzu[®], modelo SCT-7800TC, geração helicoidal. A aquisição de imagens foi realizada com colimação de 1 mm e essas foram reconstruídas a cada 1 mm de toda a região craniofacial. A velocidade da mesa

foi de 2mm/s e o tempo de rotação do tubo foi de 1 segundo. Foram realizados 56 cortes por exame.

Os exames foram realizados com os animais anestesiados (0,3 mL/100g de massa corporal) com hidrocloreto de quetamina a 5% associado ao xilazina à 2%.

As imagens foram reconstruídas com cortes de 01 mm por meio do programa Osirix Dicom Viewer[®] (Apple Inc. Website) software. As imagens com maior densidade foram interpretadas como tecido ósseo.

Por meio das imagens reconstruídas da tomografia computadorizada, identificaram-se as características da distribuição da ossificação em:

1. Distribuição total e homogênea
2. Distribuição total e heterogênea
3. Distribuição parcial

Atribuiu-se um sistema de pontos para cada uma das possíveis apresentações radiológicas da falha óssea alveolar, sendo 3 pontos para a distribuição total e homogênea, 2 pontos para a distribuição total e heterogênea e 1 ponto para a distribuição parcial. Os pontos foram dados por dois observadores de maneira cega e aleatória.

Os observadores foram orientados e calibrados quanto aos parâmetros radiológicos utilizados para a pontuação da seguinte forma:

A distribuição total e homogênea: ossificação completa e absolutamente uniforme da falha óssea alveolar.

A distribuição total e heterogênea: ossificação desorganizada com a presença de pequenas ou grandes depressões ósseas e/ou abaulamento ósseos na região da falha óssea alveolar.

A distribuição parcial: qualquer falha óssea remanescente de maior ou menor tamanho na região da falha óssea alveolar induzida mecanicamente.

A média de pontos dos dois observadores foi calculada para cada um dos grupos.

3.5.3 Avaliação estatística

Os dados foram descritos por meio das médias e respectivos desvios padrão. A significância estatística foi determinada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa SPSS versão 10.0 (SPSS[®], Inc., Chicago, Ill.). A avaliação estatística foi utilizada para comparar as mensurações realizadas por meio de histomorfometria entre o grupo 1 e os grupos 2, 3, 4 e 5.

A execução do presente estudo respeitou as devidas recomendações de proteção aos animais da Instituição, bem como as leis nacionais de uso de animais em laboratório. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais Vertebrados em Experimentação do Instituto de Biociências da Universidade Estadual de São Paulo (USP) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq), sob os respectivos números de protocolo (nº 076/2008; nº 0588/09). (**Apêndice**).

4. Resultados

4.1 Resultados da mensuração da neoformação óssea obtidos por meio da avaliação das imagens radiológicas

A distribuição do osso presente na falha óssea avaliada pela observação da tomografia computadorizada levou à seguinte pontuação média para os respectivos grupos: Grupo 1 (osso autógeno) (n=5): 2 pontos; grupo 2 (n=5) : 1,4 pontos; grupo 3 (n=5): 1,5 pontos; grupo 4 (n=5): 1,6 pontos e grupo 5 (n=5): 1,8 pontos. (**Tabela 1**).

Figura 11- Exame de tomografia computadorizada realizado no primeiro dia após a cirurgia. A seta azul indica a falha óssea alveolar no primeiro dia após a cirurgia

Figura 12- Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 1 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso autógeno

Figura 13- Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 2 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso bovino mineral

Figura 14- Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 3 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com o osso bovino mineral e as CTM

Figura 15- Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 4 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com α -TCP

Figura 16- Exames de tomografia computadorizada nos animais do grupo 5 após 8 semanas da cirurgia. A seta azul indica a região da falha óssea reparada com α -TCP e as CTM

Tabela 1- Sistema de pontos obtido por meio de avaliação qualitativa dos animais de todos os grupos submetidos à exame de tomografia computadorizada

	Animais	Observador 1	Observador 2	Média	Média do Grupo
Grupo 1	1	2	2	2	2
	2	2	2	2	
	3	2	2	2	
	4	2	2	2	
	5	2	2	2	
Grupo 2	1	1	1	1	1,4
	2	2	2	2	
	3	2	2	2	
	4	1	1	1	
	5	1	1	1	
Grupo 3	1	1	1	1	1,5
	2	2	2	2	
	3	2	2	2	
	4	1	2	1,5	
	5	1	1	1	
Grupo 4	1	1	1	1	1,6
	2	2	2	2	
	3	2	2	2	
	4	1	1	1	
	5	2	2	2	
Grupo 5	1	2	2	2	1,8
	2	1	1	1	
	3	2	2	2	
	4	2	2	2	
	5	2	2	2	

Grupo 1: osso autógeno (método padrão); Grupo 2: osso bovino mineral sem o emprego das CTM; Grupo 3: osso bovino mineral com o emprego das CTM; Grupo 4: α -TCP sem o emprego das CTM; Grupo 5: α -TCP com o emprego das CTM

4.2 Resultados da mensuração da neoformação óssea obtidos por meio das análises histomorfométricas

A mensuração dos parâmetros diretos da neoformação óssea obtida por meio da análise histomorfométrica das falhas ósseas mostraram um volume ósseo médio porcentual de $60,27\% \pm 16,13\%$ para o grupo 1 (n=7), $23,02\% \pm 8,6\%$ para o grupo 2 (n=3), $38,35\% \pm 19,59\%$ para o grupo 3 (n=5), $51,48\% \pm 11,7\%$ para o grupo 4 (n=3) e $61,80\% \pm 2,14\%$ para o grupo 5 (n=6). (**Anexo; Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6**).

A comparação entre os grupos 1 e 2 demonstrou relevância estatística favorecendo os animais do grupo 1 ($p=0,01$), cujas falhas ósseas foram reparadas com o transplante do osso autógeno da região parietal. No entanto, quando o grupo 1 foi comparado ao grupo 3, cujas falhas ósseas foram reparadas com o emprego do osso bovino mineral associado à presença de CTM, não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,06$). A comparação do grupo 1 com os grupos 4 e 5 não demonstrou diferença estatisticamente significativa (com valores de $p=0,30$ e $p=0,88$, respectivamente) e demonstrou o considerável volume ósseo encontrado nos dois últimos grupos (4 e 5).

Figura 17- Gráfico ilustrando a porcentagem de volume ósseo na falha óssea alveolar dos animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. (** demonstra a relevância estatística com $p < 0,05$ para a comparação entre os animais dos grupos 1 e 2)

Figura 18- Gráfico ilustrando a porcentagem de volume de fibrose na falha óssea alveolar nos animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5. A comparação entre o grupo 1 e os demais grupos demonstrou que o grupo de animais reparados com osso autógeno apresentou uma tendência estatística de formar menor quantidade porcentual de fibrose em comparação aos animais dos grupos 2 e 3 (respectivamente; $p=0,06$ e $0,05$). Essa tendência não foi confirmada para a comparação entre os animais dos grupos 4 e 5 (respectivamente; $p=0,3$ e $0,62$)

A mensuração da neoformação óssea dos parâmetros indiretos obtida por meio da análise histomorfométrica também demonstrou uma formação média de fibrose de $3,89\% \pm 10,24\%$ para o grupo 1, comparado a $19,85\% \pm 7,04\%$ para o grupo 2 ($p=0,06$), $18,55\% \pm 12,41\%$ para o grupo 3 ($p=0,05$), $13,24 \pm 12,07\%$ para o grupo 4 ($p=0,30$) e $0,64\% \pm 1,56\%$ para o grupo 5 ($p=0,62$).

5. Discussão

Os dados do nosso estudo demonstraram que os animais do grupo 1 reparados com osso autógeno da região da calvária apresentaram aproximadamente 60% de osso neoformado presente na falha óssea alveolar em nosso modelo animal. Em contrapartida, a área doadora de osso da região da calvária permaneceu aberta durante o período do estudo. Essa falha óssea remanescente na área doadora representou uma desvantagem a essa opção terapêutica considerada padrão para o tratamento das falhas ósseas congênitas ou adquiridas.

Nos animais do grupo 2, cujas falhas ósseas foram reparadas com o biomaterial constituído por osso bovino mineral, foi encontrado o volume de osso neoformado de 23,02%. Os animais do grupo 1 mostraram uma capacidade de neoformação óssea estatisticamente maior do que os animais do grupo 2. Quando esse mesmo biomaterial foi associado às CTM nos animais do grupo 3, o volume de osso neoformado encontrado na falha óssea após o sacrifício dos animais foi de 38,35%. A comparação entre os animais do grupo 1 e do grupo 3 mostrou uma tendência estatística favorecendo a capacidade de neoformação óssea do grupo 1, com valor de $p=0,06$. Um maior número de animais no grupo 3 poderia ter tornado a comparação relevante do ponto de vista estatístico. A presença das CTM nos animais do grupo 3 aumentou em aproximadamente 15% a neoformação óssea em relação aos animais do grupo 2, demonstrando a capacidade osteoindutora das CTM.

