ANDRÉ DE MENDONÇA COSTA

**Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com
células-tronco de polpa dentária humana: estudo
experimental de neoformação óssea**

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

Área de concentração: Cirurgia Plástica
Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Alonso

São Paulo
2009

ANDRÉ DE MENDONÇA COSTA

**Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com
células-tronco de polpa dentária humana: estudo
experimental de neoformação óssea**

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

Área de concentração: Cirurgia Plástica
Orientador: Prof. Dr. Nivaldo Alonso

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, André de Mendonça

Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com células tronco de polpa dentária humana : estudo experimental de neoformação óssea / André de Mendonça Costa. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Cirurgia Plástica.

Orientador: Nivaldo Alonso.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Transplante de células-tronco mesenquimais
3.Células-tronco adultas 4.Ratos 5.Regeneração óssea 6.Polpa dentária
7.Anormalidades craniofaciais

USP/FM/SBD-348/09

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, José Maria, homem de caráter, homem sem preço.

À minha mãe Edméa, pelo seu amor incondicional sempre presente durante toda minha formação profissional. Um exemplo de dedicação e amor à família.

À minha esposa Elaine, companheira e cúmplice de todos os momentos desde o início de minha formação nas Minas Gerais que, com seu amor, me proporcionou a maior felicidade de minha vida: tornar-me pai de Guilherme no ano da dissertação desta tese.

Às minhas irmãs Andréa e Adriana, pela união e amor com que me cercam.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Nivaldo Alonso pela oportunidade de ter realizado minha formação em Cirurgia Crânio Maxilo Facial na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), acreditando na minha capacidade em realizar esta pesquisa e fornecendo-me alicerces necessários para reproduzir os ensinamentos que me foram transmitidos com sabedoria, clareza e humildade.

À Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno, a qual participou ativamente de minha pesquisa com prontidão incondicional e pelas opiniões valiosas que muito colaboraram com a dissertação desta tese, emitidas com humildade e alto nível de conhecimento.

Ao Prof. **Dr. Marcus Castro** Ferreira, chefe do serviço de Cirurgia Plástica da FMUSP pela abertura de oportunidades nessa importante faculdade.

À Dra. Daniela Bueno pela ajuda no fornecimento e estudo celular.

Ao Gerson Kobayashi, pela ajuda incondicional nos experimentos dos animais, compartilhando os acertos e desacertos na criação do modelo experimental.

À Profa. Marília Martins que com prontidão se dispôs a realizar as leituras do material histopatológico.

À Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas, na pessoa do Magnífico Reitor André Falcão pelo apoio na finalização desta tese.

Ao Dr. Gilberto Xavier e seus alunos por disponibilizar o seu laboratório para o estudo piloto do modelo experimental.

Aos funcionários do Centro do Estudo do Genoma Humano pela atenção.

A todos os amigos e familiares que direta ou indiretamente me incentivaram durante o período deste estudo.

Mais uma vez, à minha esposa Elaine, pelo auxílio na revisão do texto.

e tudo ficaram três coisas:

– a certeza de que estava sempre começando,

– a certeza de era preciso continuar e

– a certeza de que seria interrompido antes de terminar.

Fazer da interrupção um caminho novo,

fazer da queda um passo de dança,

do medo um escada,

do sonho uma ponte,

da procura um encontro.”

Fernando Sabino

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografia*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

SUMÁRIO

Lista de figuras	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
Summary	

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Considerações gerais.....	2
1.2	Princípios de reparação óssea.....	6
1.3	Bioengenharia de tecidos para o tratamento de deformidades ósseas.....	8
1.4	Células-tronco adultas.....	9
1.5	Reconstrução de tecidos ósseos craniofaciais.....	10
2	OBJETIVOS.....	14
3	MÉTODOS.....	16
3.1	Delineamento.....	17
3.2	Locais de realização.....	17
3.3	Fase 1 – Desenvolvimento do modelo experimental.....	18
3.3.1	Animais e considerações éticas.....	18
3.3.2	Descrição da técnica cirúrgica.....	18
3.3.3	Eutanásia.....	25
3.3.4	Padronização da análise óssea.....	26
3.4	Fase 2 – Reconstrução da calota craniana de ratos.....	26
3.4.1	Uso de células-tronco humanas e considerações éticas.....	26
3.4.2	Estabelecimento das linhagens celulares.....	27
3.4.3	Caracterização das linhagens de células-tronco.....	28
3.4.4	Preparação das células para transplantes.....	29
3.4.5	Procedimento cirúrgico e transplante celular.....	30
3.4.6	Preparação histológica.....	31
3.4.7	Análise da presença de células humanas no osso formado.....	33

4	RESULTADOS.....	35
4.1	Fase 1 – Desenvolvimento do modelo experimental.....	36
4.2	Fase 2 – Reconstrução da calota craniana de ratos.....	37
4.2.1	Determinação e diferenciação das linhagens de células-tronco.....	37
4.2.2	Reconstrução óssea após o transplante de células-tronco de polpa dentária humana.....	41
4.2.3	Análise da presença de osso humano.....	45
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	60
7	REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estante ventilatória com gaiolas individuais.....	19
Figura 2	Momento da anestesia intraperitoneal na região anterior do abdome.....	20
Figura 3	Aparelho cefalostato especialmente desenvolvido para ratos.....	20
Figura 4	Detalhe da imobilização do animal no cefalostato / Visão lateral.....	21
Figura 5	Detalhe da imobilização do animal no cefalostato / Visão anterior.....	21
Figura 6	Incisão na região mediana do crânio.....	22
Figura 7	Exposição da calvária	22
Figura 8	Realização da osteotomia com auxílio da broca cirúrgica.....	23
Figura 9	Anatomia normal do animal / Visão frontal e lateral.....	23
Figura 10	Detalhe da osteotomia com defeito de 10x10 mm.....	24
Figura 11	Detalhe da osteotomia com dois defeitos retangulares de 5 x 8 mm.....	24
Figura 12	Síntese da ferida operatória.....	25
Figura 13	Eutanásia do animal em câmara de CO ₂	25
Figura 14	Membranas de colágeno e células armazenadas em placas de “wells”	29
Figura 15	Ostetomia da calota craniana.....	32
Figura 16	Retirada do fragmento da calota craniana para estudo histopatológico.....	32
Figura 17	Detalhe do fragmento da calota craniana antes de realizar os cortes histológicos.....	32

Figura 18	Gráficos de Citometria de fluxo com linhagem obtida a partir de células tronco de polpa dentária: A: expressão (95% + 3) para marcadores mesenquimais (CD29, SH2, SH3 e SH4) e B: marcadores hematopoiéticos sem expressão.....	38
Figura 19	Morfologia das células tronco adultas, semelhante a fibroblastos.....	39
Figura 20	Início da diferenciação osteogênica após 9 dias de indução/ observa-se a morfologia de osteoblastos (A, A') e com Coloração de Von Kossa 21 dias após a diferenciação osteogênica/ observam-se nódulos de mineralização (B).....	40
Figura 21	Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 7 dias de pós-operatório. A, B: utilizando membrana apenas e A', B': membrana + células.....	42
Figura 22	Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 21 dias de pós-operatório. C: utilizando membrana apenas e C': membrana + células.....	43
Figura 23	Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 30 dias de pós-operatório. D,E: utilizando membrana apenas e D', E': membrana + células.....	44
Figura 24	Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 60 dias de pós-operatório. E,F: utilizando membrana apenas e E', F': membrana + células.....	45
Figura 25	Reação de cadeia de polimerase (PCR) amplificadas a partir do DNA extraído nos dois lados dos defeitos cranianos nos animais 60 dias após a cirurgia; GAPDG (PCR Primers – Ratos): 1- DNA controle do rato, 2-DNA osso do lado esquerdo, 3-DNA controle humano, 4-DNA osso do lado direito. COL18A1 (PCR Primers – Humanos): 5- DNA controle do rato, 6-DNA osso do lado esquerdo, 7- DNA controle humano, 8-DNA osso do lado direito, 9- Controle negativo.....	46

LISTA DE SIGLAS

BMPs	proteínas morfogenéticas ósseas (do inglês: <i>bone morphogenetic protein</i>)
DPSC	célula-tronco de polpa dentária (do inglês: <i>dental pulp stem cell</i>)
e-PTFE	Politetrafluoroetileno
FLP	fissuras lábio palatais
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GAG	Glicosaminoglicano
HA	hidroxiapatita
HA/TCP	hidroxiapatita + tricálcio fosfato
hDPSC	células-tronco adultas de polpa dentária (do inglês: <i>human dental pulp stem cell</i>)
HE	hematoxilina-eosina
MSC	células-tronco mesenquimais (do inglês <i>mesenchymal stem cells</i>)
PBS	água tamponada fosfatada (do inglês: <i>phosphate-buffered saline</i>)
SC	células-tronco (do inglês <i>stem cell</i>)
USP	Universidade de São Paulo

RESUMO

Costa AM. *Reconstrução de defeitos ósseos cranianos em ratos com células-tronco de polpa dentária humana: estudo experimental de neoformação óssea* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 95p.

Os defeitos da calota craniana causados por traumas severos, neoplasias, cirurgias ou deformidades congênitas representam um grande desafio para os cirurgiões. O uso de enxertia óssea autóloga continua sendo o método de tratamento padrão ouro, embora apresente morbidade na área doadora e seja considerado insuficiente para reconstrução de grandes defeitos. Recentemente, com o advento da bioengenharia tecidual, novas expectativas surgiram na regeneração óssea. O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo experimental em ratos para o estudo de deformidades craniofaciais e verificar se as células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos seriam capazes de regenerar defeitos críticos em calota craniana de ratos não imunossuprimidos. Foram realizados dois defeitos ósseos de espessura total com diâmetro de 5 x 8 mm na região biparietal. O lado esquerdo foi preenchido com membrana de colágeno, enquanto o lado direito com membrana de colágeno associada a células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos. Essas células foram caracterizadas previamente *in vitro* como células mesenquimais. A eutanásia dos animais foi realizada no 7º, 21º, 30º e 60º dia de pós-operatório e amostras de tecido ósseo foram extraídas para realização da análise histológica. A análise da presença de células humanas no novo osso formado foi confirmada através do estudo molecular. A linhagem de células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos foi positiva para células-tronco mesenquimais e sua diferenciação em tecido ósseo também foi evidenciada *in vitro*. Foi observada a formação óssea após 21 dias de cirurgia nos dois lados, sendo o lado direito um osso mais maduro. A reação da cadeia de polimerase para DNA humano foi amplificada apenas no lado direito demonstrando que existiam células humanas nesse novo osso formado. O uso de células-tronco de dentes decíduos humanas em ratos não imunossuprimidos não evidenciou rejeição durante o período estudado. Os achados sugerem que o modelo experimental descrito poderá ser utilizado para o estudo dos defeitos ósseos cranianos em cirurgia craniofacial e que o uso de células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos associado à membrana de colágeno parece representar uma importante estratégia para a reconstrução de tecidos ósseos e seu uso pode ser considerado uma opção para o reparo de grandes defeitos ósseos cranianos.

