UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ADRIANA LUISA GONÇALVES DE ALMEIDA

**Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no
reparo ósseo em ratas osteoporóticas**

RIBEIRÃO PRETO

2017

ADRIANA LUISA GONÇALVES DE ALMEIDA

**Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no
reparo ósseo em ratas osteoporóticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e a divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Almeida, Adriana Luisa Gonçalves de

Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no reparo ósseo em ratas osteoporóticas. Ribeirão Preto, 2017.

54 p. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Biologia Oral

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz.

1. célula-tronco mesenquimal; 2. regeneração óssea; 3. engenharia de tecido; 4. osteoporose; 5. biomaterial

FOLHA DE APROVAÇÃO

Almeida, Adriana Luisa Gonçalves de

**Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no
reparo ósseo em ratas osteoporóticas**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa: Biologia Oral

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Trabalho realizado nos Laboratórios de
Cultura de Células, de Biologia
Molecular, LAB 3D BIO, de Histologia
e no Biotério da Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

AGRADECIMENTOS

À Deus, que coloca em minha vida os mais valiosos desafios, oferecendo-me o exercício da fé e perseverança.

Ao Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por ter aceitado me orientar, pelo carinho, disponibilidade, atenção e ensinamentos. Minha admiração e respeito como aluna e funcionária. Foi uma honra.

À minha querida amiga Profa.Dra. Emanuela Prado Ferraz pela amizade, paciência, companheirismo, ajuda e encorajamento. Você faz a diferença.

Ao casal de amigos, Gileade e Helena, e ao técnico Gustavo, pela amizade e colaboração nas cirurgias experimentais.

Aos amigos, Fabíola, Tatiana, Dulce, Daniela, Roger, Ana Luíza e Allan pela amizade e incentivo nos momentos necessários.

Ao Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira pela ajuda e amizade de tantos anos.

À FORP-USP e a FMRP-USP onde estou há mais de 20 anos, trabalhando e aprendendo com todos que tive o prazer de conhecer: professores, alunos e colegas de trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, muito obrigada pela amizade e convivência agradável nesses tantos anos de trabalho.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em Biologia Oral, Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, e aos colegas de turma.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro fundamental para execução desse projeto.

À minha família, pelo apoio nos momentos decisivos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão.

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano"

Isaac Newton

"Sonhos não morrem, apenas adormecem na alma da gente"

Chico Xavier

RESUMO

Almeida, A.L.G. **Efeito de células-tronco mesenquimais associadas a biomateriais no reparo ósseo em ratas osteoporóticas.** Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2017. 54 f.

A engenharia de tecido ósseo associando células-tronco mesenquimais (CTMs) a biomateriais tem sido proposta como tratamento potencial para o reparo de defeitos ósseos, constituindo uma abordagem nova na área da medicina regenerativa e de amplo interesse para as áreas de cirurgia buco-maxilo-facial e ortopedia. A seleção das CTMs mais adequadas e o método utilizado para carregá-las nos sítios de defeitos ósseos são fatores importantes para o sucesso do tratamento. Como a osteoporose reduz a capacidade de regeneração dos ossos, seria de grande importância que a engenharia do tecido ósseo pudesse ser aplicada com sucesso nessa patologia. Assim, foi avaliado o potencial das CTMs de medula óssea (CTMs-MO) e de tecido adiposo (CTMs-TA) associadas ao arcabouço de vitrocerâmica BioS-2P ou a membrana de P(VDF-TrFE)/BT no reparo de defeitos ósseos em ratas osteoporóticas. A osteoporose foi induzida por ovariectomia e comprovada pela análise microtomográfica dos fêmures. Nas ratas osteoporóticas foram criados defeitos ósseos nas calvárias que foram tratados com implantação de BioS-2P associado à CTMs-MO e CTMs-TA ou com a implantação de membrana de P(VDF-TrFE)/BT combinada com a injeção de CTMs-MO e CTMs-TA. Ao final de 4 semanas, as análises microtomográficas e histológica mostraram que não houve formação óssea nos defeitos sem qualquer tratamento, mas nos defeitos tratados com implantação de BioS-2P ou membrana de P(VDF-TrFE)/BT houve formação óssea independente da presença de CTMs. Apenas os defeitos tratados com membrana de P(VDF-TrFE)/BT e injeção de CTMs-MO apresentaram maior formação óssea, mas não ocorreu a regeneração.

Palavras chave: célula-tronco mesenquimal; regeneração óssea; engenharia de tecido; osteoporose; biomaterial

ABSTRACT

Almeida, A.L.G..**The effect of mesenchymal stem cells associated with biomaterial on bone repair in osteoporotic rats.** Thesis (Master's Degree). Ribeirão Preto. School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2017. 54 f.

Bone tissue engineering based on the combination of mesenchymal stem cells (MSCs) and biomaterials, has been proposed as a potential treatment for the repair of bone defects, constituting a new approach in the field of regenerative medicine and of interest to the areas of oral and maxillofacial surgery and orthopedics. To select the most suitable MSCs and an efficient method to carry them to the bone defects are the key for the successful treatment. Considering that osteoporosis represents a challenge situation, it would be of the utmost importance that bone tissue engineering could be used in this pathological condition. Thus, the aim of this study was to evaluate the potential of MSCs harvested from bone marrow (MSCs-BM) and from adipose tissue (MSCs-AT) associated to a vitreous scaffold (BioS-2P) or to a membrane of P(VDF-TrFE)/BT in regenerate bone defects created in osteoporotic rats. Osteoporosis was induced by ovariectomy and confirmed by microtomography of the femurs. Defects created in calvaria of osteoporotic rats were implanted with either Bios-2P seeded with MSCs-BM and MSCs-AT or a membrane of P(VDF-TrFE)/BT combined with injection of MSCs-BM and MSCs-AT. After 4 weeks, microtomography and histological analyses showed that there was no bone formation in untreated defects but in those treated with BioS-2P or membrane of P(VDF-TrFE)/BT there was bone formation irrespective of the presence of MSCs. Only defects treated with membrane of P(VDF-TrFE)/BT and MSCs-BM injection resulted in greater bone formation but there was not full bone regeneration.