Da mesma forma, nos animais do grupo 4, cujas falhas ósseas foram reparadas com o biomaterial constituído por α -TCP, foi encontrado o volume de osso de 51,48 %, e quando esse mesmo biomaterial foi associado às CTM nos animais do grupo 5, o volume de osso encontrado na falha óssea alveolar após o sacrifício dos animais foi de 61,8%. A neoformação óssea presente nos grupos 4 e 5 não diferiu

estatisticamente dos animais do grupo 1. Portanto, ambas as abordagens terapêuticas podem ser consideradas padrão e não estatisticamente diferentes da abordagem realizada com o transplante de osso autógeno. A presença das CTM nos animais do grupo 5 aumentou em aproximadamente 10% a neoformação óssea em relação aos animais do grupo 4, demonstrando a capacidade osteoindutora das CTM. O volume ósseo encontrado nos animais do grupo 5 foi semelhante a dos animais do grupo 1 (61,8% versus 60%, respectivamente). Os dados do presente trabalho mostraram que a neoformação óssea presente nas falhas ósseas alveolares obtida por meio da associação de α -TCP e CTM foi semelhante a neoformação óssea obtida por meio do transplante de osso autógeno, sem a morbidade da retirada de um enxerto ósseo de uma área doadora.

Nos humanos, o tratamento realizado para a falha óssea alveolar com o transplante de osso autógeno apresenta índices variados de sucesso. Nos pacientes portadores de fissura lábio-palatina, o restabelecimento completo da arcada óssea alveolar após o transplante de osso autógeno da crista ilíaca para a região alveolar ocorre em 41% a 70% dos pacientes.^{83, 84} Esses índices diminuem significativamente quando os pacientes não aderem ao tratamento, não realizam a ortodontia prévia e quando a cirurgia não é realizada em idade ideal, imediatamente antes da irrupção do dente canino.

Essas condições ideais de tratamento são frequentemente obtidas em países desenvolvidos. Nos países em desenvolvimento como o Brasil, com elevado contraste social e baixo índice de educação, um elevado número de pacientes não aderem ao tratamento multidisciplinar.¹⁰⁹ A falta de adesão dos pacientes ao tratamento diminui o índice de sucesso desta cirurgia, e frequentemente duas a três

cirurgias de transplante ósseo para a região alveolar são necessárias até a obtenção do objetivo final que é o realinhamento da arcada óssea alveolar.

Técnicas alternativas de BTO poderão otimizar o tratamento das crianças com falhas ósseas congênitas. A otimização pode ocorrer nas esferas clínicas por meio do aumento da indução da neoformação óssea após o tratamento com uma determinada técnica de BTO e também na esfera econômica com a diminuição da necessidade de duas a três cirurgias para o completo restabelecimento da arcada óssea alveolar, diminuindo o custo total do tratamento. Como a grande maioria dos pacientes é tratada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), uma técnica de BTO bem sucedida pode representar economia de recursos financeiros aos hospitais e ao Ministério da Saúde, que poderá realocar os recursos para outros setores da saúde.

Até o presente momento, os pesquisadores concentraram seus esforços para encontrar fontes de CTM derivadas da medula óssea e da gordura associadas a biomateriais carreadores capazes de regenerar falhas ósseas.^{9, 110, 111} No entanto, essas fontes de CTM não são facilmente obtidas na população infantil. Nosso grupo de pesquisa foi o primeiro a isolar e caracterizar CTM derivadas de tecidos comumente descartados durante o processo de reabilitação de crianças portadoras de fissura lábio-palatina.³⁸ O emprego desses tecidos como fonte de CTM não exige etapa cirúrgica adicional composta pelo processo de extração celular. As células extraídas de tecidos descartados durante a primeira cirurgia de queiloplastia primária poderão ser caracterizadas, armazenadas e utilizadas durante a segunda cirurgia do tratamento do paciente portador de fissura lábio-palatina que é a palatoplastia primária. Para que essa nova fonte de BTO seja definitivamente incorporada dentro

do protocolo convencional de reabilitação, ela deve ser previamente testada em modelo animal.

As falhas ósseas em modelos animais podem ser induzidas mecanicamente ou por meio de substância ou drogas com efeito teratogênico bem estabelecido.⁹² Drogas farmacológicas como fenitoína, ácido retinóico e corticóides foram descritas para este objetivo.¹¹²⁻¹¹⁷ Mais recentemente, a manipulação do gene Twirler (Tw/Tw) produziu animais com características imunofenotípicas semelhantes às dos pacientes portadores de FLP.^{118, 119} No entanto, essas técnicas produzem o nascimento de animais com fenótipo com grande variabilidade clínica, o que torna difícil a sua padronização para o uso em pesquisa experimental. Portanto, falhas ósseas induzidas mecanicamente e padronizadas em modelos animais de pequeno porte são hoje o método de escolha na aferição da eficácia de novas técnicas de BTO.¹²⁰

Três variáveis relacionadas ao modelo animal de falha óssea induzida são importantes na interpretação da efetividade de uma técnica de BTO.⁷⁴⁻⁷⁶ São elas: 1- A região anatômica do animal; 2- O período de tempo de neoformação óssea dos animais das diferentes espécies; 3- A idade do animal. Essas três variáveis são discutidas abaixo:

5.1 A região anatômica do animal

Neste estudo foi utilizado um modelo experimental previamente desenvolvido contendo falha óssea na região alveolar que pudesse mimetizar as falhas ósseas encontradas nos pacientes portadores de fissura lábio-palatina.⁹³ Trata-

se de um modelo experimental em animal de pequeno porte, de fácil manipulação e armazenamento. A arquitetura e dimensões ósseas da falha da região alveolar foi modificada em relação ao trabalho inicial, no qual foi utilizada uma falha óssea retangular.⁹³ No presente estudo, uma falha óssea circular de 5 mm de diâmetro foi utilizada devido à maior capacidade de padronização das dimensões em relação à falha óssea piloto anterior. Realizou-se um projeto piloto que não foi publicado com o objetivo de avaliar a capacidade de padronização de falhas ósseas na região alveolar de ratos com o uso da broca trefina circular e com a broca de desgaste. Seis ratos da linhagem Wistar, adultos, machos foram divididos em 2 grupos com 3 animais cada grupo. No primeiro grupo, 3 animais foram submetidos à confecção de falhas ósseas circulares realizadas com broca trefina medindo 5 mm de diâmetro e no segundo grupo, 3 animais foram submetidos à confecção de falhas ósseas retangulares com a broca de desgaste. Evidenciou-se que as falhas ósseas circulares realizadas com a broca trefina apresentaram menor variação em suas dimensões quando comparadas às falhas ósseas retangulares realizadas com a broca de desgaste. A partir dessa observação, optou-se pela padronização de falhas ósseas circulares com a broca trefina com diâmetro de 5 mm.

As regiões anatômicas utilizadas como parâmetros para a confecção da falha óssea em região alveolar foram o arco zigomático, a órbita e raiz dos dentes incisivos centrais, que são visualizados por meio de saliência óssea na região alveolar. Essa localização anatômica próxima à região oral e via aérea torna a região operada suscetível à infecção e perda do material enxertado. No entanto, a falha óssea presente nessa região também mimetiza com fidedignidade a situação clínica existente nos pacientes portadores de FLP que também ficam susceptíveis à infecção

e subsequente perda do material enxertado depois das cirurgias. Durante o tratamento dos pacientes portadores de FLP, estes eventos adversos podem ocorrer devido a deiscência da sutura e mínimas comunicações (fistulas) entre a região enxertada e a cavidade oral. Estas reações adversas não foram visualizadas nos nossos animais operados.

Outra possível desvantagem da utilização deste modelo animal é a necessidade da aquisição de uma curva de aprendizagem prévia por parte do operador, uma vez que o campo operatório mede poucos milímetros e a exposição dos tecidos moles dissecados também é pequena. A tração exagerada dos tecidos moles também pode facilitar a deiscência da sutura no período pós-operatório, fato este não observado nos animais deste estudo.

5.2 O período de tempo de neoformação óssea dos animais das diferentes espécies

Hollinger e Kleindschmidt⁷⁵ enfatizaram a alta capacidade de neoformação óssea dos ratos que é significativamente maior que a dos humanos, portanto a efetividade de técnicas de BTO comprovadas neste modelo animal pode ser eventualmente superestimada quando for utilizada em humanos. Uma falha óssea considerada crítica nas regiões da calvária e fêmures de ratos mede entre 4 mm a 8 mm de diâmetro,¹²¹⁻¹²⁵ enquanto uma falha óssea considerada crítica na região alveolar mede 2 mm de diâmetro.¹²⁶ Portanto, foram utilizadas no presente estudo falhas ósseas críticas.

Nguyen et al.⁹² foram os primeiros autores a caracterizar a falha óssea na região alveolar e demonstrar por meio de imagens de microtomografia computadorizada que a neoformação óssea nesta região atinge um limiar máximo na oitava semana após a cirurgia. Ou seja, a partir desse período de tempo a neoformação óssea se mantém. Portanto, optou-se no presente estudo por utilizar apenas o período de tempo de 8 semanas após as cirurgias para o sacrifício de todos os animais.