Descritores: 1.Células-tronco 2.Transplante de células-tronco mesenquimais 3.Células-tronco adultas 4.Ratos 5.Regeneração óssea 6.Polpa dentária 7. Anormalidades Craniofaciais

SUMMARY

Costa AM. *Reconstruction of cranial defects in rats with human dental pulp stem cells: experimental design of bone regeneration* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 95p.

Repair of bone defects caused by severe trauma, resection of tumors, and congenital deformity remains a big challenge to surgeons. As a gold standard for the treatment of bone defects in clinic, autologous bone grafts are usually limited by considerable donor site morbidity and available supply of tissue that can be harvested. Recently, tissue engineering has become a promising approach for bone regeneration. The main aim of this study is to create an experimental surgical protocol and evaluate the capacity of human dental pulp stem cells isolated from deciduous teeth, to reconstruct critical size cranial bone defects in nonimmunosuppressed rats. Bilateral 5 x 8 mm cranial full-thickness defects of parietal bone were created. The left side was supplied with collagen membrane only and the right side with collagen membrane and human dental pulp stem cells. Cells were used after *in vitro* characterization as mesenchymal cells. Animals were euthanized at 7, 21, 30 and 60 days postoperatively and cranial tissue samples were taken from the defects for histologic analysis. Analysis of the presence of human cells in the new bone was confirmed by molecular analysis. The human dental pulp stem cells lineage was positive for the four mesenchymal cell markers tested and showed osteogenic *in vitro* differentiation. The bone formation was observed 21 days after surgery on both sides, but a more mature bone was present in the right side. Human DNA was polymerase chain reaction-amplified only at the right side, indicating that this new bone had human cells. The use of human dental pulp stem cells in nonimmunosuppressed rats did not cause any graft rejection during this period. Our findings suggest that surgical protocol created may ultimately be used in experimental studies of cranial bone defects in craniofacial surgery and the use of human dental pulp stem cells together with collagen membrane seems to be a promising strategy for *in vivo* bone tissue reconstruction and their use might provide an option to repair human large cranial bone defects.

Descriptors: 1.Stem Cells 2.Mesenchymal Stem Cell Transplantation
3.Adult Stem Cells 4.Rats 5.Bone Regeneration 6.Dental Pulp
7.Craniofacial Abnormalities

I N T R O D U Ç Ã O

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os defeitos da calota craniana causados por traumas severos, infecções, neoplasias, cirurgias ou deformidades congênitas como, por exemplo, a *Aplasia Cútis*, representam um grande desafio para a cirurgia plástica reconstrutora⁽¹⁾. Alguns defeitos ósseos considerados críticos não se regeneram espontaneamente e requerem tratamento cirúrgico⁽²⁾. A intervenção cirúrgica se faz necessária porque os defeitos ósseos, enquanto se mantêm abertos, provocam alto índice de lesões cerebrais e disfunções neurológicas⁽³⁾, bem como graves sequelas estéticas. A correção dessas deformidades craniofaciais apresenta um alto grau de complexidade em vista das limitações de adaptação tecidual⁽⁴⁾ e dos procedimentos secundários que podem ser necessários.

O uso de enxertia óssea autóloga continua sendo o método reconstrutivo mais utilizado pelos cirurgiões, no entanto, pode ser considerado insuficiente para a reconstrução de grandes defeitos,^(5, 6, 7) visto que a disponibilidade de áreas doadoras de osso pode se tornar restrita em alguns pacientes após vários procedimentos cirúrgicos⁽⁸⁾.

O enxerto ósseo autógeno fresco, especialmente o trabecular, tem se mostrado superior a todos os tipos de tecidos ósseos autógenos ou

aloplásticos processados^(9, 10). Dentre as opções de enxertia autógena existem o osso da calota craniana, costela, osso ilíaco e tibial, por exemplo. Cada um deles apresenta algumas peculiaridades, como disponibilidade, debilitação de área doadora e graus de absorção variáveis, o que limita o sucesso desses enxertos^(11, 12). Ainda, a cicatrização ósteo-cartilaginosa pode ser ineficiente em muitos casos⁽¹³⁾. Dentre esses, o osso da calota craniana vem sendo mais utilizado tendo em vista suas vantagens, como: mesmo sítio cirúrgico, ser rapidamente inserido, sequela da área doadora aceitável, biologicamente estável, radioluciente, promovendo ainda uma adequada proteção do cérebro. Por outro lado, o seu uso torna-se de difícil modelagem podendo persistir superfícies irregulares, bem como graus de absorção variáveis que podem comprometer o aspecto estético. Além desses fatores, vale ressaltar a importância da área de contato entre a área receptora e doadora para evitar a formação de tecido fibroso entre elas, o que poderia prejudicar a regeneração óssea⁽¹⁴⁾.

Como descrito por Urist e Adams⁽¹⁵⁾ a indução osteogênica é um mecanismo de diferenciação e especialização celular, que decorre de uma interação entre o tecido receptor e doador, provocando:

1. Suporte e proteção para o crescimento de novos vasos para a restauração do fornecimento de sangue medular;
2. Células para osteogênese;
3. Fator de indução óssea que estimula as células hospedeiras pluripotenciais;
4. Antigenicidade reduzida.

Consequentemente, a dinâmica para a formação óssea no local do enxerto autógeno tem três requisitos básicos: uma célula própria, uma boa nutrição e um estímulo satisfatório⁽¹⁵⁾.

Segundo Fox⁽¹⁶⁾, a superioridade biológica de enxertos autógenos em cirurgia de reconstrução óssea baseia-se no fato de a matriz óssea enxertada ser não imunogênica.

Entretanto, esses enxertos ósseos, de acordo com Ripamonti⁽¹⁷⁾ defrontam-se com algumas desvantagens:

1. Complicações do sítio doador^(17, 18);
2. Fornecimento limitado do osso do doador;
3. Enxertia em sítios heterotópicos;
4. Alta absorção durante a cicatrização e incorporação.

Em vista das limitações do uso de autoenxertia, os enxertos de cadáveres na forma de matriz desmineralizada também começaram a ser utilizados com o intuito de induzir a formação de tecido ósseo^(19, 20). A utilidade clínica desses enxertos baseia-se na hipótese de indução de atividade óssea a partir de proteínas morfogenéticas (BMPs) presentes no aloenxerto⁽²¹⁾. Embora alguns estudos evidenciem um sucesso clínico com uso desses enxertos ósseos desmineralizados no reparo de defeitos ósseos, outros autores reportam uma atividade de indução óssea inconsistente^(22, 23). Todavia, ao contrário dos enxertos autógenos frescos, que são bem aceitos pelo organismo, sendo rapidamente vascularizados induzindo completa cicatrização do defeito, os aloenxertos congelados e frescos são largamente absorvidos e produzem forte resposta antigênica⁽²⁴⁾. Há também

o risco de transmissão de doenças infecciosas não detectadas. Desse modo, o uso de aloenxertos na prática clínica continua com algumas limitações.

O uso de material ósseo proveniente de bancos de tecidos cresceu bastante nos últimos anos; nos Estados Unidos, de uma estimativa de 100.000 casos em 1971 para aproximadamente 250.000 casos em 1991^(25, 26). Na última década, o uso clínico de homoenxertos ósseos atingiu 355.000 casos por ano. Desses, estima-se que 200.000 são para uso médico e o restante para uso odontológico⁽²⁷⁾.

Os xenoenxertos bovinos são corretamente comercializados como material inerte, livre de antígenos, porém, têm apresentado respostas insatisfatórias⁽²⁸⁾.

Os materiais autoplásticos como silicone, polimetilmetacrilato, hidroxiapatita (HA) e polipropileno podem também ser utilizados para cranioplastia como opção primária ou secundária, no entanto, apresentam algumas desvantagens em relação ao enxerto ósseo alógeno, como rejeição, infecção, extrusão e toxicidade^(7,14). Consequentemente, o material ou método ideal para reconstrução de grandes defeitos craniofaciais ainda não foi completamente desenvolvido.

Alternativa seria o uso de matrizes osteocondutivas, contudo apresentam limitação no processo de incorporação tecidual, infecções e risco de migração^(29, 30).

Nas últimas décadas, pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento e obtenção de biomateriais, visando à reparação de tecido ósseo. Apesar do número crescente de biomateriais que vêm sendo

desenvolvidos, observam-se índices variáveis de sucesso^(31, 32), porém, nenhum deles foi comprovado como o ideal. Dentre os biomateriais sintetizados, o principal tem sido a HA, uma vez que sua composição química é semelhante a do osso humano⁽³³⁾. Os biomateriais da HA são osteocondutivos, mas não intrinsecamente osteoindutivos. Apesar de serem biocompatíveis, apresentam um desempenho biofísico inadequado em termos de remodelação, podendo haver migração, deiscência, ulceração e extrusão. A ossificação com esses materiais costuma ocorrer nos limites da zona receptora, sem migração para as áreas mais internas do enxerto⁽³⁴⁾.

1.2 PRINCÍPIOS DE REPARAÇÃO ÓSSEA

A reparação óssea é definida como o restabelecimento da continuidade de tecidos defeituosos por outros tecidos que não têm capacidade de substituir funcionalmente e estruturalmente o tecido lesado, enquanto a regeneração óssea pode ser definida como um processo biológico complexo de renovação da arquitetura e função do tecido ósseo perdido⁽³⁵⁾. A regeneração óssea guiada, por sua vez, é definida como uma renovação óssea controlada em áreas onde existe um defeito ósseo, através da osteogênese, osteoindução ou osteocondução, restabelecendo as características funcionais e estruturais dos tecidos lesados⁽³⁶⁾. O princípio de regeneração óssea guiada é reconhecido como um método eficaz há mais

de uma década⁽³⁷⁾. Esse princípio é baseado na hipótese de que, durante o processo de cicatrização, diferentes tipos celulares apresentam potenciais diferenciados de migração para o local da ferida. A presença de uma membrana de diferentes tipos de materiais e propriedades funciona como uma barreira que impede a penetração de tecido fibroso no defeito ósseo, permitindo que células que apresentam um papel importante na regeneração óssea adentrem de forma lenta nesse espaço⁽¹⁴⁾. Estudos em animais e humanos comprovam essa eficácia, como por exemplo, na regeneração de perdas ósseas periodontais^(38, 39, 40), em conjunção com implantes dentários^(41, 42, 43, 44), na reparação de defeitos ósseos maxilomandibulares em ratos e macacos^(37, 45), ao redor dos espaços dos implantes de titânio cobertos por membrana de politetrafluroetileno (e-PTFE)^(45, 46) e no tratamento de defeitos diafisários segmentares em ratos⁽⁴⁷⁾. A controvérsia, no entanto, está na escolha do tipo de membrana a ser utilizada. A membrana de e-PTFE é a mais utilizada, mas seu uso requer um segundo tempo cirúrgico⁽⁴⁸⁾. Com o objetivo de tentar resolver esse problema, o uso de membranas de polímeros, utilizadas há vários anos na prática clínica, pode ser considerado um método bastante atrativo.