Keywords: mesenchymal stem cell; bone regeneration; tissue engineering; osteoporosis; biomaterial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Procedimento Cirúrgico para a Indução da Osteoporose	18
3.1.1. Caracterização da Osteoporose.....	19
3.1.1.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica	19
3.2. Obtenção, Isolamento e Cultura das CTMs-MO e CTMs-TA	21
3.2.1. CTMs Derivadas da Medula Óssea (CTMs-MO).....	21
3.2.2. CTMs Derivadas do Tecido Adiposo (CTMs-TA)	22
3.3. Criação dos Defeitos nas Calvárias das Ratas Osteoporóticas.....	23
3.4. Tratamentos dos Defeitos Ósseos Criados nas Calvárias das Ratas Osteoporóticas	23
3.4.1. Arcabouços de BioS-2P associados às CTMs-MO ou CTMs-TA ..	23
3.4.1.1. Obtenção dos Arcabouços de BioS-2P.....	23
3.4.1.2. Carreamento das Células nos Arcabouços de BioS-2P.....	24
3.4.1.3. Implantação dos Arcabouços de BioS-2P SC, BioS-2P MO e BioS-2P TA.....	25
3.4.2. Membranas de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA	25
3.4.2.1. Obtenção das Membranas de P(VDF-TrFE)/BT	25
3.4.2.2. Implantação das Membranas de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA	25
3.5. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos.....	26
3.5.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica	26
3.5.2. Análise Histológica.....	27
3.6. Análise Estatística.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Caracterização da Osteoporose.....	29
4.1.1 Análise Microtomográfica e Morfométrica	29
4.2. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos Sem Tratamento.....	32

4.3. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Bios-2P associados às CTMs-MO ou CTMs-TA	32
4.3.1 Análise Microtomográfica e Morfométrica	32
4.3.2 Análise Histológica	35
4.4. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Membrana de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA	36
4.4.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica	36
4.4.2. Análise Histológica	38
4.5. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Arcabouços de BioS-2P associados às CTMs-MO e CTMs-TA e da Membrana de P(VDF-TrFE)/BT combinada com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA	39
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado com capacidade de reparação após traumas e processos patológicos. No entanto, na dependência da extensão do defeito ósseo ou da presença de condições patológicas, como a osteoporose, a reconstrução e o restabelecimento das funções e da estética, tornam-se um grande desafio para as áreas de Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e Ortopedia (Doll e Koch, 2005; Kneser *et al.*, 2006; Park e Lakes, 2010).

A osteoporose é uma doença metabólica, que já afetava mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo no final do século XX e começo do século XXI (Cooper, 1999; Reginster e Burlet, 2006). Por se tratar de uma doença relacionada ao envelhecimento e considerando que o número de idosos no mundo todo tem aumentado, embora não existam levantamentos mundiais atuais, é de se supor que a população afetada seja bem maior atualmente. A osteoporose é caracterizada pelo desequilíbrio no processo de remodelação óssea que resulta na degradação da microarquitetura óssea e na redução da densidade tecidual, aumentando a fragilidade esquelética e o risco de fraturas (South-Paul, 2001). Segundo a Fundação Internacional de Osteoporose (International Osteoporosis Foundation - IOF), uma média de 8,9 milhões de fraturas ocorrem em pacientes portadores de osteoporose, o que gera um custo anual de aproximadamente 12 milhões de reais (Araújo *et al.*, 2005). O tratamento dessas fraturas requer uma abordagem coordenada para maximizar o reparo ósseo, permitindo aos pacientes a mobilização imediata (Bonnaire *et al.*, 2005) e a ausência de complicações como, por exemplo, a não união dos segmentos (pseudoartrose) (Ghondasra *et al.*, 2015). Essa abordagem envolve o tratamento clássico, seguindo os princípios de redução e fixação (preconizado e estabelecido pela *Association for Osteosynthesis/Association for the*

Study of Internal Fixation - AO/ASIF) e pode ser associado a estratégias de medicina regenerativa que visam, em última análise, substituir ou regenerar células, tecidos ou órgãos, para restaurar ou reestabelecer as funções normais (Mason e Dunnill, 2008). E, no contexto da medicina regenerativa se insere a engenharia de tecidos, que tem apresentado resultados promissores quando aplicada no reparo de defeitos ósseos (Salgado *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

A engenharia de tecido é uma ciência multidisciplinar que aplica os princípios de engenharia e das ciências da vida para o desenvolvimento de substitutos teciduais, e de interesse nesse estudo, o tecido ósseo (Langer e Vacanti, 1993; Langer e Vacanti, 1995). A engenharia de tecido ósseo baseia-se na combinação de alguns fatores: células diferenciadas ou com capacidade de diferenciação osteoblástica; fatores de crescimento de células e vasos sanguíneos; e de um arcabouço biocompatível que irá carrear as células e os fatores de crescimento no defeito ósseo a ser reparado (Rosa *et al.*, 2008; Amini *et al.*, 2012; Bose *et al.*, 2012).