5.3 A idade do animal

Foram utilizados neste estudo animais adultos com crescimento já estabelecido para testar as técnicas de BTO. Animais adultos com crescimento já estabelecido apresentam a capacidade de neoformação óssea de falhas ósseas significativamente menor do que animais jovens.⁷⁶ Portanto, a eficácia de uma nova técnica de BTO pode ser melhor avaliada em animais adultos. Estudos prévios definiram que ratos com idade superior a 60 dias já podem ser considerados adultos.⁷⁶

A escolha de um biomaterial carreador na construção de uma técnica de BTO deve considerar as propriedades físicas e químicas do biomaterial, a arquitetura dimensional do biomaterial e o ambiente receptor em que este será inserido.⁴² A região alveolar, como ambiente receptor desta técnica de BTO é predominantemente composta por osso membranoso, altamente poroso e cuja espessura é menor do que o osso da região parietal da calvária.¹²⁷ Portanto, essa é uma região ideal para testar

biomateriais com resistência mecânica reduzida, uma vez que não há necessidade de proteção de estruturas nobres como o parênquima cerebral. Os biomateriais utilizados para substituir o osso nessa região anatômica devem apresentar como característica principal a porosidade com o objetivo de facilitar a irrupção e mobilização dentária.¹²⁸ A porosidade (número e tamanho dos poros) de um biomaterial é inversamente proporcional à sua dureza.⁴³ À medida que se aumenta o número de poros de um biomaterial, aumenta-se também sua capacidade de transportar células-tronco mesenquimais ou outros agentes indutores da neoformação óssea e diminui-se sua resistência mecânica ao trauma.¹²⁹⁻¹³¹ No entanto, o aumento excessivo de poros pode levar à fragmentação do biomaterial.^{132, 133} Dentre os biomateriais cerâmicos compostos por fosfato de cálcio, o α -TCP foi escolhido por apresentar absorção mais rápida e 80% de poros, o que aumenta significativamente sua capacidade de transportar células.⁶⁵

Nenhum biomaterial implantado em tecido vivo é totalmente inerte. Todos provocam alguma resposta biológica do tecido receptor. Quatro tipos de respostas são possíveis: 1- Necrose dos tecidos circunvizinhos devido à toxicidade do biomaterial; 2- Formação de cápsula fibrosa quando o biomaterial é inerte; 3- Absorção do biomaterial; e 4- Ligação entre o biomaterial e o leito receptor por meio dos fenômenos de osteoindução e osteocondução.^{45, 134-136} Os dois biomateriais escolhidos para este estudo, tanto o osso bovino mineral quanto o tricálcio fosfato apresentaram ligação com o meio receptor e propriedades de osteocompatibilidade e osteocondutividade.^{59, 137-139} Mokbel et al.¹²⁰ descreveram um estudo cujo objetivo foi comparar a capacidade de neoformação óssea do osso bovino mineral sob a apresentação comercial de Bio-oss collagen® e o osso autógeno no reparo de falhas

ósseas críticas na calvária de ratos após 8 semanas da cirurgia. Os autores¹²⁰ encontraram 24,6% e 37,1% de osso neoformado para o grupo de animais reparados respectivamente com o Bio-oss collagen[®] e osso autógeno. Jensen et al.¹⁴⁰ também demonstraram a capacidade osteocondutora do Bio-oss collagen[®] associado ao osso autógeno no reparo de falhas ósseas na região maxilar de modelo porcino. Este efeito osteocondutor do Bio-oss collagen[®] também foi comprovado por Wong et al.¹⁴¹ no reparo de falhas ósseas críticas na calvária de coelhos em apenas 14 dias após a cirurgia da confecção da falha óssea.

Os dados do presente estudo mostraram um volume ósseo nas falhas ósseas alveolares reparadas com o Bio-oss collagen[®] semelhante ao volume ósseo encontrado por Mokbel et al.¹²⁰ em falhas ósseas na calvária de ratos reparadas com o mesmo biomaterial. A comparação dos dados entre os dois estudos demonstrou a versatilidade do Bio-oss collagen[®] como biomaterial osteocondutor, uma vez que facilitou a condução óssea em regiões anatômicas com características distintas.

Reiter et al.¹²⁸ descreveram um estudo cujo objetivo foi comparar a eficácia do reparo de falhas ósseas induzidas em cabras com o β -TCP e o osso autógeno por meio de histologia. Os autores concluíram que o reparo com β -TCP induziu maior neoformação óssea na falha óssea alveolar do que osso autógeno, sugerindo que este biomaterial poderia ser utilizado rotineiramente na prática clínica.¹²⁸

Schmitt et al.¹⁴² descreveram um estudo clínico randomizado em humanos cujo objetivo foi avaliar a capacidade osteocondutora de biomateriais compostos de osso bovino mineral sob a forma comercial de Bio-oss collagen[®] e fosfato de cálcio sob a forma comercial de Staumann Bone Ceramic[®] na indução da neoformação óssea em pacientes submetidos ao aumento do seio maxilar pré-implante dentário.

Por meio de avaliação histomorfométrica em tecidos biopsiados da região maxilar, os autores identificaram respectivamente, 44,85%, 46,26% e 42,74% de volume de osso neoformado nos sujeitos reparados com o biomaterial composto por fosfato de cálcio, osso bovino mineral e osso autógeno.¹⁴² Outros estudos também demonstraram o papel osteocondutor dos biomateriais compostos por fosfato de cálcio e osso bovino mineral para a construção de técnicas de BTO.⁷² Além do papel osteocondutor, a capacidade de facilitar a diferenciação celular desses dois biomateriais, bem como a capacidade de transporte e liberação de fatores osteoindutores carregados também têm sido descritas por alguns autores.^{143, 144} Essas características são fundamentais para o sucesso de uma técnica de BTO.

Enquanto outros autores^{58, 145} demonstraram e compararam a capacidade de dois biomateriais compostos por osso bovino mineral e fosfato de cálcio de facilitar a diferenciação de celular; Payer et al.⁷² cultivaram células-tronco mesenquimais derivadas do osso maxilar em biomateriais com arquitetura tridimensional compostas por fosfato de cálcio e osso bovino mineral com o objetivo de verificar *in vitro* as características imunofenotípicas dessas células e a capacidade de ligação entre as células e os respectivos biomateriais.⁷² Os autores verificaram íntimo contato entre os biomateriais e as células após 14 dias de sua inoculação no biomaterial, além de crescimento celular dentro dos poros de ambos os biomateriais.⁷² Os autores concluíram que o biomaterial composto por osso bovino mineral possibilitou melhor diferenciação *in vitro* das CTM em osteoblastos após a indução, do que os biomateriais compostos por fosfato de cálcio.⁷² É importante frisar que a capacidade de diferenciação *in vitro* das CTM não depende somente do biomaterial e sim do meio de cultura e da droga farmacológica utilizada para facilitar a indução *in vitro*.^{2,}

^{146, 147} Outros estudos apontaram a alta capacidade dos biomateriais compostos por fosfato de cálcio e hidroxiapatita de diferenciar as células-tronco mesenquimais humanas do aspirado de medula óssea em osteoblastos *in vitro*.¹⁴⁸ Embora alguns estudos pioneiros apontem a necessidade da utilização de células-tronco mesenquimais diferenciadas à linhagem óssea no reparo de falhas ósseas induzidas em modelos animais,^{6, 25} estudos mais recentes avançaram no conhecimento dessas células e comprovaram a plasticidade celular, bem como a capacidade totipotente de algumas dessas linhagens celulares.¹⁴⁹ Portanto, embora ainda não exista um consenso sobre este tópico, atualmente a grande maioria dos pesquisadores opta pela utilização de CTM indiferenciadas no reparo de falhas ósseas induzidas em modelo animal.¹⁴⁹

O modelo animal mais utilizado na literatura é a falha óssea crítica em crânios de ratos,¹⁵⁰⁻¹⁵⁴ com escassez de estudos que utilizam o modelo animal de falha óssea alveolar crítica.^{92, 93} Este é o primeiro estudo na literatura a utilizar o modelo de falha óssea alveolar para testar a eficácia de uma técnica de BTO composta pela associação de biomateriais carreadores (osso bovino mineral e α -TCP) com as células-tronco derivadas do músculo *orbicularis-oris* de sujeitos portadores de FLP.

Nguyen et al.¹⁵⁵ utilizaram o modelo de falha óssea alveolar crítica em ratos para testar duas técnicas distintas de BTO. Os autores compararam a eficácia do uso da associação de dois tipos de biomateriais carreadores compostos por esponja de colágeno e hidroxiapatita/tricálcio fosfato e fatores indutores de proteínas recombinantes (BMP-2) com o uso dos mesmos biomateriais sem a presença do BMP-2 na regeneração de falhas ósseas alveolares.¹⁵⁵ A neoformação óssea foi

aferida por meio de histomorfometria e microtomografia computadorizada nos respectivos períodos de tempo de 4, 8 e 12 semanas.¹⁵⁵ Os animais cujas falhas ósseas foram reparadas com a associação de esponja de colágeno e BMP-2 apresentaram volume ósseo de 49%, 71% e 66% nos períodos correspondentes a 4, 8 e 12 semanas, comparada à dos animais cujas falhas ósseas alveolares foram reparadas somente com a esponja de colágeno, que apresentaram volume ósseo de 50%, 79% e 69% nos respectivos períodos de tempo de 4, 8 e 12 semanas.¹⁵⁵ Os animais cujas falhas ósseas foram reparadas com a associação de hidroxiapatita/tricálcio fosfato e BMP-2 apresentaram volume ósseo de 55%, 91% e 90% nos períodos correspondentes a 4, 8 e 12 semanas, comparada à dos animais cujas falhas ósseas alveolares foram reparadas somente com a hidroxiapatita/tricálcio fosfato, que apresentaram volume ósseo de 69%, 86% e 87% nos respectivos períodos.¹⁵⁵ No período de 8 semanas determinado para o sacrifício dos animais, a associação de esponja de colágeno e BMP-2 representou 8% de volume ósseo adicional quando comparada à esponja de colágeno sozinha.¹⁵⁵ Da mesma maneira, a associação de hidroxiapatita/tricálcio fosfato e BMP-2 representou 7% de volume adicional de osso quando comparada à hidroxiapatita/tricálcio fosfato sozinha.¹⁵⁵ Em nosso estudo, a presença de CTM induziu a neoformação de osso adicional de aproximadamente 15% quando se utilizou o osso bovino mineral e aproximadamente 10% quando se utilizou o α -TCP. Portanto, as CTM derivadas do músculo *orbicularis-oris*, independente do tipo de biomaterial carreador utilizado, apresentaram uma capacidade de indução óssea maior do que o BMP-2.