As membranas de colágeno também vêm sendo utilizadas, uma vez que o colágeno apresenta um papel importante na regulação do crescimento e diferenciação de osteoblastos^(48, 49). Farrel et al.⁽⁵⁰⁾ realizaram um estudo para testar o uso do colágeno tipo I glicosaminoglicano (GAG) como molde para o uso de células-tronco mesenquimais (MSC) de ratos, o que evidenciou que o colágeno poroso GAG suporta ambos: osteo e

condrogênese. Mas o uso de colágeno na mineralização óssea não está completamente estabelecido, como enxerto ósseo, diversos estudos indicam que o colágeno apresenta um valor limitado^(51, 52).

1.3 BIOENGENHARIA DE TECIDOS PARA O TRATAMENTO DE DEFORMIDADES ÓSSEAS

A bioengenharia de tecidos é definida como uma área interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e de ciências biológicas. Ela contribui para o desenvolvimento de substitutos biológicos para diversos tecidos no intuito de restaurá-los, mantê-los ou aumentar sua função⁽⁵³⁾. Estes tecidos substitutos podem ser gerados *in situ*, quando colocados materiais, bem como células precursoras na região que deve ser regenerada e são usados os próprios mecanismos de reparo de tecidos dos pacientes para induzir a regeneração do tecido afetado⁽⁵⁴⁾, ou *ex vivo* quando se usam implantes ou dispositivos extracorporais, que podem ou não conter células⁽⁵⁵⁾.

Para a engenharia de tecido ósseo é necessária uma grande quantidade de células e a utilização de um molde ou matriz confeccionado de biomateriais que simule o defeito ósseo e que mantenha mecanismos funcionais para a regeneração dos tecidos até que os mesmos apresentem essa capacidade^(56, 57).

Muitos materiais são utilizados para a confecção dos moldes para bioengenharia de tecido ósseo, como: associação de cerâmicas com fosfato de cálcio e moléculas bioativas⁽⁵⁷⁾; polímeros naturais como: colágenos, proteoglicanas, GAG, elastinas e HA^(14, 36, 48, 50, 58, 59, 60, 61, 62).

Existe um grande interesse dos pesquisadores no uso do polímero de colágeno, pois este possui alta biocompatibilidade⁽⁶²⁾ e também pela contribuição que ele pode dar para o entendimento da formação do tecido ósseo⁽⁶³⁾ e doenças relacionadas com a interrupção dos processos normais de biomineralização que ocorrem *in vivo*⁽⁶⁴⁾.

1.4 CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

Nos últimos anos, o conceito do uso de células-tronco (SC) em bioengenharia de tecidos ósseos introduziu novas perspectivas no tratamento celular de patologias teciduais⁽⁶⁵⁾. Na área da cardiologia foram isoladas SC embrionárias murinas e utilizadas para a produção de cardiomiócitos⁽⁶⁶⁾. Em 1997, a clonagem de um mamífero, a ovelha Dolly, trouxe um novo estímulo para a pesquisa de SC e à medicina regenerativa⁽⁶⁷⁾.

A utilização de SC adultas pode ser uma via alternativa promissora à utilização das SC embrionárias e seus entraves. Essas células têm a propriedade de se auto-renovar e de se diferenciar em um ou mais tecidos

especializados quando induzidas *in vitro* ou *in vivo*. Elas podem ser obtidas a partir dos mais diversos tecidos, como medula óssea⁽⁶⁸⁾, tecido adiposo^(69, 70), polpa de dente⁽⁷¹⁾, músculo⁽⁷²⁾, entre outros. As SC podem ser utilizadas como terapia celular para o reparo e regeneração de tecidos e órgãos⁽⁶⁷⁾.

Como essas células podem ser facilmente colhidas e potencialmente cultivadas *in vitro*, esse novo conceito abre amplas possibilidades para seu uso em medicina regenerativa, em especial por apresentar a vantagem de imunocompatibilidade das células autólogas.

Com o intuito de desenvolver novas técnicas para regeneração do tecido ósseo, estas células estão sendo usadas em ensaios pré-clínicos⁽⁷³⁾ e clínicos⁽⁷⁴⁾.

Tanto as SC embrionárias como as adultas são fontes potenciais para aplicações clínicas futuras⁽⁶⁶⁾. Parece haver uma vantagem das SC embrionárias, pelo fato de que podem ser mantidas indiferenciadas indefinidamente. Contudo, questiona-se a segurança de seu uso, em virtude da possibilidade de formação de um teratocarcinoma, invocando ainda muita cautela e vários estudos.

1.5 RECONSTRUÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS CRANIOFACIAIS

Para a reconstrução de tecidos ósseos craniofaciais é necessária a validação das técnicas de bioengenharia de tecidos em modelos animais, antes de sua aplicação em humanos.

Vários modelos animais de defeitos ósseos têm sido estudados para avaliar o potencial de materiais e candidatos biológicos para promoção de regeneração do tecido ósseo^(75, 76, 77). Esses modelos têm ajudado a elucidar os mecanismos de integração endósseos (fenômeno de osteocondução), bem como os mecanismos de remodelação óssea (fenômeno de osteoindução).

Muitos fatores afetam a escolha do modelo animal para a pesquisa de reparação óssea, como:

1. Biologia e anatomia do modelo animal;
2. A idade do animal, que pode afetar seu metabolismo ósseo;
3. O potencial de cura espontânea do defeito induzido no modelo animal.

Estudos do metabolismo ósseo associados à idade em humanos e em animais têm demonstrado uma redução no crescimento e remodelação óssea em idades mais avançadas^(78, 79), portanto, o sucesso da bioengenharia de tecido é fortemente dependente da idade do indivíduo receptor do enxerto, do tipo de molde escolhido, bem como do número de células mesenquimais plaqueadas no molde e sua capacidade de gerar osteoblastos e criar potencialmente grandes volumes de tecidos ósseos⁽⁷³⁾.

Para o estudo de bioengenharia de tecidos ósseos craniofaciais *in vivo* o modelo mais utilizado na literatura é a reconstrução de defeitos críticos criados em calotas cranianas de ratos^(2, 80). Esses defeitos são considerados críticos, uma vez que não se regeneram espontaneamente durante a vida do animal⁽²⁾.

Os tamanhos dos defeitos críticos variam de acordo com as espécies de ratos utilizadas no experimento^(80, 81, 82). De uma forma geral, defeitos críticos da calota craniana de ratos de 8 mm de diâmetro são os mais utilizados, pois a grande maioria dos autores afirma que quando esse defeito é mantido aberto por um determinado período de tempo, o mesmo não apresentará uma regeneração espontânea^(2, 83). Porém, esse modelo é falho em não determinar alguns aspectos fundamentais.

Foram realizados alguns estudos utilizando membranas e outros envolvendo biomateriais para avaliar a regeneração de defeitos cranianos em modelos animais^(14, 36, 48, 61, 84, 85, 86, 87). Recentemente, com as pesquisas envolvendo terapia celular, o uso de MSC para reconstrução óssea tem sido profundamente estudado e seus resultados podem facilitar na regeneração óssea em circunstâncias difíceis, o que permite supor que seu uso pode ser promissor em um futuro próximo, no sentido de substituir terapêuticas convencionais na reparação de grandes deformidades cranianas.

Outros autores evidenciam a eficiência das SC autógenas de medula óssea no sentido de fechar defeitos críticos na calvária de ratos^(1, 76, 77, 88, 89, 90, 91, 92). Para avaliar a eficácia dessas células na reparação de deformidades cranianas, outros tipos de fontes de SC autógenas como células de medula óssea⁽⁷⁷⁾ e gordura⁽⁹³⁾ também foram estudadas.

O uso de SC oriundas de polpa dentária humana (hDPSC) apresenta um grande interesse para a reconstrução óssea, uma vez que são células facilmente isoladas e expandidas e com grande plasticidade *in vitro* e *in vivo*^(68, 94, 95, 96). Essas células parecem apresentar uma atividade

imunossupressiva com grande potencial em aplicações clínicas autogenéticas *in vivo*, particularmente na reconstrução de tecidos calcificados⁽⁹⁷⁾. Entretanto, até a presente data não foram relatados na literatura estudos que avaliassem a potencialidade das hDPSC em reconstruir defeitos críticos da calota craniana de ratos não imunossuprimidos. Como se tem a perspectiva de utilizar no futuro a bioengenharia de tecido para reabilitação óssea dos pacientes portadores de deformidades craniofaciais, observa-se a necessidade de estabelecer um modelo experimental adequado para avaliar o potencial de SC na regeneração óssea craniofacial, assim como avaliar a capacidade das hDPSC e de diferentes tecidos para fechar defeitos críticos em calotas cranianas de modelos animais.

*O
B
J
E
T
I
V
O
S*

2 OBJETIVOS

1. Desenvolver um modelo experimental em ratos para o estudo de deformidades craniofaciais;
2. Verificar se as células-tronco humanas provenientes de dentes decíduos são capazes de regenerar defeitos críticos em calota craniana de ratos *in vivo*.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO

Estudo dividido em duas etapas:

1. Criação do modelo experimental aberto e prospectivo;
2. Utilização do modelo experimental para terapia celular aberto e prospectivo.

3.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO

Este estudo foi elaborado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), departamento de Cirurgia Plástica e Queimaduras e realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP).

Participaram deste projeto: Departamento de Cirurgia Plástica e Queimaduras, Faculdade de Medicina, USP; Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, USP; Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, USP; Instituto Butantã, USP.

3.3 FASE 1 – DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

3.3.1 Animais e considerações éticas

Para determinação de um modelo experimental em ratos que pudesse simular situações clínicas em humanos com deformidades cranianas foram selecionados para o experimento ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, machos, adultos com 4 meses de idade, com peso médio de 370 gr, tendo sido obtida a aprovação do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da USP, respeitando-se as devidas recomendações de proteção aos animais da instituição, bem como as leis nacionais de uso de animais em laboratórios.

3.3.2 Descrição da técnica cirúrgica

No pré-operatório, os animais foram mantidos em repouso por 48 horas, com acesso livre à água e comida, separados individualmente em gaiolas armazenadas em estante ventilatória com temperatura controlada a 22 °C e com 12 horas de ciclo de luz (Figura 1). Estas mesmas condições,

com controle de temperatura e iluminação, foram mantidas durante todo o período em que os animais permaneceram vivos.