Quanto ao tipo celular empregado, as células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas de diferentes tecidos, tem despertado o interesse da comunidade científica pela sua capacidade de auto-renovação, elevada taxa proliferativa e capacidade de diferenciação em células dos tecidos ósseo, cartilaginoso e adiposo (Sensebé e Bourin, 2009; Augello *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2011; Beloti *et al.*, 2012). Originalmente isoladas a partir da medula óssea (Friedenstein *et al.*, 1970), as CTMs podem ser obtidas de diferentes fontes como o sangue do cordão umbilical, o tecido epitelial, o tecido muscular e o tecido adiposo (Cicuttini *et al.*, 1994; Makhluf *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2010; Witkowska-Zimny e Walenko, 2011; Arwert *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013).

Tanto as CTMs derivadas da medula óssea (CTMs-MO) quanto às CTMs derivadas do tecido adiposo (CTMs-TA) apresentam capacidade de diferenciação em osteoblastos e adipócitos (Kern *et al.*, 2006; Peng *et al.*, 2008; Rebelatto *et al.*, 2008). Contudo, a literatura é divergente com relação à capacidade de diferenciação das CTMs na dependência da origem, da espécie e das condições de cultivo. Estudos evidenciaram maior potencial de diferenciação osteoblástica e adipocítica de CTMs-TA comparadas às CTMs-MO humanas, enquanto outros evidenciaram que as CTMs humanas de ambas as origens exibem capacidades semelhantes de diferenciação (Kern *et al.*, 2006; Rebelatto *et al.*, 2008). Por outro lado, CTMs-MO de ratos tendem a apresentar maior diferenciação osteoblástica enquanto CTMs-TA tendem a apresentar maior diferenciação adipocítica (Peng *et al.*, 2008; Abuna *et al.*, 2015). Resultados do nosso grupo de pesquisa mostraram que as CTMs-TA apresentam maior diferenciação osteoblástica quando cultivadas em meio condicionado por CTMs-MO (Abuna *et al.*, 2015). Além da capacidade de diferenciação, outras diferenças entre as CTMs residem no método de obtenção e na quantidade de células: CTMs-TA são obtidas por um processo menos invasivo e em maior quantidade quando comparado às CTMs-MO (Kern *et al.*, 2006). Assim, CTMs-MO e CTMs-TA são adequadas para investigações envolvendo a aplicação em engenharia de tecido ósseo.

Tão importante quanto a seleção das células, são os mecanismos utilizados para acondicioná-las nos defeitos ósseos. Para tanto, mais comumente são utilizados arcabouços compostos por materiais biocompatíveis, tridimensionais, porosos e com poros interconectados (Karageorgiou e Kaplan, 2005; Logeart-Avramoglou *et al.*, 2005; Bose *et al.*, 2012). Dentre os biomateriais, os vidros bioativos surgem como uma alternativa promissora por apresentarem alta

biocompatibilidade e capacidade de estimular a osteogênese *in vitro* (Hench e Paschall, 1973; Hench, 1988). No entanto, sua aplicação como arcabouço é limitada por apresentar propriedades mecânicas inadequadas (Chen *et al.*, 2006; Bairo e Vitale-Brovarone, 2011; Hum e Boccaccini, 2012). Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas dos vidros bioativos, mantendo a sua bioatividade, o grupo de pesquisa do Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade de São Carlos (LAMaV-UFSCar), desenvolveu e patenteou uma nova vitrocerâmica denominada Biosilicato® (Patente WO 97/41079; Peitl-Filho, 1997; Universidade Federal de São Carlos; 2004) a partir da adição de uma segunda fase cristalina (BioS-2P) (Patente WO 2004/074199; Siqueira e Zanotto, 2011). Resultados prévios evidenciaram que a adição da segunda fase cristalina incrementou as propriedades mecânicas e a bioatividade, além de ter melhorado algumas respostas biológicas como o aumento da produção de matriz extracelular mineralizada (Alves, 2012; Kido *et al.*, 2013; Crovace *et al.*, 2016). Estudo recente do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o BioS-2P é um material osteoindutor *in vitro* e apresenta capacidade osteocondutora *in vivo* (Ferraz, 2016).

Uma outra abordagem que pode ser empregada para carrear células e obter o reparo de defeitos ósseos é baseada nos princípios de regeneração óssea guiada (ROG) (Pontoriero *et al.*, 1987; Greenbaum e Kanat, 1993; Ronda *et al.*, 2014; Al-Kattan *et al.*, 2016; Scalize *et al.*, 2016). A ROG consiste na utilização de uma membrana (absorvível ou não-absorvível) como barreira mecânica, com a finalidade de impedir a proliferação dos tecidos epitelial e conjuntivo para o interior do defeito ósseo, permitindo que as células comprometidas com a formação óssea possam preencher e regenerar o defeito (Dahlin *et al.*, 1988; Van Leeuwen *et al.*, 2012 Jung *et al.*, 2013).