Embora o BMP-2 já seja comercializado no mercado norte-americano e apresente eficácia comprovada na neoformação óssea de modelos experimentais e

clínicos,¹⁵⁶⁻¹⁶⁰ seu alto custo inviabiliza sua utilização rotineira no Brasil. Um pequeno fragmento de BMP-2 chega a custar 20 vezes mais do que o valor repassado pelo SUS aos hospitais de referência para uma cirurgia realizada. Portanto, acredita-se que a utilização das CTM além de ser mais viável financeiramente, pode ser mais eficiente que a terapia com BMP-2.

Conejero et al.⁶ utilizaram uma falha óssea crítica retangular na região do palato de ratos para comparar técnicas distintas de BTO. Os autores dividiram os animais em 4 grupos. No grupo controle, as falhas ósseas não foram reparadas; no segundo grupo, as falhas ósseas foram reparadas com o emprego do biomaterial ácido poliláctico sozinho. No terceiro grupo, as falhas ósseas foram reparadas com o emprego da associação do biomaterial ácido poliláctico e CTM indiferenciadas derivadas da gordura. No quarto grupo, as falhas ósseas foram reparadas com o emprego da associação do biomaterial ácido poliláctico e CTM diferenciadas em meio osteogênico específico (meio capaz de induzir a diferenciação celular *in vitro* em osteoblastos) contendo ácido ascórbico, dexametasona e glicerol fosfato. A neoformação óssea foi aferida por meio de histologia e imagens de tomografia computadorizada após 6 e 12 semanas da cirurgia dos animais. Os autores observaram que nos três primeiros grupos, as falhas ósseas foram preenchidas por tecido fibroso sem a presença de tecido ósseo. No quarto grupo, a falha óssea foi reparada com tecido ósseo após 12 semanas da cirurgia.⁶

Os autores observaram que a neoformação de osso dentro da falha óssea palatina foi inversamente proporcional à regeneração de fibrose (tecido cicatricial).⁶ No presente estudo, identificaram-se resultados semelhantes. Nos animais cujas falhas ósseas foram reparadas com grande quantidade de tecido ósseo (grupos 1, 4 e

5), aferiu-se baixo volume de fibrose. Por outro lado, achados opostos foram observados em relação às CTM indiferenciadas. Enquanto os autores observaram ausência do efeito osteoindutor das CTM indiferenciadas derivadas da gordura, os achados do presente estudo demonstraram alto efeito osteoindutor das CTM indiferenciadas derivadas do músculo *orbicularis-oris*. Zuk et al.^{27, 161} demonstraram a baixa capacidade de indução da neoformação óssea das CTM derivadas da gordura, o que corrobora os resultados de Conejero et al.,⁶ que mostraram a necessidade da diferenciação celular *in vitro* antes de considerá-las para o uso *in vivo* no reparo de falhas ósseas. Dudas et al.⁷ também evidenciaram a necessidade da diferenciação celular de CTM derivadas da gordura no reparo de falhas ósseas induzidas na região parietal de coelhos. Por outro lado, Follmar et al.¹⁶² não identificaram a indução da neoformação óssea por meio de técnicas de BTO inseridas em tecido subcutâneo de ratos, mesmo utilizando CTM diferenciadas derivadas da gordura. Os dados identificados na literatura sugerem que o tecido adiposo não é uma boa fonte para a extração de linhagens celulares de células-tronco mesenquimais adultas com potencial osteoindutor.^{27, 161} Convencidos do contrário, Choi et al.¹⁷ utilizaram técnicas de BTO compostas por CTM derivadas de tecido adiposo humano associados a biomateriais carreadores compostos por HA/TCP para reparar falhas ósseas críticas no fêmures de ratos. Os autores utilizaram 3 diferentes densidades celulares que foram definidas em pequena ($7,5 \times 10^5$ cels/mL), média ($7,5 \times 10^6$ cels/mL) e alta ($7,5 \times 10^7$ cels/mL) densidades.¹⁷ Os volumes ósseos identificados na falha óssea dos fêmures após 16 semanas foi respectivamente igual a 56,87%, 80,72% e 89,07%.¹⁷ Somente no grupo de animais reparados com maior densidade de CTM derivadas da gordura, houve regeneração total e homogênea da falha óssea

crítica. Este estudo sugeriu que a densidade celular é um dos fatores mais importantes a ser considerado na construção de uma técnica de BTO, sendo a adequação desta variável ainda mais importante do que a diferenciação celular *in vitro* antes da utilização *in vivo*.¹⁷ Além disso, o processo de diferenciação celular em meio osteogênico específico aumenta o custo e os riscos de contaminação e, consequentemente, eleva a morbidade do procedimento. Portanto, técnicas de BTO construídas com base em CTM indiferenciadas representam maior segurança aos sujeitos e devem ser o método padrão nos reparos de falhas ósseas congênitas ou adquiridas. Essa discussão sobre a necessidade de indução celular *in vitro* também se estende às CTM extraídas da musculatura esquelética. Enquanto Lee et al.¹²¹ observaram a necessidade de induzir a diferenciação celular das CTM derivadas da musculatura esquelética com a utilização de BMP-2 antes da sua utilização *in vivo*, outros autores demonstraram o reparo de falha óssea crítica na calvária de ratos com a presença de CTM indiferenciadas derivadas da musculatura esquelética do próprio animal.¹⁴⁹ Neste último estudo de Taub et al.,¹⁴⁹ os autores marcaram as CTM com proteína fluorescente de cor verde em dois animais e identificaram que 50% a 70% dos osteóides identificados por meio da histologia foram corados com verde. Desta forma, os autores comprovaram o efeito osteoindutor das CTM derivadas da musculatura esquelética, como também a eficácia das CTM indiferenciadas.¹⁴⁹ Embora a marcação prévia das CTM com proteínas fluorescentes não tenha sido utilizada no presente estudo, o volume ósseo adicional encontrado nos animais cujas falhas ósseas foram reparadas com as CTM associada aos biomateriais (grupos 3 e 5) sugere a presença do efeito osteoindutor das CTM derivadas da musculatura esquelética do músculo *orbicularis-oris* de sujeitos portadores de FLP. No presente

estudo, o transplante de CTM entre indivíduos de espécies diferentes não provocou reação imunológica.

A capacidade imunorregulatória das CTM tanto derivadas da musculatura esquelética quanto da polpa dentária foi evidenciada por outros autores no reparo de falhas ósseas da calvária de ratos e no tratamento de animais com distrofias musculares induzidas em modelo animal.^{19, 37, 39, 97, 149}

Arinzeh et al.⁹⁷ descreveram um estudo cujo objetivo foi demonstrar a capacidade imunorregulatória e o efeito osteoindutor de CTM derivadas de aspirado de medula óssea de cachorros que foram associadas a biomateriais compostos por HA/TCP e transplantadas para falhas ósseas nos membros inferiores de outros animais não imunossuprimidos da mesma espécie (transplante alógeno). A resposta imunológica sistêmica do cachorro receptor foi avaliada por meio da detecção de anticorpos séricos contra as CTM transplantadas.⁹⁷ Nenhuma resposta imunológica adversa foi detectada nos animais cujas falhas ósseas foram reparadas com esta técnica de BTO.⁹⁷ O volume ósseo observado nas falhas ósseas nos fêmures dos cachorros foi de 49% após 16 semanas da cirurgia.⁹⁷ Os autores concluíram que essa técnica de BTO baseada no transplante de CTM alógenas (indivíduos diferentes da mesma espécie) associada a biomateriais carreadores foi eficiente no reparo de falhas ósseas críticas.⁹⁷ Embora o mecanismo imunorregulatório que possibilite o transplante de CTM entre indivíduos diferentes da mesma espécie e até mesmo entre espécies diferentes ainda não seja completamente compreendido e descrito na literatura, alguns autores sugeriram hipóteses para explicá-lo. Di Nicola et al.¹⁶³ sugeriram que CTM humanas inibem a proliferação de linfócitos T além de secretarem fatores que inibem a resposta imune do hospedeiro. Bartholomew et al.^{164,}

¹⁶⁵ também demonstraram em macacos que a sobrevivência de enxertos de pele alógenos entre os diferentes animais foi favorecida pela injeção intravenosa de CTM. Portanto, existe a possibilidade das CTM exercerem um papel sistêmico imunorregulatório no ambiente receptor que possibilite o transplante de natureza alógena e xenógena.^{100, 164} Frisa-se também que a hipótese do sistema imunológico dos ratos ser muito primitivo e não suficientemente desenvolvido para provocar as reações clássicas de rejeição imunológica não pode ser descartada.