Figura 1. Estante ventilatória com gaiolas individuais

Os animais inicialmente foram anestesiados (Figura 2) com injeção intraperitoneal (0,3 ml/100 gr de peso do animal) com uma combinação de cloridrato de ketamina (5%) e cloridrato de xilazina (2%).

Figura 2. Momento da anestesia intraperitoneal na região anterior do abdome

Em seguida, realizou-se a tricotomia com tricótomo na região da calvária, posicionando o animal no cefalostato especialmente desenvolvido para ratos, o qual foi mantido imobilizado através do conduto auditivo externo e arcada dentária superior durante todo o ato cirúrgico (Figuras 3,4 e 5).

Figura 3. Aparelho cefalostato especialmente desenvolvido para ratos

Figura 4. Detalhe da imobilização do animal no cefalostato / Visão lateral

Figura 5. Detalhe da imobilização do animal no cefalostato / Visão anterior

Realizou-se a antissepsia com povidine tópico (iodopovidona), posicionando-se os animais em campos cirúrgicos estéreis fenestrados.

Sob condições estéreis, foi realizada uma incisão de 2 cm na pele com lâmina de bisturi número 15 na região mediana do crânio, estendendo-a da região nasofrontal até a protuberância occipital (Figura 6). A pele, os tecidos abaixo e o músculo temporal foram rebatidos lateralmente para que se pudesse obter uma ampla exposição da calvária, sendo o periósteo

removido (Figura 7). Foram criados defeitos ósseos de espessura total na calota craniana com auxílio de brocas esféricas acopladas a motor de baixa rotação sob irrigação constante de solução fisiológica a 0,9% para prevenir superaquecimento do osso (Figura 8). Para minimizar os riscos de lesão da dura-máter durante a realização da osteotomia utilizou-se o microscópio com lente de aumento de 3 vezes e com um descolador de periósteo foi rebatida a janela óssea.

Figura 6. Incisão na região mediana do crânio

Figura 7. Exposição da calvária

Figura 8. Realização da osteotomia com auxílio da broca cirúrgica

Baseando-se na anatomia normal dos animais (Figura 9) foram realizadas falhas ósseas na calota craniana em dois grupos:

Figura 9. Anatomia normal do animal / Visão frontal e lateral

Grupo 1 (N = 20):

Nesse grupo foi realizada uma falha óssea de espessura total de 10 x 10 mm que atravessava a sutura sagital (Figura 10).

Figura 10. Detalhe da osteotomia com defeito de 10X10 mm

Grupo 2 (N = 20):

Foi realizada uma falha óssea no osso parietal esquerdo e direito de 5 x 8 mm cada, de espessura total, com maior extensão no plano sagital, sem atravessar a sutura sagital (Figura 11).

Figura 11. Detalhe da osteotomia com dois defeitos retangulares de 5X8 mm

Em seguida, realizou-se a síntese da ferida operatória em todos os animais de ambos os grupos com pontos simples, utilizando fio mononylon 4-0 e agulha cortante 1.9 (Figura 12).

Figura 12. Síntese da ferida operatória

3.3.3 Eutanásia

Os animais foram sacrificados após 8 e 16 semanas de pós-operatório em câmara de CO₂ (Figura 13), conforme rotina da unidade de animais de experimentação do Centro de Estudo do Genoma Humano da USP.

Figura 13. Eutanásia do animal em câmara de CO₂

3.3.4 Padronização da análise óssea

Para padronização do estudo de análise óssea, foram realizados cortes histológicos em animais nos quais se simulou defeitos críticos, visando ao melhor entendimento do tipo de corte utilizado e também da forma de avaliação.

3.4 FASE 2 – RECONSTRUÇÃO DA CALOTA CRANIANA DE RATOS

3.4.1 Uso de células-tronco humanas e considerações éticas

O uso de SC humanas foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da USP, tendo sido seguidas as devidas recomendações. O responsável legal pelo paciente assinou o termo de consentimento, aceitando a participação nesta pesquisa.

Foi utilizada linhagem de células-tronco de polpa dentária (DPSC) extraída de dente decíduo, sob anestesia local, de um indivíduo normal de 6 anos de idade que não apresentava nenhuma doença sistêmica ou genética.

A polpa dentária foi lavada com água tamponada fosfatada (PBS; 0,01M; pH = 7,4) suplementada com 4% de antibiótico (100 unid/ml

penicilina e 100 µg/ml estreptomicina), para remover possíveis contaminações e células sanguíneas.

3.4.2 Estabelecimento das linhagens celulares

O estabelecimento das linhagens celulares e a avaliação da plasticidade celular *in vitro* foram realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, sob coordenação da Profa. Dra. Maria Rita Passos Bueno, sendo parcialmente incluídos da tese de doutoramento da Dra. Daniela Franco Bueno.

Para o estabelecimento das linhagens celulares, o meio controle utilizado foi: DMEM F12, 2 mm l-glutamina, 100 U/ml sulfato de estreptomicina a 1%, aminoácidos não essenciais e 15% de soro fetal bovino.

Os tecidos foram digeridos em solução de tripsina 0,25% por uma hora a 37 °C e depois foram transferidos para placas de petri de 35 mm com o meio controle. As culturas foram mantidas nessas condições por duas semanas e depois foram tripsinizadas (0,25% de solução de tripsina) e plaqueadas 10^4 células em garrafas de 25 cm². Todas as culturas foram mantidas em semiconfluência para prevenir a diferenciação das células.

3.4.3 Caracterização das linhagens de células-tronco

Com o intuito de caracterizar as SC com relação ao imunofenótipo foram conduzidos experimentos de citometria de fluxo. Neste processo, as células são alinhadas em um microcapilar e analisadas uma a uma por um feixe de *laser* capaz de detectar a fluorescência emitida pelas células. Os sinais gerados são interpretados por um sistema computacional que os transforma em dados para posterior análise.

As linhagens obtidas foram cultivadas até a obtenção do número ideal de células para a leitura de 10.000 eventos para cada anticorpo utilizado. Neste ponto, elas foram removidas da superfície da placa de cultivo utilizando tripsina e lavadas com PBS uma vez. Logo em seguida, as células foram incubadas a 4 °C por 30 min com os seguintes anticorpos primários: CD29, CD34, CD45, SH2, SH3 e SH4. Após lavagem com PBS uma vez, as células marcadas com anticorpo primário não conjugado foram incubadas com o anticorpo secundário “goat anti-mouse-PE” por 15 min a 4 °C. Por fim, a suspensão celular foi lavada com PBS uma vez e a leitura das amostras foi realizada no citômetro de fluxo.

A plasticidade das SC para diferenciação osteogênica foi realizada através do protocolo utilizado para induzir as diferenciações osteogênicas *in vitro* ^(70, 98). A coloração de Von Kossa foi o método utilizado no 21º dia após a indução osteogênica *in vitro*.

3.4.4 Preparação das células para transplantes

As SC foram cultivadas em meio específico (DMEM F12) com 10^5 de soro fetal bovino. Posteriormente, 10^6 SC indiferenciadas provenientes de polpa dentária humana foram plaqueadas em uma membrana de colágeno bovino (5x8 mm de extensão). Cada uma das membranas, após o plaqueamento das células, foi colocada em placas individuais de petri. Uma hora após o plaqueamento das células na membrana de colágeno (para permitir a aderência dessas células na membrana de colágeno) os “wells” foram suplementados com 2,5 ml de meio de cultura e as células foram incubadas por aproximadamente 24 horas, a uma temperatura de 37 °C em 5% de CO₂, antes do seu transplante (Figura 14).

Figura 14. Membranas de colágeno e células armazenadas em placas de “wells”

3.4.5 Procedimento cirúrgico e transplante celular

Selecionou-se para o experimento ratos (*Rattus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, machos, com as mesmas características determinadas na fase 1, tendo sido obtida a aprovação do Comitê de Ética Animal do Instituto de Biociências da USP, respeitando-se as devidas recomendações de proteção aos animais da instituição, bem com as leis nacionais de uso de animais em laboratórios.

Utilizando o procedimento cirúrgico padronizado na fase 1, foram realizados dois defeitos críticos, simétricos, de espessura total de 5 x 8 mm de extensão, na região biparietal de todos os animais.

Depois de confeccionados os defeitos críticos da calota craniana, foram introduzidas as membranas de colágeno e as SC previamente estabelecidas.

Os animais foram divididos em quatro grupos: A, B, C e D. No grupo A (n=2), o lado direito foi preenchido com SC com membrana de colágeno e o lado esquerdo apenas com membrana, tendo sido a eutanásia realizada após 7 dias. No grupo B (N=2), o lado direito foi preenchido com SC com membrana de colágeno e o lado esquerdo apenas com membrana, com a eutanásia realizada após 21 dias. No grupo C (N=2), o lado direito foi preenchido com SC com membrana de colágeno e o lado esquerdo apenas com membrana, com a eutanásia realizada após 30 dias. No grupo D (n=2),

o lado direito foi preenchido com SC com membrana de colágeno e o lado esquerdo apenas com membrana, com eutanásia realizada após 60 dias.

3.4.6 Preparação histológica

A análise histológica foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, da Faculdade de Odontologia da USP. Essa análise foi qualitativa e foi analisada a presença ou não de tecido mineralizado e o seu respectivo grau de maturidade.

Após a eutanásia do animal realizou-se a remoção de toda a calota craniana (Figuras 15, 16, 17). Os fragmentos obtidos foram imediatamente imersos em solução de formol a 10%, onde permaneceram por 24 horas. A seguir, os fragmentos sofreram descalcificação para permitir o corte em micrótomo comum. Essa descalcificação foi realizada através da imersão em ácido fórmico a 5% por 48 horas. Após esse período, realizou-se o teste da agulha para verificar se todo o material inorgânico havia sido removido. Caso o fragmento apresentasse resistência durante o teste, seria novamente imerso na solução de ácido fórmico.

Figura 15. Osteotomia da calota craniana

Figura 16. Retirada do fragmento da calota craniana para estudo histopatológico

Figura 17. Detalhe do fragmento da calota craniana antes de realizar os cortes histológicos

Ao final dessa etapa, os cortes foram lavados em água corrente por cerca de 15 horas, para interromper a ação do ácido.

A seguir, realizou-se a secção dos fragmentos preparando-se a superfície de inclusão. Essa secção foi feita no sentido látero-lateral, passando pelo centro (no sentido ântero-posterior) do defeito produzido cirurgicamente. Os dois segmentos obtidos foram acondicionados em cassetes próprios para processamento histológico e seguiram para desidratação e embebição em parafina, processo realizado automaticamente em equipamento histotécnico.

Em sequência a esta etapa, foram preparados blocos de parafina com os dois segmentos obtidos de cada animal; depois disso foram cortados em micrótomo em fragmentos de 5 µm, estendidos em lâminas de vidro.