As membranas de politetrafluoretileno (PTFE) são consideradas o “padrão ouro” dentre os materiais não absorvíveis e comercialmente disponíveis (Bartee e Carr, 1995; Linde e Hedner, 1995; Van Leeuwen *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013; Ronda *et al.*, 2014). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, evidenciaram que a utilização de membranas compostas pela combinação do polímero poli(fluoreto de vinilideno-trifluoretileno) e da cerâmica titanato de bário P(VDFTrFE)/BT favorecem o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico em culturas de células derivadas de osso alveolar humano (Beloti *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011). Ainda, a utilização da membrana de P(VDF-TrFE)/BT resultou em maior formação óssea comparada à membrana de PTFE em defeitos criados em calvárias de ratos normais (Lopes *et al.*, 2014) e osteoporóticos (Scalize *et al.*, 2016). Não existem na literatura relatos dos efeitos da combinação de ROG com células e apenas recentemente mostramos que a combinação de ROG com osteoblastos pode aumentar a formação de tecido ósseo (Freitas *et al.*, 2016). No entanto, os efeitos dessa combinação na presença de osteoporose ainda não foram avaliados.

Considerando os desafios impostos para a regeneração óssea na presença de osteoporose, a avaliação do potencial osteogênico das CTMs de diferentes origens (medula óssea e de tecido adiposo) associadas às estratégias de engenharia de tecidos utilizando diferentes carreadores de células (BioS-2P ou P(VDF-TrFE)/BT) no reparo de defeitos ósseos em situações de osteoporose deveriam ser investigados.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito de CTMs no reparo ósseo de defeitos de calvária de ratas osteoporóticas. Para tanto, foram avaliadas CTMs derivadas de medula óssea (CTMs-MO) e de tecido adiposo (CTMs-TA) utilizando estratégias de engenharia de tecido ósseo. Assim, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Avaliar se o procedimento de ovariectomia bilateral é capaz de induzir osteoporose em ratas;
2. Avaliar se a associação de CTMs-MO ou CTMs-TA com arcabouços de BioS-2P resulta no reparo de defeitos ósseos de calvária de ratas osteoporóticas;
3. Avaliar se a combinação de CTMs-MO ou CTMs-TA com membrana de P(VDF-TrFE)/BT resulta no reparo de defeitos ósseos de calvária de ratas osteoporóticas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP/USP (Protocolo No. 2014.1.795.58.0).

3.1. Procedimento Cirúrgico para a Indução da Osteoporose

Foram utilizadas 41 ratas da linhagem Wistar pesando aproximadamente 150 g. A osteoporose foi induzida em 37 ratas por meio de ovariectomia bilateral (Siéssere *et al.*, 2011). As ratas foram anestesiadas com solução anestésica de Ketamina (6 mg/kg de peso corporal) (Agener União, SP, Brasil) e Xilazina (75mg/kg de peso corporal) (Calier, MG, Brasil), injetada por via intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia e antisepsia com povidina-iodo alcoólica (PVPI; Rioquímica, RJ, Brasil) nas áreas laterais e abdominal. Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais e divulsão dos tecidos para exposição e excisão dos ovários (Kalu, 1991). Ao final do procedimento, a pele foi suturada com mononylon 4.0 (Ethicon, SP, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com PVPI. Em seguida, os animais foram medicados com uma dose do anti-inflamatório Flunixinina meglumina (2,5mg/Kg) por via subcutânea (Schering-Plough, Brasil), mantido a cada 12 horas por 3 dias, e dose única de uma solução de antibióticos contendo: benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), sulfato de diidroestreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) e sulfato de estreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge, SP, Brasil). Quatro ratas foram submetidas à todos os procedimentos cirúrgicos, exceto excisão dos ovários, como controle dos efeitos do estresse cirúrgico (SHAM). Todas as ratas foram mantidas no

biotério por 150 dias, tempo suficiente para o desenvolvimento da osteoporose (Yu *et al.*, 2012). A caracterização da osteoporose foi realizada por meio de análise microtomográfica, como descrito a seguir.

3.1.1. Caracterização da Osteoporose

3.1.1.1 Análise Microtomográfica e Morfométrica

Para a caracterização da osteoporose, foram utilizados fêmures de 8 ratas, 4 do grupo OVX e 4 do grupo SHAM. Ao final de 150 dias, os animais foram eutanaziados com sobredose anestésica de solução de Ketamina (Agener) e Xilazina (Calier) via intraperitoneal. Posteriormente os fêmures foram removidos e armazenados em solução de formol tamponado à 10% (pH=7) (Merck, HE, Alemanha).

Após 48 horas, os fêmures foram submetidos ao escaneamento em microtomógrafo SkyScan 1172 de alta resolução (Bruker, Kontich, Bélgica) para obtenção das projeções tomográficas bidimensionais e reconstrução tridimensional (3D) utilizando o software NRecon (versão 1.6.10.4, Bruker, Bélgica). As reconstruções foram submetidas à análise morfométrica utilizando o software CT Analyser (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker, Bélgica) para obtenção dos seguintes parâmetros: volume ósseo (mm^3), volume ósseo/volume total (%), superfície óssea (mm^2), superfície óssea/volume ósseo (mm^{-1}); espessura trabecular (mm), número trabecular (mm^{-1}), separação trabecular (mm), densidade de superfície óssea ($1/\text{mm}$), densidade de conectividade ($1/\text{mm}^2$) e densidade mineral óssea (g.cm^{-3}). Estes parâmetros, automaticamente gerados pelo software Ctan, são preconizados pela American Society of Bone and Mineral Research (Parfitt *et al.*, 1987).

Todos os parâmetros foram calibrados automaticamente pelo sistema através do coeficiente de atenuação linear, exceto a densidade mineral óssea, que foi calibrada utilizando um par de cilindros de calibração, fornecidos pela Bruker-MicroCT, compostos de resina epóxi incorporadas por CaHA em concentrações de 0,25 e 0,75 g.cm⁻³, com diâmetros de 2 milímetros, tamanho correspondente aos fêmures de ratos, que foram escaneados nas mesmas condições das amostras, para posterior calibração desse parâmetro no software de análise.