5.4 Limitações do estudo

As limitações do presente estudo são inerentes à complexidade da somatória de passos necessários para a construção de uma técnica de BTO. A construção do modelo animal de falha óssea alveolar e a validação do potencial osteoindutor das CTM humanas derivadas do músculo *orbicularis-oris* de sujeitos portadores de FLP foram passos dados com sucesso.^{38, 93} As propriedades osteocondutoras dos biomateriais carreadores escolhidos neste estudo foram descritas por inúmeros autores.^{43, 53, 96, 139, 166, 167} Portanto, a elaboração da presente técnica de BTO obedeceu a critérios bem estabelecidos. Embora os resultados deste estudo sejam animadores, o presente trabalho apresentou algumas limitações. A primeira foi o número reduzido de animais; a segunda foi o método de imagem utilizado para quantificar o volume de osso na falha óssea alveolar; a terceira, a utilização de linhagens celulares de três sujeitos selecionados entre 20 sujeitos portadores de FLP.

O número reduzido de animais do grupo cujas falhas ósseas foram reparadas com o osso bovino mineral foi determinado com base em estudo piloto prévio não publicado que demonstrou a capacidade osteogênica do osso bovino mineral com e sem o emprego das células-tronco mesenquimais humanas por meio de exames de histologia e imagens de tomografia computadorizada. O estudo piloto foi realizado com 26 animais divididos em 4 grupos. No grupo 1, a falha óssea retangular na região alveolar medindo 5X4X3 mm não foi preenchida (n=7), no grupo 2 a falha óssea foi preenchida com osso autógeno (n=7); no grupo 3, a falha óssea na mesma região foi preenchida com osso bovino mineral sem o emprego das CTM (n=5); e no grupo 4, a falha óssea na mesma região foi preenchida com a associação de osso bovino mineral e CTM (n=7). Os resultados deste estudo piloto demonstraram a capacidade de indução da neoformação óssea desta técnica de BTO. Os resultados do presente estudo corroboraram os achados do estudo piloto.

O método de imagem padrão ouro para identificar a neoformação de osso dentro da falha óssea é a microtomografia computadorizada com cortes de até 0,3 mm.

Os menores cortes possíveis realizados pelo aparelho de tomografia utilizado neste estudo foram de 1mm, portanto utilizou-se um método qualitativo de aferição da neoformação óssea dentro da falha ao invés da aferição quantitativa da neoformação óssea dentro da falha óssea. Os dados obtidos com as imagens de tomografia computadorizada corroboraram com os dados da histomorfometria.

Foram utilizadas linhagens celulares de 3 sujeitos portadores de FLP, escolhidos de maneira aleatória dentro de um padrão de 20 linhagens cujo protocolo de coleta, isolamento, cultivo e caracterização foi previamente descrito.

Outra crítica ao trabalho foi a utilização de um único período de tempo de 8 semanas para o sacrifício dos animais. Nguyen et al.⁹² demonstraram em modelo animal de falha óssea alveolar que a partir de 8 semanas a neoformação óssea se estabiliza e a partir deste período não há diferenças estatística do volume de osso neoformado dentro da falha óssea em comparação a períodos mais longos. Portanto, este período de tempo parece ser o melhor momento para aferição da eficácia de novas técnicas de BTO.

5.5 Perspectivas futuras

Os princípios da cirurgia craniofacial foram estabelecidos com base no aspecto multidisciplinar do seu tratamento, realizado pela união de esforços de inúmeros profissionais que buscam a otimização dos resultados em suas respectivas esferas de atuação profissional.^{109, 168} As técnicas cirúrgicas clássicas e convencionais utilizadas atualmente no tratamento de crianças portadoras de deformidades congênicas e adquiridas representam a evolução crítica dos princípios estabelecidos por profissionais pioneiros. Embora, o respeito aos princípios possibilite resultados satisfatórios e consistentes, ainda há espaço para novas tecnologias. As recentes técnicas de bioengenharia de tecidos ósseos introduziram no tratamento das deformidades craniofaciais uma possibilidade talvez jamais imaginada pelos nossos antecessores, que consiste no estabelecimento precoce das deformidades ósseas congênicas e adquiridas sem morbidade inerente à retirada de tecido de região doadora, normalmente escassa na população infantil. A BTO

encontrou nas deformidades craniofaciais um terreno fértil para o seu progresso.^{169,}

170

No início da década de 90, o cirurgião plástico norte-americano Joseph McCarthy¹⁷¹ utilizou os princípios de Ilizarov para a idealização de uma técnica cirúrgica que permitiu o alongamento ósseo gradual da mandíbula, que passou a ser chamada de distração osteogênica.¹⁷² Essa técnica rapidamente espalhou-se para os centros de referência de todo o mundo e beneficiou milhões de crianças portadoras de deformidades congênitas e eventualmente adquiridas, uma vez que também foi adaptada a outras regiões do esqueleto craniofacial. McCarthy¹⁷³ descreveu as três fases da distração osteogênica: a fase de latência, a fase de ativação e a fase de consolidação óssea. Alguns cirurgiões plásticos consideram a distração osteogênica como o início da nova era representada pelas modernas técnicas de BTO.

Joseph Murray, cirurgião plástico que recebeu o prêmio Nobel pelo primeiro transplante renal do mundo, vislumbrou a cirurgia plástica em 4 períodos.¹⁷⁴

1. Cirurgia ablativa
2. Cirurgia reconstrutiva
3. Cirurgia dos transplantes
4. Engenharia tecidual e medicina regenerativa.

O quarto período de Murray, representado pela medicina regenerativa e engenharia tecidual, pode ser dividido didaticamente nas mesmas fases da distração osteogênica: latência, ativação e consolidação.

Na primeira fase de latência, iniciada há pouco mais de uma década, estabeleceu-se o conhecimento laboratorial e a manipulação das CTM derivadas de tecidos humanos e sua capacidade de se replicar em diferentes tecidos em paralelo à

adequação de possíveis biomateriais biocompatíveis que pudessem ser utilizados como carreadores de agentes osteoindutores.

Na segunda fase de consolidação, houve a efetiva construção das técnicas de BTO formadas pela união dessas variáveis. As CTM e outros agentes osteoindutores foram associadas aos biomateriais carreadores com o objetivo final de regenerar tecido. No entanto, o infinito número de variáveis, gerado por tipos de CTM diferentes e características de biomateriais carreadores, colocou um dilema no processo de evolução e progresso da BTO. À medida que o tempo passa, novos biomateriais com características e propriedades mais atraentes são descritos na literatura e fontes de células que um dia foram consideradas uma promessa como por exemplo as CTM derivadas da gordura, hoje perdem terreno para fontes celulares cujo efeito osteoindutor foi melhor caracterizado. O escrutínio da literatura pertinente faz entender que se vive hoje o período de consolidação com ausência de consenso sobre o assunto e inúmeras possibilidades. Esta tese, realizada dentro deste período, descreve o esforço de um grupo de pesquisa para construir uma técnica de BTO e eventualmente tentar contribuir para a estabilização desta fase. Esta fase só será efetivamente concretizada por meio de esforços de inúmeros grupos de pesquisa no mundo com trabalho contínuo durante muitos anos.

A terceira e última fase de ativação das técnicas de BTO só é realmente alcançada pela inserção dessas novas tecnologias no tratamento dos humanos em benefício dos pacientes. Alguns países do mundo já entraram nessa fase e algumas respostas favoráveis já são identificadas na literatura.¹⁷⁵⁻¹⁷⁹ No entanto, alguns possíveis efeitos deletérios dessas novas técnicas só poderão ser apreciados depois de alguns anos de seu uso. O rigor científico das pesquisas experimentais e os critérios

pré-estabelecidos por meio de normas internacionais permitirão a segurança do seu uso na terapia clínica. A expressão da língua inglesa "*from bench to bedside*" (da bancada à clínica) traduz em quatro palavras o caminho a ser trilhado, a busca por evidências científicas na pesquisa que comprovem o sucesso de uma terapia para que finalmente ela seja utilizada na clínica de maneira segura e eficaz em benefício dos pacientes.

6. Conclusões

1. A análise da neoformação óssea por meio de imagens radiológicas mostrou que o grupo de animais cujas falhas ósseas alveolares foram reparadas com o osso autógeno (grupo 1) apresentou a melhor distribuição óssea. Embora os dados obtidos por meio de imagens radiológicas não tenham sido tratados estatisticamente, o grupo dos animais reparados com α -TCP com o emprego das células-tronco mesenquimais apresentou a distribuição óssea mais semelhante ao grupo que recebeu tratamento padrão realizado com o osso autógeno.

2. A mensuração dos parâmetros diretos da neoformação óssea por meio da histomorfometria não mostrou diferença estatística quando os grupos 4 e 5 foram comparados com o grupo 1, sendo que a efetividade da técnica de bioengenharia de tecidos ósseos utilizada nos animais do grupo 5 (α -TCP+CTM) foi a que mais se assemelhou à efetividade do tratamento padrão.

3. A mensuração dos parâmetros diretos da neoformação óssea por meio da histomorfometria mostrou diferença estatística quando o grupo 2 (osso bovino mineral) foi comparado com o grupo 1, mostrando a superioridade da efetividade do tratamento padrão. O emprego das CTM no osso bovino mineral (grupo 3) melhorou a efetividade dessa técnica de bioengenharia de tecido ósseo, aproximando-a à efetividade do tratamento padrão, embora ainda persista uma tendência estatística que favorece a superioridade do tratamento padrão.

4. A mensuração dos parâmetros indiretos da neoformação óssea por meio da histomorfometria não mostrou diferença estatística na comparação do grupo 1 com os grupos 4 e 5, sendo que a efetividade da técnica de bioengenharia de tecidos

ósseos utilizada nos animais do grupo 5 (α -TCP+CTM) foi a que mais se assemelhou à efetividade do tratamento padrão.