Os cortes histológicos foram corados de forma rotineira por hematoxilina-eosina (HE), recobertos por lamínulas sintéticas e observados ao microscópio.

3.4.7 Análise da presença de células humanas no osso formado

Os tecidos foram avaliados através de secções histológicas para a extração do DNA. Os materiais foram obtidos do lado esquerdo da calota craniana (membrana) e do lado direito (membrana e células) depois de 60 dias do transplante. O DNA foi extraído através do protocolo “QIAamp DNA

Mini KIT". Para a amplificação do DNA humano, utilizou-se reação em cadeia da polimerase, como descrito anteriormente ⁽⁹⁹⁾. "Primers" específicos de ratos foram utilizados para amplificação do DNA dos ratos (GAPDH gene). Duas cadeias de reação polimerase de 35 e 30 ciclos foram realizadas respectivamente.

R E S U L T A D O S

4 RESULTADOS

4.1 FASE 1 – DESENVOLVIMENTO DO MODELO EXPERIMENTAL

No grupo 1 (N = 20) houve laceração em maior ou menor grau do seio sagital em nove ratos, tendo o sangramento sido contido com compressão leve. No referido grupo, dois animais evoluíram para óbito nas primeiras 24 horas e em quatro animais houve laceração profunda da dura-máter durante a osteotomia. Todos os animais que evoluíram para óbito nas primeiras 24 horas foram imediatamente substituídos por outros animais para recomposição do grupo. Em oito semanas, 10 animais foram sacrificados, não tendo sido observada ossificação durante esse período. Em 16 semanas, 10 animais foram sacrificados, tendo sido observada apenas pequena ossificação nas margens. Em nenhum dos animais desse grupo houve fechamento espontâneo da falha óssea criada pelo cirurgião, nem mesmo atingindo 50% a área desse defeito.

No grupo 2 (N = 20) não houve laceração do seio sagital e qualquer sangramento que necessitasse de intervenção. Também não foi observado nenhum óbito durante o trans-operatório, pós- imediato e tardio. Em oito semanas, 10 animais foram sacrificados, não tendo sido observada ossificação durante esse período. Em 16 semanas, 10 animais foram sacrificados e foi observada apenas pequena ossificação nas margens, de

maneira semelhante aos animais do grupo 1. Em nenhum dos animais desse grupo houve fechamento espontâneo da falha óssea criada pelo cirurgião, nem mesmo atingindo 50% a área desse defeito.

Em nenhum dos animais dos dois grupos houve sinais sugestivos de infecção nem qualquer outro tipo de complicação pós-operatória.

4.2 FASE 2 - RECONSTRUÇÃO DA CALOTA CRANIANA DE RATOS

4.2.1 Determinação e diferenciação das linhagens de células-tronco

Observou-se que a linhagem celular de polpa dentária apresentou uma expressão semelhante ($95\% \pm 3$) dos marcadores mesenquimais (CD29, SH2, SH3 e SH4); já os marcadores hematopoiéticos não apresentaram expressão (Figura 18). Microscopicamente, essas células apresentaram morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 19) e em condições apropriadas se diferenciaram em osteoblastos *in vitro* (Figura 20).

Figura 18. Gráficos de Citometria de fluxo com linhagem obtida a partir de células tronco de polpa dentária: A: expressão (95% + 3) para marcadores mesenquimais (CD29; SH2, SH3 e SH4) e B: marcadores hematopoiéticos sem expressão

Figura 19. Morfologia das células tronco adultas, semelhante a fibroblastos

Figura 20. Início da diferenciação osteogênica após 9 dias de indução / observa-se a morfologia de osteoblastos (A, A') e com coloração de Von Kossa 21 dias após a diferenciação osteogênica / observam-se nódulos de mineralização (B)

4.2.2 Reconstrução óssea após o transplante de células-tronco de polpa dentária humana

Foi avaliado o processo de formação óssea em defeitos cranianos críticos através da análise histológica com 7, 21, 30 e 60 dias após a cirurgia em que foram implantadas as SC. Nenhum dos animais evoluiu para óbito, infecção ou qualquer outra complicação.

Nos animais analisados com 7 dias de pós-operatório, foi observado que o defeito ósseo estava preenchido por tecido conjuntivo denso com intenso e difuso processo inflamatório, rico em macrófagos e com restos da membrana de colágeno. O mesmo cenário foi observado no grupo do lado direito em que foram associadas SC à membrana de colágeno, mas não foram observados restos de membrana (Figura 21).

Figura 21. Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 7 dias de pós-operatório. A, B: utilizando membrana apenas e A', B': membrana + células

No 21º dia de pós-operatório, ambos os lados apresentavam-se com uma mistura de tecido ósseo cortical imaturo e tecido de granulação. No lado direito, o tecido ósseo formado apresentava-se ligeiramente mais maduro e com presença de formação lamelar e menor quantidade de tecido de granulação (Figura 22).

Figura 22. Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 21 dias de pós-operatório. C: utilizando membrana apenas e C': membrana + células

Com 30 dias de pós-operatório, o processo de regeneração estava mais avançado e, em ambos os lados, os defeitos foram totalmente preenchidos por tecido ósseo, parcialmente imaturo e com características de osso lamelar. O novo osso formado apresentava-se fundido com o osso

remanescente da calota craniana. No lado esquerdo, ainda foi possível observar tecido de granulação, enquanto que no lado direito, onde foram utilizadas as DPSC, o tecido ósseo aparecia de forma mais densa e madura (Figura 23).

Figura 23. Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 30 dias de pós-operatório. D,E: utilizando membrana apenas e D', E': membrana + células

No grupo com 60 dias de pós-operatório o defeito craniano estava aparentemente regenerado em ambos os grupos (Figura 24), sendo no lado direito observado um tecido ósseo mais organizado e maduro.

Figura 24. Análise histológica comparativa dos defeitos cranianos com 60 dias de pós-operatório. E,F: utilizando membrana apenas e E', F': membrana + células

4.2.3 Análise da presença de osso humano

A amplificação do DNA utilizando “primers” que amplificam especificamente genes humanos foi obtida com sucesso apenas com o DNA derivado do lado direito do defeito craniano. No material derivado do lado esquerdo, a amplificação do DNA foi obtida somente com “primers” específicos para ratos (Figura 25).

Figura 25. Reação de cadeia de polimerase (PCR) amplificadas a partir do DNA extraído nos dois lados dos defeitos cranianos nos animais com 60 dias após a cirurgia; GAPDH (PCR *Primers* – Ratos): 1-DNA controle do rato, 2-DNA osso do lado esquerdo, 3-DNA controle humano, 4-DNA osso do lado direito. COL18A1 (PCR *Primers* – Humanos): 5- DNA controle do rato, 6-DNA osso do lado esquerdo, 7-DNA controle humano, 8-DNA osso do lado direito, 9-Controle negativo

D I S C U S S Ã O

5 DISCUSSÃO

Um dos grandes desafios para os cirurgiões plásticos é a reconstrução de extensos defeitos ósseos acompanhados de perda tecidual, em especial aqueles localizados na calota craniana, os quais podem ser secundários a anomalias congênitas, traumas, neoplasias, infecções ou outras situações clínicas em que se faz necessária não somente a restauração estética, mas também o restabelecimento funcional da rígida proteção óssea para o cérebro. Embora os enxertos autógenos venham sendo o método cirúrgico mais utilizado, esses apresentam algumas limitações como: área doadora limitada, possibilidade de outras intervenções, absorção, infecção, dentre outras^(100, 101). Durante os últimos anos, vários tipos de materiais aloplásticos como silicone, polimetilmetacrilato, HA e polietileno poroso vêm sendo utilizados como alternativa para alguns casos⁽¹⁰²⁾. Na última década, novas tecnologias envolvendo os biomateriais e a engenharia tecidual têm sido desenvolvidas com promessas de solucionar algumas questões^(48, 84, 103).

A calvária foi escolhida para simular grandes perdas ósseas craniofaciais porque é composta por osso membranoso, tem um suplemento sanguíneo relativamente limitado e estas propriedades biológicas lhe conferem pouca capacidade para se regenerar espontaneamente⁽²⁾, além disto, é uma área anatomicamente livre de estresse mecânico, com uma estabilidade relativa das estruturas que circundam os defeitos críticos, as quais incluem margens calvariais intactas, a base da dura-máter e os

músculos temporais e frontais. Essas características criam um processo de desenvolvimento no qual é possível estudar as interações entre o novo osso reconstruído e o osso *in situ* ⁽⁷⁷⁾.

Freeman⁽¹⁰⁴⁾ e Turnbull⁽¹⁰⁵⁾ foram os primeiros a estudar sobre os defeitos críticos na calvária dos ratos. Eles demonstram que falhas ósseas de 2 mm de diâmetro na região parietal não se regeneram em 12 semanas. Mulliken et al. ⁽¹⁰⁶⁾ e Glowacki et al. ⁽¹⁰⁷⁾ determinam que um defeito de 4 mm na calota craniana dos ratos permanece aberto mesmo após 6 meses. Takagi e Urist⁽¹⁰⁸⁾ realizaram um defeito de 8 mm que posteriormente reduziu para 5 mm em 4 semanas e não foi observada regeneração do defeito após 12 semanas de observação.

Após o desenvolvimento de defeitos ósseos de tamanhos variados, objetivando determinar um modelo experimental que pudesse estudar as deformidades craniofaciais, optou-se pelo defeito crítico retangular de 5 x 8 mm de extensão na região biparietal, visto que o mesmo não apresentou fechamento espontâneo da falha óssea, nem mesmo atingindo 50% da área após 16 semanas de observação. Não foram observados sinais flogísticos macroscópicos, nem exposição da área operada. Enquanto que, ao realizar falhas ósseas maiores (10 x 10 mm), houve uma laceração em maior ou menor grau do seio sagital, acarretando grande morbimortalidade e colocando o animal em risco de sangramento e de infecções graves do sistema nervoso central, além do fato de que essa falha envolvia suturas cranianas, que têm sabidamente um comportamento biomolecular diferente das outras regiões do osso craniofacial⁽¹⁰⁹⁾. Dessa forma, o modelo

experimental com defeito retangular de 5x8 mm na região biparietal pareceu ser o ideal para esses estudos, já que essa falha, além de ser considerada crítica, possibilitava que a incisão do escalpo ficasse afastada da área de manipulação óssea, provocando menor sangramento por haver menos risco de lesão do seio sagital; ademais, optando por esse modelo, pôde-se fazer duas falhas ósseas biparietais, permitindo um grupo controle com maior precisão para comparação dos dois lados em um mesmo animal, o que facilitou estudos nessa região.