Após a reconstrução, foi selecionada uma região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) e um volume de interesse (VOI, do inglês, *volume of interest*) na distal dos fêmures, utilizando como referência a placa de crescimento. Percorreu-se corte por corte através da placa de crescimento, no sentido metáfise-diáfise, atingiu-se o plano de visualização de uma "ponte" de cartilagem de baixa densidade que se estende de um extremo ao outro do corte. Nos planos subsequentes, evidenciou-se gradualmente a organização do osso trabecular primário, permitindo determinar a referência para a placa de crescimento.

A ROI foi determinada à partir do corte de referência da placa de crescimento, selecionada como descrito acima. O tamanho do pixel foi 10 micrômetros. A região trabecular foi definida ao longo do eixo do fêmur em relação à referência da placa de crescimento. A região trabecular começou cerca de 0,5 mm (50 cortes) a partir de cortes de imagem do nível da placa de crescimento na direção da metáfise, e estendida a partir desta posição por 2,0 mm (200 cortes) da imagem. A separação da região trabecular do osso cortical foi feita usando uma ferramenta de desenho à mão livre para delinear as

regiões de interesse. Os limites da ROI trabecular selecionado correram paralelo e perto da fronteira endocortical - mas excluindo vestígios periféricos da placa de crescimento e da camada trabecular primária. O *software* de análise Ctan interpola as formas da ROI editados (formas desenhadas à mão livre) entre os níveis automaticamente, para formar o VOI. Após a determinação do VOI, foi feita a segmentação/binarização da imagem. Análises morfométricas 2D ou 3D de imagens microtomográficas requerem a binarização (também conhecida como segmentação) do conjunto de dados como um primeiro passo: imagens de 8 ou 16 bits (escala de cinza) são transformadas em imagens de 1 bit (preto-branco).

A segmentação para o osso trabecular distal do fêmur foi definida na escala de histograma de cinza (0-255), entre 80-255. Definidos o VOI e a segmentação das imagens, em seguida executamos a análise morfométrica para os parâmetros descritos acima, procedimento repetido para todas as amostras de fêmures.

3.2. Obtenção, Isolamento e Cultura das CTMs-MO e CTMs-TA

Ratos machos da linhagem Wistar, pesando aproximadamente 150 g, foram mortos com sobredose anestésica de solução de Ketamina (Agener) e Xilazina (Calier) via intraperitoneal. Em seguida, os fêmures e o tecido adiposo da região inguinal foram removidos para a obtenção das CTMs como descrito a seguir.

3.2.1. CTMs Derivadas da Medula Óssea (CTMs-MO)

Os fêmures foram removidos e transportados para fluxo laminar em meio de transporte composto por α -MEM (Gibco-Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco) e 3 μ g/mL de fungisone

(Gibco). As epífises dos fêmures foram removidas e as células da medula óssea foram coletadas por lavagem do canal medular das diáfises com 10 mL de meio de expansão (ME) constituído por α -MEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco), 100 UI/mL de penicilina-estreptomicina (Gibco) e 0,3 μ g/mL de fungisona (Gibco). Essas células foram mantidas em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated, NY, EUA) contendo 20 mL de ME. Ao final de 72 h, os frascos contendo as células derivadas da medula óssea foram lavados com PBS (Gibco) para remoção de células não aderidas e seleção das CTMs, que permaneceram aderidas ao poliestireno. Os meios foram completamente trocados a cada 72 horas e, durante todo o tempo de cultivo, as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.2.2. CTMs Derivadas do Tecido Adiposo (CTMs-TA)

O tecido adiposo foi removido e transportado para fluxo laminar em meio de transporte. Posteriormente, esse tecido foi seccionado em fragmentos menores e submetidos à digestão enzimática em solução de PBS e collagenase II a 0,075% (Gibco) a 37°C, sob agitação constante por 40 minutos (Huang *et al.*, 2002). Em seguida, a collagenase foi inativada pela adição de 20 mL de ME e a solução foi centrifugada a 1300 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 20 mL de ME em frascos de poliestireno de 75 cm² (Corning Incorporated). Ao final de 72 h, os frascos contendo as células foram lavados com PBS (Gibco) para remoção de células não aderidas e seleção das CTM, que permaneceram aderidas ao poliestireno. Os meios foram completamente trocados a cada 72 horas e, durante todo o

tempo de cultura, as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.3. Criação dos Defeitos nas Calvárias das Ratas Osteoporóticas

As ratas osteoporóticas e SHAM foram submetidas à cirurgia para preparação de defeitos ósseos em calvária. A anestesia foi realizada como descrito no item 3.1. Após tricotomia e antissepsia com PVPI na região dorsal da cabeça, a pele e o tecido subcutâneo foram incisados ao longo da sutura sagital para expor os ossos parietais. O periósteo dos ossos parietais foi descolado e o defeito, produzido unilateralmente utilizando uma broca trefina com 5 mm de diâmetro (Neodente, PR, Brasil) sob irrigação abundante com soro fisiológico. A opção pelo defeito unilateral e não bilateral tem como objetivos minimizar o trauma na calvária e evitar a possível interferência de um determinado tratamento no defeito contralateral (Gomes e Fernandes, 2011). Os tratamentos dos defeitos ósseos são descritos abaixo, mas ao final todos foram suturados com mononylon 3.0 (Ethicon) e lavados com PVPI. A administração de medicação pós-operatória foi feita como descrito no item 3.1.