5. A mensuração dos parâmetros indiretos da neoformação óssea quando os grupos 2 e 3 foram comparados com o grupo 1 mostrou uma tendência estatística em que se favorece a superioridade do tratamento padrão.

6. A técnica utilizada nos animais do grupo 1 apresentou uma importante desvantagem em relação aos demais grupos, que foi a necessidade de craniotomia para a retirada de osso utilizado no transplante autólogo para a região da falha óssea alveolar. Portanto, a técnica de bioengenharia de tecidos ósseos utilizada nos animais do grupo 5 (α -TCP+CTM) foi semelhante ao tratamento padrão sem a morbidade da presença de uma área doadora. Essa técnica de bioengenharia de tecidos ósseos poderá substituir o tratamento padrão após a comprovação da sua efetividade em ensaio clínico em humanos.

7. Anexos

ANEXOS

Tabela 2. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 1 (n=7)

Animais	Índices de Volume (%)	
	BV/TV	Fb.V/TV
1	57,86	0,095
2	39,67	0
3	40,96	27,11
4	55,89	0
5	77,87	0
6	76,67	0
7	72,96	0
Soma	421,88	27,2
Média	60,27	3,89

Tabela 3. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 2 (n=3)

Animais	Índices de Volume (%)	
	BV/TV	Fb.V/TV
1	17,57	20,22
2	32,93	26,69
3	18,56	12,63
Soma	69,06	59,54
Médias	23,02	19,85

Tabela 4. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 3 (n=5)

Animais	Índices de Volume (%)	
	BV/TV	Fb.V/TV
1	22,39	30,05
2	20,65	29,97
3	35,68	16,58
4	68,78	0
5	44,24	16,14
Soma	191,74	92,74
Médias	38,35	18,55

Tabela 5. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 4 (n=3)

Animais	Índices de Volume (%)	
	BV/TV	Fb.V/TV
1	50,92	0
2	49,68	23,64
3	53,84	16,08
Soma	154,44	39, 72
Médias	51,48	13,24

Tabela 6. Índices histomorfométricos (%) dos animais do grupo 5 (n=6)

Animais	Índices de Volume (%)	
	BV/TV	Fb.V/TV
1	63,64	0
2	74,94	0
3	73,75	0
4	61,75	0
5	46,94	3,81
6	49,79	0
Soma	370,81	3,81
Média	61,8	0,64

8. Referências

1. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993; 260: 920-6.
2. Behr B, Ko SH, Wong VW, Gurtner GC, Longaker MT. Stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2010; 126: 1163-71.
3. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8: 315-7.
4. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005; 7: 393-5.
5. Szpalski C, Barbaro M, Sagebin F, Warren SM. Bone Tissue Engineering: Current Strategies and Techniques-Part II: Cell Types. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012; 18: 258-69.
6. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117: 857-63.
7. Dudas JR, Marra KG, Cooper GM, et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. *Ann Plast Surg*. 2006; 56: 543-8.
8. Wang C, Wang Z, Li A, et al. Repair of segmental bone-defect of goat's tibia using a dynamic perfusion culture tissue engineering bone. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92: 1145-53.
9. Zou D, Zhang Z, Ye D, et al. Repair of critical-sized rat calvarial defects using genetically engineered bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing hypoxia-inducible factor-1alpha. *Stem Cells*. 2011; 29: 1380-90.

10. Seong JM, Kim BC, Park JH, et al. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomed Mater.* 2010; 5: 062001.
11. Gimble JM. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin Biol Ther.* 2003; 3: 705-13.
12. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* 1970; 3: 393-403.
13. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968; 6: 230-47.
14. Phinney DG. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem Suppl.* 2002; 38: 7-12.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284: 143-7.
16. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005; 11: 1198-211.
17. Choi HJ, Kim JM, Kwon E, et al. Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci.* 2011; 26: 482-91.
18. Fatkhudinov T, Gol'dshtein DV, Kulakov AA, et al. Stimulation of reparative osteogenesis after xenotransplantation of human prenatal mesenchymal stem cells and chondroblasts. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 139: 491-8.
19. Fatkhudinov T, Goldshtein DV, Pulin AA, et al. Reparative osteogenesis during transplantation of mesenchymal stem cells. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140: 96-9.

20. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2004; 95: 209-14.
21. Rodbell M. Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis. *J Biol Chem*. 1964; 239: 375-80.
22. Zuk PA. Stem cell research has only just begun. *Science*. 2001; 293: 211-2.
23. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7: 211-28.
24. Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2010; 7: 64-76.
25. Lee JA, Parrett BM, Conejero JA, et al. Biological alchemy: engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2003; 50: 610-7.
26. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol*. 2004; 22: 560-7.
27. Chou YF, Zuk PA, Chang TL, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects. *Connect Tissue Res*. 2011; 52: 109-18.
28. Yamazaki H, Tsuneto M, Yoshino M, Yamamura K, Hayashi S. Potential of dental mesenchymal cells in developing teeth. *Stem Cells*. 2007; 25: 78-87.
29. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008; 26: 1787-95.

30. Laino G, d'Aquino R, Graziano A, et al. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res.* 2005; 20: 1394-402.
31. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97: 13625-30.
32. Wu X, Wang S, Chen B, An X. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Tissue Res.* 2010; 340: 549-67.
33. Usas A, Maciulaitis J, Maciulaitis R, et al. Skeletal muscle-derived stem cells: implications for cell-mediated therapies. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47: 469-79.
34. Tamaki T, Okada Y, Uchiyama Y, et al. Skeletal muscle-derived CD34⁺/45⁻ and CD34⁻/45⁻ stem cells are situated hierarchically upstream of Pax7⁺ cells. *Stem Cells Dev.* 2008; 17: 653-67.
35. Corsi KA, Pollett JB, Phillippi JA, et al. Osteogenic potential of postnatal skeletal muscle-derived stem cells is influenced by donor sex. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 1592-602.
36. Tamaki T, Okada Y, Uchiyama Y, et al. Clonal multipotency of skeletal muscle-derived stem cells between mesodermal and ectodermal lineage. *Stem Cells.* 2007; 25: 2283-90.
37. Qu-Petersen Z, Deasy B, Jankowski R, et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol.* 2002; 157: 851-64.

-
38. Bueno DF, Kerkis I, Costa AM, et al. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15: 427-35.
39. de Mendonca Costa A, Bueno DF, Martins MT, et al. Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*. 2008; 19: 204-10.
40. Lim JY, Donahue HJ. Biomaterial characteristics important to skeletal tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2004; 4: 396-8.
41. Mastrogiacomo M, Muraglia A, Komlev V, et al. Tissue engineering of bone: search for a better scaffold. *Orthod Craniofac Res*. 2005; 8: 277-84.
42. Szpalski C, Wetterau M, Barr J, Warren SM. Bone tissue engineering: current strategies and techniques-part I: scaffolds. *Tissue Eng Part B Rev*. 2012; 18: 246-57.
43. Hollister SJ, Lin CY, Saito E, et al. Engineering craniofacial scaffolds. *Orthod Craniofac Res*. 2005; 8: 162-73.
44. Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007; 19: 455-66, v.
45. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001; 10 Suppl 2: S96-101.
46. Cornell CN, Lane JM. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 1998; S267-73.
47. Martinez-Sanz E, Alkhraisat MH, Paradas I, et al. Osteoinduction in the palatal submucosa by injecting BMP-2 on 2 different carriers. *J Craniofac Surg*. 2012; 23: 594-8.

-
48. Panetta NJ, Gupta DM, Longaker MT. Perspectives in cell-based skeletal tissue. *J Craniofac Surg.* 2009; 20: 347-8.
49. da Silva RV, Bertran CA, Kawachi EY, Camilli JA. Repair of cranial bone defects with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft. *J Craniofac Surg.* 2007; 18: 281-6.
50. Rijnen WH, Gardeniers JW, Schreurs BW, Buma P. Impacted bone and calcium phosphate cement for repair of femoral head defects: a pilot study. *Clin Orthop Relat Res.* 2007; 459: 216-21.
51. Sugawara A, Fujikawa K, Takagi S, Chow LC. Histological analysis of calcium phosphate bone grafts for surgically created periodontal bone defects in dogs. *Dent Mater J.* 2008; 27: 787-94.
52. Weitao Y, Kangmei K, Xinja W, Weili Q. Bone regeneration using an injectable calcium phosphate/autologous iliac crest bone composites for segmental ulnar defects in rabbits. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 2485-92.
53. Araujo M, Linder E, Wennstrom J, Lindhe J. The influence of Bio-Oss Collagen on healing of an extraction socket: an experimental study in the dog. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008; 28: 123-35.
54. Araujo MG, Linder E, Lindhe J. Bio-Oss collagen in the buccal gap at immediate implants: a 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 2011; 22: 1-8.
55. Koeter S, Tigchelaar SJ, Farla P, et al. Coralline hydroxyapatite is a suitable bone graft substitute in an intra-articular goat defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 90: 116-22.