A capacidade de regeneração óssea em animais vem sendo estudada há algum tempo por diversos autores. Já em 1939, Suto e Jacobson relatam que ratos jovens apresentam uma grande habilidade de regenerar defeitos calvariais de 3 mm após 5 meses em comparação com ratos adultos⁽¹¹⁰⁾. Longaker et al.⁽¹¹¹⁾ evidenciam que ratos jovens (6 dias de idade) apresentam uma significativa habilidade em reossificar defeitos ósseos na calvária quando comparados a animais adultos (60 dias de idade), após 8 semanas de vida. Modelos experimentais adicionais com outros animais jovens também evidenciam a grande habilidade dos mesmos em regenerar defeitos cranianos em comparação com animais adultos^(110, 112, 113).

Em humanos, a capacidade de regeneração óssea da calvária é bastante conhecida há algum tempo⁽¹¹⁴⁾. Hassler e Zentner⁽¹¹⁵⁾ demonstram que a reossificação nos pacientes com craniossinostose submetidos à craniotomia usualmente se inicia após duas semanas do pós-operatório, sendo finalizada 6 meses após a cirurgia, quando realizada em crianças com até 6 meses de idade, ao passo que se observa uma reossificação tardia e

incompleta quando as crianças são operadas acima dos 12 meses de idade. Desse modo, na criação de um modelo experimental, os animais devem ser adultos, o que manteria o comportamento similar ao dos seres humanos, que são o foco de estudo principal após a validação dos estudos experimentais. Embora a regeneração óssea em animais adultos possa acontecer após esse período, acredita-se, a exemplo de outros autores, que essa reparação seja mínima. Já em animais jovens a reparação continuaria de forma bastante robusta e, eventualmente, fecharia o defeito ósseo por completo, o que poderia dificultar a avaliação da regeneração óssea nos defeitos considerados críticos^(76, 111).

Utilizou-se o período máximo de observação de 8 semanas, pois foi descrito anteriormente por outros autores que esse tempo seria suficiente para mensurar a reparação óssea em outros modelos adultos de calvária de ratos ^(76, 112), o que ficou comprovado por nossos experimentos realizados na fase 1, ocasião em que se determinou o tamanho dos defeitos críticos e o período da eutanásia.

Houve a remoção do perióstio na confecção da falha óssea em virtude da possibilidade de ser este um fator determinante no estabelecimento do defeito crítico. Embora alguns autores ^(113, 116) afirmem que o perióstio da região da calvária não seja comprovadamente importante no processo de regeneração óssea, outros⁽¹¹⁷⁾ demonstram que o perióstio remanescente no sítio da osteotomia exerce papel fundamental na determinação da dimensão dos defeitos críticos de ossos longos. E, ainda, que defeitos de 12 mm na fíbula de ratos não são considerados críticos se o perióstio é

mantido, enquanto com a sua remoção defeitos de 6 mm são considerados críticos. Além disto, dados mais recentes comprovam que o periósteo contém uma fonte de MSC que pode induzir a diferenciação osteogênica e promover reparos espontâneos em ossos longos⁽¹¹⁸⁾. No entanto, as bordas dos defeitos calvariais isoladamente, uma potencial fonte de células osteoprogenitoras, nunca foi comprovadamente importante no processo de reparação óssea^(112, 113).

A integridade da dura-máter destacada na confecção do modelo experimental em estudo foi outro fator importante a ser considerado, pois se acreditava que ela pudesse ser responsável pelo sucesso do processo de regeneração óssea. Hobar et al.⁽¹¹²⁾ enfatizam a importância da dura-máter na regeneração de defeitos críticos de porcos e levantam uma correlação desse papel e da idade do animal. Sabe-se ainda que a dura-máter de animais jovens contém células progenitoras com capacidade de diferenciação óssea⁽¹¹¹⁾. Acredita-se, de igual forma, que a sua lesão pode interferir no estímulo para a formação óssea quando se estuda o papel das SC na reparação óssea, por exemplo. Ou seja, essa lesão pode induzir a formação de tecido nervoso, uma vez que ao introduzir SC indiferenciadas, essas podem se diferenciar em tecido nervoso, muscular, ósseo, cartilaginoso e gorduroso. De fato, parece que a combinação entre a dura-máter jovem e a calvária jovem permite que os animais jovens apresentem uma regeneração com sucesso. No entanto, outros estudos envolvendo biologia molecular e celular são necessários para um completo entendimento dessa regeneração óssea complexa.

Ressalte-se, ainda, que o uso do cefalostato especialmente desenvolvido para ratos e o uso do microscópio permitiram uma osteotomia mais precisa, sem lesões adjacentes. O primeiro fez com que o animal ficasse estático, em uma posição adequada durante todo o ato cirúrgico, de maneira semelhante às cirurgias cranianas humanas e o segundo permitiu a visualização direta durante a osteotomia, evitando a lesão da dura-máter.

Os resultados deste estudo evidenciaram que hDPSC associadas à membrana de colágeno induzem a formação óssea em defeitos críticos de calota craniana de ratos não imunossuprimidos, com formação de tecido ósseo lamelar e evidência de união entre o novo tecido ósseo e o tecido ósseo remanescente da calvária dos ratos. Da mesma forma, ficou evidenciado que o uso de hDPSC com membrana de colágeno forma um tecido ósseo bastante homogêneo nos animais experimentais, sugerindo que o uso dessas células poderia apresentar um futuro promissor. Os defeitos também foram fechados com o uso de membrana de colágeno isoladamente, mas o processo de ossificação foi mais demorado quando comparado ao uso de SC associado à membrana de colágeno.

Mankani et al.⁽⁷⁷⁾ conduziram um estudo com SC de medula óssea e hidroxiapatita + tricálcio fosfato (HA/TCP) em ratos imunossuprimidos e evidenciaram que cerca de 75% dos animais transplantados com SC de medula óssea e HA/TCP apresentaram significativa formação óssea em 6 semanas. Os estudos dos citados autores podem ser comparados com o presente trabalho e permitem sugerir que o uso de MSC humanas de medula óssea e de polpa dentária se mostram bastante eficientes para a

reconstrução de grandes defeitos cranianos. No entanto, esses pesquisadores utilizaram animais imunossuprimidos. É importante salientar que o uso de DPSC apresenta algumas vantagens em relação a células provenientes de outras regiões, pois a perda dentária é um processo não invasivo, natural da evolução dos seres humanos, além de serem rapidamente expandidas *in vitro*.

Kresbsbach et al.⁽⁷⁶⁾ demonstram que SC de medula óssea de ratos são capazes de fechar defeitos críticos no crânio desses animais quando aplicados conjuntamente com o carreador de colágeno em duas semanas após o transplante. Todavia, esses transplantes falham no sentido de haver a unificação do novo tecido ósseo com o tecido remanescente na lesão craniana, embora nos estudos aqui desenvolvidos tenha havido uma junção entre esses tecidos. Os autores acreditam que essa falha de união se deve ao fato de o perióstio não ter sido totalmente removido. Também sugerem que o uso de membrana de colágeno associado com as SC de medula óssea não é apropriado para a reconstrução óssea com sucesso porque essas células também necessitam de uma matriz mineral, com expressão de matriz não mineral de BMPs através de engenharia genética de células⁽⁷⁷⁾. Frise-se, contudo, que os resultados contradizem as afirmações deste estudo, uma vez que se obteve um eficiente processo de formação óssea com o uso de membrana de colágeno e hDPSC. Assim, sugere-se que a membrana de colágeno é um bom molde e apresenta vantagens em relação a HA/TCP, porque tem mais facilidade em adesão e formação óssea nos referidos defeitos cranianos. De fato, grânulos de HA são lentamente

reabsorvidos e podem ser envoltos por uma cápsula de tecido conectivo que pode afetar a migração e a velocidade de formação do novo osso no defeito, assim como a sua estabilidade como enxerto⁽¹¹⁹⁾. Não se pode excluir a possibilidade de que o sucesso do processo de formação óssea que se obteve seja relativo ao uso da membrana de colágeno utilizada⁽¹²⁰⁾. A membrana de colágeno é também tecnicamente fácil de ser introduzida nos defeitos cranianos em comparação às partículas de HA/TCP. Ainda existe, porém, a possibilidade de que a origem do tipo celular utilizado possa interferir no processo de regeneração óssea. Entretanto, as SC originárias de medula óssea e polpa dentária demonstraram uma efetiva plasticidade *in vitro*, embora ainda não existam estudos *in vivo* que comparem a efetividade entre essas duas matrizes de células no sentido de avaliar as propriedades, proliferação e diferenciação.

Este estudo também seria um indicador de que se possa utilizar ratos não imunossuprimidos para a verificação da potencialidade das SC em regenerar defeitos ósseos críticos na calota craniana sem evidência de rejeição durante o período estudado. Essa característica também foi evidenciada em outras publicações quando restou demonstrado que a atividade imunossupressiva das DPSC é significativamente elevada quando comparada às células da medula óssea⁽⁹⁷⁾. Mais recentemente, foram relatados resultados similares com diferentes populações de SC isoladas da polpa dentária⁽¹²¹⁾. Ainda utilizando DPSC, outro estudo realizou transplantes dessas células em cachorros não imunossuprimidos com distrofia muscular, concluindo que células isoladas a partir de polpa dentária humana

apresentam uma atividade imunossupressora⁽¹²²⁾. Aspecto bastante importante foi evidenciado por outro estudo, o qual comprovou que DPSC podem sobreviver mesmo em condições isquêmicas em ratos não imunossuprimidos⁽¹²¹⁾. Em conclusão, acredita-se que a rejeição das DPSC não ocorre, pois essas células apresentam todas as características básicas de MSC⁽¹²³⁾.

Essa característica de imunossupressão das DPSC também foi atribuída a tipos de fontes celulares em que foi analisado o papel das SC de tecido adiposo por via sistêmica em ratos não imunossuprimidos⁽¹²⁴⁾. Isso pode ser explicado, uma vez que as MSC não induzem a aloreatividade com células T, o que evidencia uma capacidade imunorregulatória através da supressão de células T *in vitro* e *in vivo* ^(97, 125, 126). Esses resultados, na verdade, foram importantes para implicações futuras em termos de terapia com SC alogênica e também em relação à facilidade em realizar esses experimentos em animais não imunossuprimidos, em comparação a animais imunossuprimidos.