3.4. Tratamentos dos Defeitos Ósseos Criados nas Calvárias das Ratas Osteoporóticas

3.4.1 Arcabouços de BioS-2P associados às CTMs-MO ou CTMs-TA

3.4.1.1. Obtenção dos Arcabouços de BioS-2P

Os arcabouços de BioS-2P foram confeccionados no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão dos Profs. Dr. Edgar Dutra Zanotto e Dr. Oscar Peitl Filho, como descrito por Kido *et al.*, (2013). Os arcabouços medindo 5 mm de diâmetro e 2 mm de altura

foram acondicionados em placas de vidro e submetidos à esterilização em estufa a 180 °C por 2 h.

3.4.1.2. Carreamento das Células nos Arcabouços de BioS-2P

CTMs-MO e CTMs-TA, obtidas como descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2, cultivadas por 7 dias foram enzimaticamente liberadas pela adição de 9,5 mL de solução de tripsina a 0,25% (Gibco), 500 µL de colagenase tipo II 4000 U (Gibco) e 500 µL de EDTA a 1 mM (Gibco) para obtenção de suspensão de células. Em seguida, foi adicionado igual volume de ME para neutralizar a ação enzimática e a solução foi centrifugada a 2000 rpm por 10 min. As células foram contadas no hemocítômetro (Fisher Scientific, XX, EUA) e ajustado o volume de 200 µL para o plaqueamento na densidade de 2×10^5 células/arcabouço sobre arcabouços previamente dispostos em placas de poliestireno de 48 poços (Corning Incorporated). A combinação de CTMs e arcabouços foi incubada por 18 h para permitir a adesão e incorporação celular, a 37 °C e em atmosfera umidificada contendo 5% de gás carbônico (CO₂) e 95% de ar atmosférico. Após esse período, os arcabouços de BioS-2P carreando CTMs-MO (BioS-2P MO) ou CTMs-TA (BioS-2P TA) foram imediatamente implantados nos defeitos criados nas calvárias das ratas, como descrito a seguir. Esse método permite o carreamento de 80% das células plaqueadas, que permanecem nos defeitos por aproximadamente 14 dias (Ferraz, 2016). Os arcabouços sem células (BioS-2P SC) foram mantidos na mesma condição de incubação.

3.4.1.3. Implantação dos Arcabouços de BioS-2P SC, BioS-2P MO e BioS-2P TA

Imediatamente após a criação dos defeitos ósseos nas calvárias das ratas osteoporóticas, foram implantados os arcabouços carreando as células (BioS-2P MO ou BioS-2P TA) ou sem células (BioS-2P SC). Ao final de 4 semanas, período adequado para a avaliação da regeneração do tecido ósseo nesse modelo experimental (Sicchieri *et al.*, 2012), os animais foram eutanaziados com sobredose anestésica de solução de Ketamina (Agener) e Xilazina (Calier) por via intraperitoneal, e as calvárias contendo os defeitos foram removidas, reduzidas e armazenadas em solução de formol 10% tamponado (pH=7) (Merck) por até 48 h. Posteriormente as peças foram processadas para as análises microtomográfica, morfométrica e histológica.

3.4.2. Membranas de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA

3.4.2.1. Obtenção das Membranas de P(VDF-TrFE)/BT

As membranas de P(VDF-TrFE)/BT foram preparadas no Departamento de Física e Química da Universidade Federal de Itajubá - MG (DFQ-UNIFEI) sob supervisão Prof. Dr. Rossano Gimenes, como descrito previamente (Gimenes *et al.*, 2004). As membranas foram cortadas na forma de discos com 6 mm de diâmetro e esterilizadas em autoclave a 134 °C previamente aos experimentos.

3.4.2.2. Implantação das Membranas de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA

Imediatamente após a criação dos defeitos ósseos nas calvárias das ratas osteoporóticas, esses receberam o implante subcranial da membrana de

P(VDF-TrFE)/BT. Após 2 semanas, os defeitos foram injetados com CTMs-MO (MEMB MO) ou CTMs-TA (MEMB TA) na concentração de 5×10^6 células em 50 μL de PBS. O mesmo volume de PBS foi injetado no grupo sem células (MEMB SC). Após 4 semanas da injeção, as calvárias contendo os defeitos foram removidas e processadas como descrito no item 3.4.1.3. para as análises microtomográfica, morfométrica e histológica.

3.5. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos

3.5.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica

Após 48 horas de fixação, todas as calvárias foram submetidas ao escaneamento em microtomógrafo SkyScan 1172 de alta resolução (Bruker) como descrito no item 3.1.1., para obtenção dos seguintes parâmetros: volume ósseo (mm^3), volume ósseo/volume total (%), superfície óssea (mm^2), espessura trabecular (mm), número trabecular (mm^{-1}), separação trabecular (mm).

Os amostras foram reconstruídas utilizando o software NRecon e foram posicionadas no seu longo eixo utilizando o software DataViewer, onde é possível a movimentação e visualização dos três eixos (coronal, axial e sagital). Foi selecionado o eixo de interesse (sagital) para visualização completa do defeito nas calvárias.

O número de cortes selecionados para os diferentes tratamentos foi estabelecido de modo a abranger o volume da região a ser avaliada. Para os defeitos tratados com BioS-2P selecionamos o VOI de 1,5x5x5 mm. Para os defeitos tratados com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT selecionamos o VOI de 0,6x5x5 mm correspondente a parte superior da membrana, ou seja, apenas o volume de formação óssea induzido pela injeção de células.