-
56. Lan XY, Zhou CS, Tian J, et al. [Repair of radius bone defect with the nano-hydroxyapatite/collagen/calcium alginate]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2009; 31: 459-63.
57. Carrodeguas RG, De Aza S. alpha-Tricalcium phosphate: synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater*. 2011; 7: 3536-46.
58. Oh SA, Lee GS, Park JH, Kim HW. Osteoclastic cell behaviors affected by the alpha-tricalcium phosphate based bone cements. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21: 3019-27.
59. Pinto JG, Primo BT, Gassen HT, et al. Alpha-tricalcium phosphate cement in the reconstruction of bone defects in rats. *Acta Cir Bras*. 2011; 26: 135-9.
60. Rojbani H, Nyan M, Ohya K, Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *J Biomed Mater Res A*. 2011; 98: 488-98.
61. Albee FH. Studies in Bone Growth: Triple Calcium Phosphate as a Stimulus to Osteogenesis. *Ann Surg*. 1920; 71: 32-9.
62. Nolff MC, Gellrich NC, Hauschild G, et al. Comparison of two beta-tricalcium phosphate composite grafts used for reconstruction of mandibular critical size bone defects. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2009; 22: 96-102.
63. Scheer JH, Adolfsson LE. Tricalcium phosphate bone substitute in corrective osteotomy of the distal radius. *Injury*. 2009; 40: 262-7.
64. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X. Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs. *Biomaterials*. 2000; 21: 1283-90.

-
65. Kamitakahara M, Ohtsuki C, Miyazaki T. Review paper: behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *J Biomater Appl.* 2008; 23: 197-212.
66. Grandi G HC, dos Santos LA, Silva ML, Sant'Ana MF, Pagnocelli RM, Silva DN. Comparative histomorphometric analysis between α -Tcp cement and β -TCP/HA granules in bone repair of rat calvaria. *Materials Research.* 2011; 14: 11-16.
67. Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Nezhad ST. Experimental bone defect healing with xenogenic demineralized bone matrix and bovine fetal growth plate as a new xenograft: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank.* 2009; 10: 33-41.
68. de Oliveira RC, de Oliveira FH, Cestari TM, Taga R, Granjeiro JM. Morphometric evaluation of the repair of critical-size defects using demineralized bovine bone and autogenous bone grafts in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19: 749-54.
69. Cardaropoli D, Re S, Manuzzi W, Gaveglia L, Cardaropoli G. Bio-Oss collagen and orthodontic movement for the treatment of infrabony defects in the esthetic zone. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2006; 26: 553-9.
70. Tapety FI, Amizuka N, Uoshima K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15: 315-24.
71. Schwartz Z, Weesner T, van Dijk S, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol.* 2000; 71: 1258-69.

72. Payer M, Lohberger B, Stadelmeyer E, et al. Behaviour of multipotent maxillary bone-derived cells on beta-tricalcium phosphate and highly porous bovine bone mineral. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21: 699-708.
73. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 4: 299-308.
74. Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980; 38: 176-80.
75. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg.* 1990; 1: 60-8.
76. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114: 713-20.
77. Gosain AK, Gosain SA, Sweeney WM, Song LS, Amarante MT. Regulation of osteogenesis and survival within bone grafts to the calvaria: the effect of the dura versus the pericranium. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 128: 85-94.
78. Kline RM, Jr., Wolfe SA. Complications associated with the harvesting of cranial bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 95: 5-13; discussion 14-20.
79. da Silva Filho OG, Teles SG, Ozawa TO, Filho LC. Secondary bone graft and eruption of the permanent canine in patients with alveolar clefts: literature review and case report. *Angle Orthod.* 2000; 70: 174-8.
80. Baqain ZH, Anabtawi M, Karaky AA, Malkawi Z. Morbidity from anterior iliac crest bone harvesting for secondary alveolar bone grafting: an outcome assessment study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 67: 570-5.

81. Goudy S, Lott D, Burton R, Wheeler J, Canady J. Secondary alveolar bone grafting: outcomes, revisions, and new applications. *Cleft Palate Craniofac J*. 2009; 46: 610-2.
82. Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 46: 665-70.
83. Matic DB, Power SM. Evaluating the success of gingivoperiosteoplasty versus secondary bone grafting in patients with unilateral clefts. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121: 1343-53; discussion 68-9.
84. Sato Y, Grayson BH, Garfinkle JS, et al. Success rate of gingivoperiosteoplasty with and without secondary bone grafts compared with secondary alveolar bone grafts alone. *Plast Reconstr Surg*. 2008; 121: 1356-67; discussion 68-9.
85. LaRossa D, Buchman S, Rothkopf DM, Mayro R, Randall P. A comparison of iliac and cranial bone in secondary grafting of alveolar clefts. *Plast Reconstr Surg*. 1995; 96: 789-97; discussion 98-9.
86. Ochs MW. Alveolar cleft bone grafting (Part II): Secondary bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996; 54: 83-8.
87. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am*. 2000; 31: 351-6.
88. Vacanti JP. Tissue engineering and regenerative medicine. *Proc Am Philos Soc*. 2007; 151: 395-402.
89. Vacanti JP. Editorial: tissue engineering: a 20-year personal perspective. *Tissue Eng*. 2007; 13: 231-2.

90. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999; 354 Suppl 1: SI32-4.
91. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998; 33: 165-82.
92. Nguyen PD, Lin CD, Allori AC, et al. Establishment of a critical-sized alveolar defect in the rat: a model for human gingivoperiosteoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 2009; 123: 817-25.
93. Raposo-Amaral CE, Kobayashi GS, Almeida AB, et al. Alveolar osseous defect in rat for cell therapy: preliminary report. *Acta Cir Bras*. 2010; 25: 313-7.
94. Schnitt DE, Agir H, David DJ. From birth to maturity: a group of patients who have completed their protocol management. Part I. Unilateral cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 113: 805-17.
95. Vacanti J. Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art. *J Pediatr Surg*. 1999; 45: 291-4.
96. Mitri F, Alves G, Fernandes G, et al. Cytocompatibility of porous biphasic calcium phosphate granules with human mesenchymal cells by a multiparametric assay. *Artif Organs*. 2012; 36: 535-42.
97. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*. 2003; 85-A: 1927-35.
98. English K, Mahon BP. Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 1963-8.

99. Guo SQ, Xu JZ, Zou QM, Jiang DM. Immunological study of allogeneic mesenchymal stem cells during bone formation. *J Int Med Res.* 2009; 37: 1750-9.
100. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, et al. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci.* 2005; 12: 47-57.
101. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, et al. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res.* 2006; 85: 966-79.
102. Risbud MV, Shapiro IM. Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005; 8: 54-9.
103. Cutting CB, Dayan JH. Lip height and lip width after extended Mohler unilateral cleft lip repair. *Plast Reconstr Surg.* 2003; 111: 17-23; discussion 24-6.
104. Millard DR, Jr. Rotation-Advancement Principle in Cleft Lip Closure. *Cleft Palate J.* 1964; 12: 246-52.
105. Millard DR, Jr. Refinements in Rotation-Advancement Cleft Lip Technique. *Plast Reconstr Surg.* 1964; 33: 26-38.
106. Lirani-Galvao AP, Jorgetti V, da Silva OL. Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. *Photomed Laser Surg.* 2006; 24: 735-40.
107. Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int.* 1988; 42: 284-6.
108. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987; 2: 595-610.

109. Raposo-Amaral CE, Raposo-Amaral CA. Changing face of cleft care: specialized centers in developing countries. *J Craniofac Surg.* 2012; 23: 206-9.
110. Gimbel M, Ashley RK, Sisodia M, et al. Repair of alveolar cleft defects: reduced morbidity with bone marrow stem cells in a resorbable matrix. *J Craniofac Surg.* 2007; 18: 895-901.
111. Cui L, Liu B, Liu G, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 2007; 28: 5477-86.
112. Goldman AS. Biochemical mechanism of glucocorticoid-and phenytoin-induced cleft palate. *Curr Top Dev Biol.* 1984; 19: 217-39.
113. Khaksary Mahabady M, Ranjbar R, Arzi A, Papahn AA, Najafzadeh H. A comparison study of effects of Echinacea extract and levamisole on phenytoin-induced cleft palate in mice. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46: 163-6.
114. Millicovsky G, Johnston MC. Maternal hyperoxia greatly reduces the incidence of phenytoin-induced cleft lip and palate in A/J mice. *Science.* 1981; 212: 671-2.
115. Demant P. Corticosteroid-induced cleft palate: cis interaction of MHC genes and hybrid resistance. *Immunogenetics.* 1985; 22: 183-8.
116. Melnick M, Jaskoll T, Slavkin HC. Corticosteroid-induced cleft lip in mice: a teratologic, topographic, and histologic investigation. *Am J Med Genet.* 1981; 10: 333-50.
117. Melnick M, Jaskoll T, Slavkin HC. Corticosteroid-induced cleft palate in mice and H-2 haplotype: maternal and embryonic effects. *Immunogenetics.* 1981; 13: 443-50.
118. Gong SG, White NJ, Sakasegawa AY. The Twirler mouse, a model for the study of cleft lip and palate. *Arch Oral Biol.* 2000; 45: 87-94.