O modelo experimental desenvolvido pareceu bastante útil no sentido de sua utilização para avaliar a eficácia das SC provenientes de outras fontes em regenerar defeitos críticos da calota craniana. Isto porque outro estudo foi conduzido com sucesso, utilizando o mesmo modelo experimental, no qual foi evidenciado o alto potencial osteogênico das células obtidas a partir de tecido muscular do lábio de paciente com fissura lábio palatal (FLP), quando associado à membrana de colágeno, em reconstruir defeitos críticos em crânios de ratos Wistar não

imunossuprimidos⁽¹²⁷⁾. O potencial osteogênico *in vivo* das SC originadas de tecido muscular do glúteo medial associadas com HA também restou evidenciado por outros autores⁽⁷²⁾. Acredita-se que o uso de SC originadas de tecido muscular do lábio de pacientes com FLP combinado com biomateriais possa ser considerado um caminho promissor na reabilitação dos pacientes com FLP, pois a maioria desses pacientes pode precisar de enxertos ósseos, o que eliminaria outras intervenções como a retirada de enxertos ósseos das costelas e íliaco, por exemplo. Reforce-se ainda, que a obtenção dessas células seria facilmente realizada, pois na maioria das cirurgias de queiloplastia existe um descarte de tecido, o que permite isolar essas células sem procedimentos cirúrgicos adicionais e representaria um método não invasivo de obter SC para uso em reconstruções ósseas.

Além da possibilidade de isolar DPSC, medula óssea e tecido muscular, pôde-se destacar a possibilidade da obtenção de SC a partir da gordura de lipoaspiração. Essa possibilidade foi comprovada em outros estudos realizados pelo mesmo grupo de trabalho quando foram isoladas SC de gordura provenientes de lipoaspiração e se induziu sua diferenciação para tecido muscular, ósseo, cartilagenoso e adiposo *in vitro*, comprovando a hipótese de que a gordura humana lipoaspirada contém células multipotentes e que representam uma alternativa de fonte de SC⁽¹²⁸⁾. Esse achado pode ser promissor no sentido da utilização de células de gordura de lipoaspiração para reconstruir deformidades faciais observadas em patologias em que se constata uma distrofia facial, como na síndrome de Parry Romberg ou na lipodistrofia relacionada ao uso de antiretrovirais nos

pacientes com vírus da imunodeficiência humana, além da possibilidade do seu uso para tratamentos estéticos, como os preenchimentos faciais, por exemplo. Alguns estudos recentes vêm demonstrando que as células vasculares estromais do tecido adiposo representam uma rica reserva de células regenerativas precursoras, com capacidade pró-angiogênica comparável às SC originadas da medula óssea^(129, 130). Em ratos, as células estromais do tecido adiposo provam ser capazes de secretar fatores angiogênicos e anti-apoptóticos⁽¹³¹⁾, em diferenciar em células endoteliais e incorporar novos vasos⁽¹³²⁾, podendo assim promover a neovascularização de tecidos isquêmicos⁽¹³³⁾. Embora essas células tenham sido estudadas extensivamente nos últimos anos, ainda são necessários mais estudos para determinar um molde ideal que possa favorecer a aderência, proliferação e diferenciação das MSC.

Pôde-se afirmar que o potencial terapêutico para o uso de SC adultas em bioengenharia dos tecidos e terapia gênica é enorme e que um modelo experimental bem definido permite analisar vários tipos de biomateriais associados a SC, o que facilitaria sua reprodutividade em seres humanos. Demonstrou-se, ainda, que a obtenção de SC a partir de polpa dentária seria totalmente reproduzível, além de apresentar inúmeras vantagens quando comparada a outros de tipos de fontes de células como, por exemplo, a medula óssea. Além da polpa dentária existiria, ainda, a possibilidade de obter linhagens de CT através de fragmentos de tecido muscular do lábio de pacientes com FLP e através de gordura de lipoaspiração, o que poderia trazer inúmeros benefícios, pois são métodos menos invasivos e que são

normalmente realizados na prática clínica. Desse modo, a disponibilidade de um bom modelo experimental poderia possibilitar a comparação de SC provenientes de diferentes regiões do organismo. Acredita-se, porém, serem necessários outros estudos, inclusive comparando o potencial dessas células originárias de várias fontes para que se possa num futuro próximo, utilizar esses protocolos em bioengenharia de tecido ósseo para pacientes portadores de FLP e outras deformidades craniofaciais.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento do modelo experimental determinado a partir da criação de dois defeitos críticos de 5 x 8 mm na calota craniana dos ratos, com remoção do perióstio e manutenção da integridade da dura-máter, foi eficaz no sentido de possibilitar o estudo da regeneração óssea.

O uso das células-tronco mesenquimais humanas obtidas a partir da polpa dentária de dentes decíduos, associado à membrana de colágeno induziu a formação óssea em defeitos críticos de calota craniana de ratos não imunossuprimidos, com formação de tecido ósseo lamelar e evidência de união entre o novo tecido ósseo e o remanescente da calvária dos ratos.

R E F E R Ê N C I A S

7 REFERÊNCIAS

1. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg*. 2001;12(6):586-93; discussion 94-5.
2. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 205:299-308.
3. Grantham EC, Landis HP. Cranioplasty and the post-traumatic syndrome. *J Neurosurg*. 1948; 5(1):19-22.
4. Vargervik K. Muscle activity and bone formation. *Prog Clin Biol Res*. 1985;187:269-79.
5. Manson PN, Crawley WA, Hoopes JE. Frontal cranioplasty: risk factors and choice of cranial vault reconstructive material. *Plast Reconstr Surg*. 1986; 77(6):888-904.

*De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

6. Kubler N, Michel C, Zoller J, Bill J, Muhling J, Reuther J. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. *J Craniomaxillofac Surg.* 1995; 23(6):337-46.
7. Keskin M, Kelly CP, Moreira-Gonzalez A, Loboeki C, Yarim M, Kaplan S, et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 122(2):400-9.
8. Brodie JC, Goldie E, Connel G, Merry J, Grant MH. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. *J Biomed Mater Res A.* 2005; 73(4):409-21.
9. Prolo DJ, Burres KP, McLaughlin WT, Christensen AH. Autogenous skull cranioplasty: fresh and preserved (frozen), with consideration of the cellular response. *Neurosurgery.* 1979; 4(1):18-29.
10. Prolo DJ, Pedrotti PW, Burres KP, Oklund S. Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. *Clin Orthop Relat Res.* 1982; 168:230-42.
11. Jackson IT, Helden G, Marx R. Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1986; 44(12):949-55.
12. Sawin PD, Traynelis VC, Menezes AH. A comparative analysis of fusion rates and donor-site morbidity for autogeneic rib and iliac crest bone grafts in posterior cervical fusions. *J Neurosurg.* 1998; 88(2):255-65.
13. Issack PS, DiCesare PE. Recent advances toward the clinical application of bone morphogenetic proteins in bone and cartilage repair. *Am J Orthop.* 2003; 32(9):429-36.

14. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74(3):487-91.
15. Urist MR, Adams T. Cartilage or bone induction by articular cartilage. Observations with radioisotope labelling techniques. *J Bone Joint Surg Br.* 1968; 50(1):198-215.
16. Fox SM, Machon RG, Burbidge HM. Allo-implant reconstruction of a femoral fracture following osteomyelitis. *N Z Vet J.* 1991; 39(3):99-104.
17. Ripamonti U. The induction of bone in osteogenic composites of bone matrix and porous hydroxyapatite replicas: an experimental study on the baboon (*Papio ursinus*). *J Oral Maxillofac Surg.* 1991; 49(8):817-30.
18. Capanna R, Manfrini M, Tigani D, Giunti A. Tricalcium phosphate and hydroxyapatite ceramics in the surgery of bone tumors: preliminary results. *Chir Organi Mov.* 1991; 76(3):245-54.
19. Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, Yukna RA. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogeneic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J Periodontol.* 1980; 51(11):625-30.
20. Sanders JJ, Sepe WW, Bowers GM, Koch RW, Williams JE, Lekas JS, et al. Clinical evaluation of freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. Part III. Composite freeze-dried bone allografts with and without autogenous bone grafts. *J Periodontol.* 1983; 54(1):1-8.

21. Reddi AH, Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescent rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1972; 69(6):1601-5.
22. Becker W, Urist MR, Tucker LM, Becker BE, Ochsenbein C. Human demineralized freeze-dried bone: inadequate induced bone formation in athymic mice. A preliminary report. *J Periodontol*. 1995; 66(9):822-8.
23. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL, Jr., de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*. 1996; 67(9):918-26.
24. Verburg AD, Klopper PJ, van den Hooff A, Marti RK, Ochsner PE. Arch The healing of biologic and synthetic bone implants. An experimental study. *Orthop Trauma Surg*. 1988; 107(5):293-300.
25. Hardin CK. Banked bone. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994; 27(5):911-25.
26. Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102(2):291-9.
27. Jinno T, Miric A, Feighan J, Kirk SK, Davy DT, Stevenson S. The effects of processing and low dose irradiation on cortical bone grafts. *Clin Orthop Relat Res*. 2000; 375:275-85.
28. Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT. Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full-thickness skull defect. *J Craniofac Surg*. 1992; 3(1):25-9.

29. Moreira-Gonzalez A, Jackson IT, Miyawaki T, Barakat K, DiNick V. Clinical outcome in cranioplasty: critical review in long-term follow-up. *J Craniofac Surg*. 2003; 14(2):144-53.
30. Kiyokawa K, Hayakawa K, Tanabe HY, Inoue Y, Tai Y, Shigemori M, et al. Cranioplasty with split lateral skull plate segments for reconstruction of skull defects. *J Craniomaxillofac Surg*. 1998; 26(6):379-85.
31. Boyde A, Corsi A, Quarto R, Cancedda R, Bianco P. Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*. 1999; 24(6):579-89.
32. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A, et al. Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int*. 1999; 64(1):83-90.
33. Piecuch JF, Topazian RG, Skoly S, Wolfe S. Experimental ridge augmentation with porous hydroxyapatite implants. *J Dent Res*. 1983; 62(2):148-54.
34. Ferreira JCR. *Avaliação Cintilográfica e histopatológica de transplantes ósseos autógenos, homogêneos frescos e homogêneos congelados do arco zigomático. Estudo experimental em coelhos (tese)*. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo;1997.
35. Melcher AH. Role of the periosteum in repair of wounds of the parietal bone of the rat. *Arch Oral Biol*. 1969; 14(9):1101-9.

36. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac J*. 1995; 32(4):311-7.
37. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988; 81(5):672-6.
38. Nyman S, Karring T, Lindhe J, Planten S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1980; 7(5):394-401.
39. Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. *J Clin Periodontol*. 1985; 12(1):51-60.
40. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986; 13(6):604-16.
41. Becker W, Becker BE. Guided tissue regeneration for implants placed into extraction sockets and for implant dehiscences: surgical techniques and case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1990;10(5):376-91.
42. Buser D, Warrer K, Karring T. Formation of a periodontal ligament around titanium implants. *J Periodontol*. 1990; 61(9):597-601.
43. Dahlin C, Andersson L, Linde A. Bone augmentation at fenestrated implants by an osteopromotive membrane technique. A controlled clinical study. *Clin Oral Implants Res*. 1991; 2(4):159-65.