Após a determinação do VOI, foi feita a segmentação/binarização da imagem. A segmentação para o osso dentro do defeito foi definida na escala de histograma de cinza (0-255), entre 60-110, a fim de eliminar o biomaterial da segmentação. Definidos o VOI e a segmentação das imagens, em seguida executamos a análise morfométrica para os parâmetros descritos acima, procedimento repetido para todas as amostras, com exceção dos defeitos ósseos vazios, onde praticamente não houve formação óssea.

3.5.2. Análise Histológica

Após a análise microtomográfica, os espécimes foram preparados para a obtenção de cortes histológicos não-descalcificados (Sverzut *et al.*, 2012). Optamos por esta metodologia porque tanto o BioS-2P como a membrana de P(VDF-TrFE)/BT danificam a lâmina de micrótomos convencionais utilizados para cortes histológicos descalcificados e, conseqüentemente, não se obtém material histológico de boa qualidade. As amostras foram desidratadas em série crescente de álcoois e incluídas em resina acrílica (LR White hard grade, Londres, Reino Unido). Os blocos foram seccionados utilizando um micrótomo de precisão (Exakt, HA, Alemanha), lixados e polidos em sistema de polimento (Exakt). De cada espécime foram obtidas duas lâminas para coloração e observação em microscopia de luz. Para isso, a face polida foi colada a uma lâmina de vidro e o bloco novamente cortado, deixando aderido à lâmina um corte com espessura aproximada de 40 μm , que foi desgastado e polido até apresentar aproximadamente 20 μm de espessura. Esta face foi submetida à coloração utilizando os corantes azul de Stevenel e vermelho de Alizarina, conforme descrito por Maniatopoulos *et al.* (1986). Em seguida as lâminas foram avaliadas por meio de microscopia de luz utilizando um microscópio

modelo DMLB Leica, e as imagens capturadas por meio de uma câmera de alta resolução modelo DFC 310 FX Leica.

3.6. Análise Estatística

Os dados obtidos na análise morfométrica da caracterização da osteoporose foram comparados utilizando o Teste-t. Os dados da análise morfométrica do tecido ósseo formado nos tratamentos com BioS-2P e P(VDF-TrFE)/BT foram comparados separadamente por análise de variância (ANOVA One-Way), seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls, quando aplicado. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da Osteoporose

4.1.1 Análise Microtomográfica e Morfométrica

Por meio da análise das imagens microtomográficas, é possível observar diferenças qualitativas na estrutura óssea nos fêmures SHAM em relação ao OVX (Figura 1). Enquanto nos fêmures SHAM, o osso se apresenta aparentemente mais estreito, com cortical inalterada e maior densidade de trabéculas (Figura 1A), no OVX o osso exibe dimensões maiores e contorno externo alterado, com cortical mais espessa e redução drástica de densidade trabecular (Figura 1B).

Figura 1. Reconstruções tridimensionais obtidas dos fêmures das ratas SHAM (A) e OVX (B).

O volume ósseo (Figura 2A), o volume ósseo/volume total (Figura 2B), a superfície óssea (Figura 2C), o número trabecular (Figura 2F), a densidade de superfície óssea (Figura 2H), a densidade de conectividade (Figura 2I) e a densidade mineral óssea (Figura 2J) foram menores nos fêmures dos animais OVX comparados ao SHAM (Teste-t, $p=0,001$ para todos os parâmetros). A separação trabecular (Figura 2G) foi maior nos fêmures OVX comparado ao SHAM (Teste-t, $p=0,001$). A superfície óssea/volume ósseo (Figura 2D) e a espessura trabecular (Figura 2E), não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os fêmures SHAM e OVX (Teste-t, $p=0,90$ e $p=0,20$, respectivamente).

Figura 2. Parâmetros morfométricos obtidos após reconstrução dos fêmures das ratas SHAM e OVX por microtomografia computadorizada. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes. Os dados estão representados como média ± desvio padrão (n=4).

4.2. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos Sem Tratamento

As reconstruções microtomográficas dos defeitos ósseos sem tratamento de ratas SHAM e osteoporóticas estão representados abaixo (Figura 3 A e B). Observamos que nas ratas SHAM houve pouca formação óssea limitada à periferia dos defeitos, enquanto nas osteoporóticas praticamente não houve formação óssea. Por isso, os defeitos não tratados não foram incluídos na análise estatística.

Figura 3. Reconstruções tridimensionais de defeitos ósseos sem tratamento criados em calvárias de ratas SHAM (A) e osteoporóticas (B).

4.3. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Bios-2P associados às CTMs-MO ou CTMs-TA

4.3.1 Análise Microtomográfica e Morfométrica.

As reconstruções microtomográficas evidenciaram a presença de tecido ósseo formado na periferia e no interior dos defeitos preenchidos com arcabouços de BioS-2P SC (Figura 4 A, B e C), BioS-2P MO (Figura 4 D, E e F) e BioS-2P TA (Figura 4 G, H e I). Os arcabouços de BioS-2P apresentam sinais de degradação, mais evidentes nos grupos onde eles foram implantados associados às células, independentemente do tipo celular (Comparar Figura 4

A com 4 D e 4 G). Nos defeitos ósseos preenchidos pelo BioS-2P MO observa-se osso formado na borda do defeito e pequenas áreas de formação óssea no centro do defeito. Nos defeitos preenchidos pelo BioS-2P TA, a formação óssea é observada em áreas no interior do defeito e em contato com o biomaterial.