-
119. el-Bokle D, Smith SJ, Germane N, Sharawy M. New technique for creating permanent experimental alveolar clefts in a rabbit model. *Cleft Palate Craniofac J*. 1993; 30: 542-7.
120. Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. *Oral Maxillofac Surg*. 2008; 12: 73-8.
121. Lee JY, Musgrave D, Pelinkovic D, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2-expressing muscle-derived cells on healing of critical-sized bone defects in mice. *J Bone Joint Surg Am*. 2001; 83-A: 1032-9.
122. Takagi K, Urist MR. The role of bone marrow in bone morphogenetic protein-induced repair of femoral massive diaphyseal defects. *Clin Orthop Relat Res*. 1982; 224-31.
123. Hollinger JO, Schmitz JP, Yaskovich R, et al. A synthetic polypentapeptide of elastin for initiating calcification. *Calcif Tissue Int*. 1988; 42: 231-6.
124. Winn SR, Schmitt JM, Buck D, et al. Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45: 414-21.
125. Yun JJ, Wikesjö UM, Borke JL, et al. Effect of systemic parathyroid hormone (1-34) and a beta-tricalcium phosphate biomaterial on local bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *J Clin Periodontol*. 2010; 37: 419-26.
126. Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M. Defects of the rat premaxilla as a model of alveolar clefts for testing bone-inductive agents. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 51: 887-91.
127. Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*. 2001; 22: 2581-93.

-
128. de Ruiter A, Meijer G, Dormaar T, et al. beta-TCP Versus Autologous Bone for Repair of Alveolar Clefts in a Goat Model. *Cleft Palate Craniofac J.* 2011; 48: 654-62.
129. Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials.* 1998; 19: 1473-8.
130. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, et al. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *J Biomed Mater Res.* 1999; 44: 98-108.
131. Bouler JM, Trecant M, Delecrin J, et al. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of five synthesis parameters on compressive strength. *J Biomed Mater Res.* 1996; 32: 603-9.
132. Gbureck U, Holzel T, Biermann I, Barralet JE, Grover LM. Preparation of tricalcium phosphate/calcium pyrophosphate structures via rapid prototyping. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 1559-63.
133. Ruano R, Jaeger RG, Jaeger MM. Effect of a ceramic and a non-ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2000; 71: 540-5.
134. Akagawa Y, Hashimoto M, Kondo N, Yamasaki A, Tsuru H. Tissue reaction to implanted biomaterials. *J Prosthet Dent.* 1985; 53: 681-6.
135. van Luyn MJ, Khouw IM, van Wachem PB, Blaauw EH, Werkmeister JA. Modulation of the tissue reaction to biomaterials. II. The function of T cells in the inflammatory reaction to crosslinked collagen implanted in T-cell-deficient rats. *J Biomed Mater Res.* 1998; 39: 398-406.

-
136. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20: 86-100.
137. Li Y, Kong F, Weng W. Preparation and characterization of novel biphasic calcium phosphate powders (alpha-TCP/HA) derived from carbonated amorphous calcium phosphates. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009; 89: 508-17.
138. Yuan H, De Bruijn JD, Li Y, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous alpha-TCP and beta-TCP. *J Mater Sci Mater Med.* 2001; 12: 7-13.
139. Matusovits D, Suba Z, Takacs D, et al. A pilot study of Cerasorb and Bio-Oss enhanced new bone formation in animal model. *Acta Biol Hung.* 2008; 59: 327-34.
140. Jensen T, Schou S, Svendsen PA, et al. Volumetric changes of the graft after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios: a radiographic study in minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2012; 23: 902-10.
141. Wong RW, Rabie AB. Effect of bio-oss collagen and collagen matrix on bone formation. *Open Biomed Eng J.* 2010; 4: 71-6.
142. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann(R) BoneCeramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2012. [Epub ahead of print].
143. Qu Y, Yang Y, Li J. Preliminary evaluation of a novel strong/osteoinductive calcium phosphate cement. *J Biomater Appl.* 2011; 26: 311-25.
144. de Oliveira ESM, Pelegrine AA, Alves Pinheiro da Silva A, et al. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: a tomographic and

histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Biomater.* 2012. [Epub ahead of print].

145. Gandolfi MG, Shah SN, Feng R, Prati C, Akintoye SO. Biomimetic calcium-silicate cements support differentiation of human orofacial mesenchymal stem cells. *J Endod.* 2011; 37: 1102-8.

146. Panetta NJ, Gupta DM, Quarto N, Longaker MT. Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.* 2009; 51: 25-41.

147. Wong VW, Rustad KC, Longaker MT, Gurtner GC. Tissue engineering in plastic surgery: a review. *Plast Reconstr Surg.* 2010; 126: 858-68.

148. Arinzeh TL, Tran T, McAlary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials.* 2005; 26: 3631-8.

149. Taub PJ, Yau J, Spangler M, Mason JM, Lucas PA. Bioengineering of calvaria with adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2009; 123: 1178-85.

150. Bateman JP, Safadi FF, Susin C, Wikesjo UM. Exploratory study on the effect of osteoactivin on bone formation in the rat critical-size calvarial defect model. *J Periodontal Res.* 2012; 47: 243-7.

151. Por YC, Barcelo CR, Salyer KE, et al. Bone generation in the reconstruction of a critical size calvarial defect in an experimental model. *J Craniofac Surg.* 2008; 19: 383-92.

152. Kneser U, Stangenberg L, Ohnolz J, et al. Evaluation of processed bovine cancellous bone matrix seeded with syngenic osteoblasts in a critical size calvarial defect rat model. *J Cell Mol Med.* 2006; 10: 695-707.

153. Levi B, Nelson ER, Li S, et al. Dura mater stimulates human adipose-derived stromal cells to undergo bone formation in mouse calvarial defects. *Stem Cells*. 2011; 29: 1241-55.
154. Levi B, James AW, Nelson ER, et al. Acute skeletal injury is necessary for human adipose-derived stromal cell-mediated calvarial regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 127: 1118-29.
155. Nguyen PD, Lin CD, Allori AC, et al. Scaffold-based rhBMP-2 therapy in a rat alveolar defect model: implications for human gingivoperiosteoplasty. *Plast Reconstr Surg*. 2009; 124: 1829-39.
156. Betz OB, Betz VM, Abdulazim A, et al. The repair of critical-sized bone defects using expedited, autologous BMP-2 gene-activated fat implants. *Tissue Eng Part A*. 2010; 16: 1093-101.
157. Cowan CM, Aghaloo T, Chou YF, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue Eng*. 2007; 13: 501-12.
158. Alonso N, Tanikawa DY, Freitas Rda S, et al. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. *Tissue Eng Part C*. 2010; 16: 1183-9.
159. Smith DM, Afifi AM, Cooper GM, et al. BMP-2-based repair of large-scale calvarial defects in an experimental model: regenerative surgery in cranioplasty. *J Craniofac Surg*. 2008; 19: 1315-22.

-
160. Smith DM, Cooper GM, Mooney MP, Marra KG, Losee JE. Bone morphogenetic protein 2 therapy for craniofacial surgery. *J Craniofac Surg*. 2008; 19: 1244-59.
161. Zuk P, Chou YF, Mussano F, Benhaim P, Wu BM. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res*. 2011; 52: 119-32.
162. Follmar KE, Prichard HL, DeCroos FC, et al. Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. *Ann Plast Surg*. 2007; 58: 561-5.
163. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002; 99: 3838-43.
164. Bartholomew A, Polchert D, Szilagyi E, Douglas GW, Kenyon N. Mesenchymal stem cells in the induction of transplantation tolerance. *Transplantation*. 2009; 87: S55-7.
165. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30: 42-8.
166. Gosain AK, Riordan PA, Song L, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part II. Bioengineering implants to optimize bone replacement in reconstruction of cranial defects. *Plast Reconstr Surg*. 2004; 114: 1155-63; discussion 64-5.

-
167. Gosain AK, Song L, Riordan P, et al. A 1-year study of osteoinduction in hydroxyapatite-derived biomaterials in an adult sheep model: part I. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 109: 619-30.
168. Raposo-Amaral CE, Warren SM. Highlights from the 11th International Congress on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies. *J Craniofac Surg*. 2011; 22: 781.
169. Chan WD, Perinpanayagam H, Goldberg HA, et al. Tissue engineering scaffolds for the regeneration of craniofacial bone. *J Can Dent Assoc*. 2009; 75: 373-7.
170. Wan DC, Nacamuli RP, Longaker MT. Craniofacial bone tissue engineering. *Dent Clin North Am*. 2006; 50: 175-90.
171. McCarthy JG, Schreiber J, Karp N, Thorne CH, Grayson BH. Lengthening the human mandible by gradual distraction. *Plast Reconstr Surg*. 1992; 89: 1-8; discussion 9-10.
172. Karp NS, Thorne CH, McCarthy JG, Sissons HA. Bone lengthening in the craniofacial skeleton. *Ann Plast Surg*. 1990; 24: 231-7.
173. McCarthy JG, Stelnicki EJ, Mehrara BJ, Longaker MT. Distraction osteogenesis of the craniofacial skeleton. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107: 1812-27.
174. McCarthy JG, ed. *Distraction of the Craniofacial Skeleton*. 1st ed. New York: Springer-Verlag, 1999.
175. Park JH, Kim DY, Sung IY, et al. Long-term results of spinal cord injury therapy using mesenchymal stem cells derived from bone marrow in humans. *Neurosurgery*. 2012; 70: 1238-47; discussion 47.

-
176. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain Physician*. 2012; 15: 75-85.
177. Paganelli C, Fontana P, Porta F, et al. Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. *J Oral Rehabil*. 2006; 33: 625-9.
178. Behnia H, Khojasteh A, Soleimani M, Tehranchi A, Atashi A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2012; 40: 2-7.
179. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*. 2007; 13: 947-55.

9. Apêndice

Aprovação do Comitê de Ética

Outras produções relacionadas à tese de doutorado

(Modelos animais e engenharia de tecidos ósseos)

**Outras produções com o orientador Prof.Dr. Nivaldo Alonso e não relacionadas
à tese de doutorado**