44. Dahlin C, Lekholm U, Linde A. Membrane-induced bone augmentation at titanium implants. A report on ten fixtures followed from 1 to 3 years after loading. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1991;11(4):273-81.
45. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1990;24(1):13-9.
46. Dahlin C, Sennerby L, Lekholm U, Linde A, Nyman S. Generation of new bone around titanium implants using a membrane technique: an experimental study in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989; 4(1):19-25.
47. Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1980;30(1):77-82.
48. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2001; 30(1):58-62.
49. Shi S, Kirk M, Kahn AJ. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*. 1996;11(8):1139-45.
50. Farrell E, O'Brien FJ, Doyle P, Fischer J, Yannas I, Harley BA, et al. A collagen-glycosaminoglycan scaffold supports adult rat mesenchymal stem cell differentiation along osteogenic and chondrogenic routes. *Tissue Eng*. 2006;12(3):459-68.
51. DelBalso AM, Adrian JC. Collagen gel in osseous defects. A preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976;42(5):562-9.

52. Mitchell R. An evaluation of bone healing in cavities in the jaws implanted with a collagen matrix. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1992;30(3):180-2.
53. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12(11):3007-19.
54. Choi D, Lee HJ, Jee S, Jin S, Koo SK, Paik SS, et al. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body. *Stem Cells*. 2005;23(6):817-27.
55. Alhadlaq A, Elisseeff JH, Hong L, Williams CG, Caplan AI, Sharma B, et al. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle. *Ann Biomed Eng*. 2004;32(7):911-23.
56. Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002;23(20):4095-103.
57. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000;21(24):2529-43.
58. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*. 2000;49(3):328-37.
59. Saadeh PB, Khosla RK, Mehrara BJ, Steinbrech DS, McCormick SA, DeVore DP, et al. Repair of a critical size defect in the rat mandible using allogenic type I collagen. *J Craniofac Surg*. 2001;12(6):573-9.

60. Arosarena OA, Collins WL. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005;132(4):592-7.
61. Schliephake H, Tavassol F, Gelinsky M, Dard M, Sewing A, Pompe W. Use of a mineralized collagen membrane to enhance repair of calvarial defects in rats. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(1):112-8.
62. Lee YM, Seol YJ, Lim YT, Kim S, Han SB, Rhyu IC, et al. Tissue-engineered growth of bone by marrow cell transplantation using porous calcium metaphosphate matrices. *J Biomed Mater Res.* 2001;54(2):216-23.
63. Ahmad I, Hubbard JR. Pseudo realignment of maxillary anterior teeth with all-ceramic components. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998;10(7):851-5.
64. Clark RA. Imaging in Bone Marrow Transplantation. *Cancer Control.* 1999;6(1):84-9.
65. Jones NC, Trainor PA. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4(5):645-57.
66. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol.* 2005;16(5):498-502.
67. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg.* 2004;139(1):93-9.
68. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-50.

69. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-28.
70. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-95.
71. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-12.
72. Mastrogiacomo M, Derubeis AR, Cancedda R. Bone and cartilage formation by skeletal muscle derived cells. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):594-603.
73. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1198-211.
74. Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, et al. Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;407:102-18.
75. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1998 ; 355 (Suppl):S56-65.
76. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation.* 1998;66(10):1272-8.

77. Mankani MH, Kuznetsov SA, Wolfe RM, Marshall GW, Robey PG. *In vivo* bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem Cells*. 2006;24(9):2140-9.
78. Riggs BL. Overview of osteoporosis. *West J Med*. 1991;154(1):63-77.
79. Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Crooke LR. Endocrine and pharmacological suppressors of bone turnover protect against osteopenia in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1989;125(2):810-6.
80. Schmitz S, Loeffler M, Jones JB, Lange RD, Wichmann HE. Synchrony of bone marrow proliferation and maturation as the origin of cyclic haemopoiesis. *Cell Tissue Kinet*. 1990;23(5):425-42.
81. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*. 1998;9(4):310-6.
82. Winn SR, Schmitt JM, Buck D, Hu Y, Grainger D, Hollinger JO. Tissue-engineered bone biomimetic to regenerate calvarial critical-sized defects in athymic rats. *J Biomed Mater Res*. 1999;45(4):414-21.
83. Taub PJ, Yau J, Spangler M, Mason JM, Lucas PA. Bioengineering of calvaria with adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(4):1178-85.
84. Clokie CM, Moghadam H, Jackson MT, Sandor GK. Closure of critical sized defects with allogenic and alloplastic bone substitutes. *J Craniofac Surg*. 2002;13(1):111-21; discussion 22-3.
85. Blum JS, Barry MA, Mikos AG, Jansen JA. *In vivo* evaluation of gene therapy vectors in ex vivo-derived marrow stromal cells for bone regeneration

in a rat critical-size calvarial defect model. *Hum Gene Ther.* 2003;14(18):1689-701.

86. Fleckenstein KB, Cuenin MF, Peacock ME, Billman MA, Swiec GD, Buxton TB, et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. *J Periodontol.* 2006;77(1):39-45.

87. Acarturk TO, Hollinger JO. Commercially available demineralized bone matrix compositions to regenerate calvarial critical-sized bone defects. *Plast Reconstr Surg.* 2006 ;118(4):862-73.

88. Dennis JE, Caplan AI. Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implantol.* 1993;19(2):106-15; discussion 36-7.

89. Lee LT, Kwan PC, Chen YF, Wong YK. Comparison of the effectiveness of autologous fibrin glue and macroporous biphasic calcium phosphate as carriers in the osteogenesis process with or without mesenchymal stem cells. *J Chin Med Assoc.* 2008;71(2):66-73.

90. Chang SC, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, et al. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 2003;112(7):1841-50.

91. Cui L, Liu B, Liu G, Zhang W, Cen L, Sun J, et al. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials.* 2007; 28(36):5477-86.

92. Bohnenblust ME, Steigelman MB, Wang Q, Walker JA, Wang HT. An experimental design to study adipocyte stem cells for reconstruction of calvarial defects. *J Craniofac Surg.* 2009;20(2):340-6.

93. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GR. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007;13(3):619-27.
94. 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(25):13625-30.
95. Yamada Y, Fujimoto A, Ito A, Yoshimi R, Ueda M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials.* 2006;27(20):3766-81.
96. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4):105-16.
97. Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, et al. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 2005;80(6):836-42.
98. Laino G, Carinci F, Graziano A, d'Aquino R, Lanza V, De Rosa A, et al. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg.* 2006; 17(3):511-5.
99. Suzuki OT, Sertie AL, Der Kaloustian VM, Kok F, Carpenter M, Murray J, et al. Molecular analysis of collagen XVIII reveals novel mutations, presence

of a third isoform, and possible genetic heterogeneity in Knobloch syndrome. *Am J Hum Genet.* 2002; 71(6):1320-9.

100. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma.* 1989;3(3):192-5.

101. Tessier P. Autogenous bone grafts taken from the calvarium for facial and cranial applications. *Clin Plast Surg.* 1982; 9(4):531-8.

102. Jackson IT, Munro IR, Salyer KE, et al. *Atlas of Craniomaxillofacial Surgery.* St Louis: Mosby, 1982-17-36.

103 Wolfe SA. Autogenous bone grafts versus alloplastic material in maxillofacial surgery. *Clin Plast Surg.* 1982; 9(4):539-40.

104. Freeman E, Turnbull RS. The value of osseous coagulum as a graft material. *J Periodontal Res.* 1973;8(4):229-36.

105. Turnbull RS, Freeman E. Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects. *J Periodontal Res.* 1974;9(1):39-43.

106. Mulliken JB, Glowacki J. Induced osteogenesis for repair and construction in the craniofacial region. *Plast Reconstr Surg.* 1980; 65(5):553-60.

107. Glowacki J, Altobelli D, Mulliken JB. Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(1):71-6.

108. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg.* 1982 Jul;196(1):100-9.
109. Alberius P, Isaksson S, Klinge B, Sjogren S, Jonsson J. Regeneration of cranial suture and bone plate lesions in rabbits. Implications for positioning of osteotomies. *J Craniomaxillofac Surg.* 1990; 18(6):271-9.
110. Sirola K. Regeneration of defects in the calvaria. An experimental study. *Ann Med Exp Biol Fenn.* 1960;38(Suppl 2):1-87.
111. Aalami OO, Nacamuli RP, Lenton KA, Cowan CM, Fang TD, Fong KD, et al. Applications of a mouse model of calvarial healing: differences in regenerative abilities of juveniles and adults. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114(3):713-20.
112. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(3):405-10.
113. Hobar PC, Masson JA, Wilson R, Zerwekh J. The importance of the dura in craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg.* 1996; 98(2):217-25.
114. Faber H, Townw, EB. Early operation in premature cranial synostosis for the prevention of blindness and other sequelae. *J Pediatr.* 1943;22:286.
115. Hassler W, Zentner J. Radical osteoclastic craniectomy in sagittal synostosis. *Neurosurgery.* 1990; 27(4):539-43.
116. Ozerdem OR, Anlatıcı R, Bahar T, Kayaselcuk F, Barutcu O, Tuncer I, et al. Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(3):371-9; discussion 80-2.

117. Narang R, Laskin DM. Experimental osteogenesis at fracture sites and gaps. *J Oral Surg.* 1976; 34(3):225-31.
118. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, et al. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(4):1209-21.
119. Shimazaki K, Mooney V. Comparative study of porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate as bone substitute. *J Orthop Res.* 1985;3(3):301-10.
120. Goissis G, da Silva Maginador SV, da Conceicao Amaro Martins V. Biomimetic mineralization of charged collagen matrices: in vitro and in vivo study. *Artif Organs.* 2003; 27(5):437-43.
121. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, et al. Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 2008; 26(3): 638-45.
122. Kerkis I, Ambrosio CE, Kerkis A, Martins DS, Zucconi E, Fonseca SA, et al. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? *J Transl Med.* 2008;6:35.
123. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.

124. Vieira NM, Bueno CR, Jr., Brandalise V, Moraes LV, Zucconi E, Secco M, et al. SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*. 2008; 26(9):2391-8.
125. Zhao RC, Liao L, Han Q. Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy. *J Lab Clin Med*. 2004; 143(5):284-91.
126. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30(1):42-8.
127. Bueno DF, Kerkis I, Costa AM, Martins MT, Kobayashi GS, Zucconi E, 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*. 2008; 14:1-9.
128. Bueno DF. *Uso de Células Tronco Adultas para Estudo da Etiopatogenia das Fissuras Lábio Palatinas e Bioengenharia de Tecidos* (tese). São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo; 2007.
129. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-9.
130. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*. 2003;5(5):362-9.

131. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109(10):1292-8.
132. Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; 332(2):370-9.
133. Rigotti G, Marchi A, Galie M, Baroni G, Benati D, Krampera M, et al. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007; 119(5):1409-22; discussion 23-4.