Figura 4. Reconstruções tridimensionais (A, D e G) e cortes tomográficos axiais (B, E e H) e sagitais (C, F e I) de defeitos ósseos criados em calvárias de ratas osteoporóticas (OVX), implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas sem células (BioS-2P SC) (A, B, C), associado às célula-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BioS-2P MO) (D, E, F) e associado às célula-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (BioS-2P TA) (G, H, I), por 4 semanas. Barra de escala : 1mm.

As análises morfométricas do tecido ósseo formado nos defeitos implantados com BioS-2P SC, BioS-2P MO e BioS-2P TA indicaram diferenças estatisticamente significantes nos seguintes parâmetros avaliados: volume ósseo, espessura trabecular e separação trabecular (ANOVA; $p=0,05$; $p=0,001$; $p=0,02$ respectivamente). O pós teste indicou que o volume do tecido ósseo formado nos defeitos preenchidos com BioS-2P SC foi maior que o BioS-2P MO (SNK, $p=0,04$) (Figura 5 A). A espessura trabecular apresentou diferença

estatisticamente significativa na dependência do tratamento, como segue: BioS-2P SC > BioS-2P TA > BioS-2P MO (SNK, $p=0,001$; $p=0,01$, $p=0,04$) (Figura 5 D). Nos parâmetros volume ósseo/volume total (Figura 5 B), superfície óssea (Figura 5 C) e número trabecular (Figura 5 E) e separação trabecular não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos (ANOVA; $p=0,10$; $p=0,50$; $p=0,40$ e $p=0,11$; respectivamente).

Figura 5. Parâmetros morfométricos obtidos após a reconstrução microtomográfica do tecido ósseo formado nos defeitos ósseos criados nas calvárias de ratos osteoporóticos e implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas sem células (BioS-2P SC), associado às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BioS-2P MO) e associado às células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (BioS-2P TA). Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=5$).

4.3.2. Análise Histológica

No grupo tratado com BioS-2P SC, observam-se formações alongadas de tecido ósseo por vezes em íntimo contato com a estrutura do arcabouço (Figura 6. A e B). No entanto, majoritariamente, essas estruturas estavam recobertas por um material corado pelo vermelho de alizarina e parcialmente degradadas. Células multinucleadas são observadas aderidas à superfície dos arcabouços (Figura 6 C). As demais áreas são preenchidas por tecido conjuntivo de alta celularidade, com focos inflamatórios residuais (Figura 6 B). Nos grupos BioS-2P MO e BioS-2P TA, as áreas de formação óssea são reduzidas e mais evidentes na periferia dos arcabouços (Figura 6 D, E, G e H). Já em sua área central, predomina tecido conjuntivo de alta celularidade, com células gigantes multinucleadas, adjacentes à estrutura do arcabouço, que apresenta sua superfície com contornos irregulares e corada por vermelho de alizarina (Figura 6 F e I). Áreas de infiltrado inflamatório crônico são observadas focalmente.

Figura 6. Fotomicrografias de defeitos ósseos criados em calvárias de ratas osteoporóticas e implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas sem células (BioS-2P SC) (A, B, C); associado às célula-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BioS-2P MO) (C, D, E) e associado às célula-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (BioS-2P TA) (E, F, G). Coloração de vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Asteriscos (*) indicam tecido ósseo formado. As cabeças de setas indicam células gigantes. Barra de escala: 800 µm= A, D e G; 200 µm= B, E e H; 100 µm= C, F e I.

4.4. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Membrana de P(VDF-TrFE)/BT combinadas com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA

4.4.1. Análise Microtomográfica e Morfométrica

As reconstruções microtomográficas e cortes tomográficos evidenciaram a presença de tecido ósseo formado na periferia e no interior dos defeitos implantados com membrana de P(VDF-TrFE)/BT sem células (MEMB SC) (Figura 7 A, B e C), MEMB MO (Figura 7 D, E, F) e MEMB TA (Figura 7 G, H, I). O tecido ósseo formado é mais evidente no grupo MEMB MO em relação aos grupos MEMB SC e MEMB TA (comparar Figuras 7 D, E e F com A, B, C e G, H, I).

Figura 7. Reconstruções tridimensionais dos defeitos ósseos criados nas calvárias de ratas osteoporóticas, preenchidos com membrana de P(VDF-TrFE)/BT sem células (MEMB SC) (A, B, C), membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MEMB MO) (D, E, F) e membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MEMB TA) (G, H, I). Barra de escala : 1mm.

As análises morfométricas do tecido ósseo formado nos defeitos implantados com MEMB SC, MEMB MO e MEMB TA indicaram diferenças estatisticamente significantes nos seguintes parâmetros avaliados: volume ósseo e volume ósseo/volume total (ANOVA; $p=0,04$; $p=0,03$, respectivamente). O pós-teste indicou que o volume ósseo foi maior nos defeitos preenchidos com MEMB MO quando comparado com MEMB TA (SNK, $p=0,04$) (Figura 8 A), e o volume ósseo/volume total foi maior nos defeitos preenchidos com MEMB MO, quando comparado com defeitos preenchidos com MEMB TA ou MEMB SC (SNK, $p=0,05$, ambos). Nos parâmetros superfície óssea (Figura 8 C), espessura trabecular (Figura 8 D), número trabecular (Figura 8 E) e a separação trabecular (Figura 8 F) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (ANOVA; $p=0,12$; $p=0,10$; $p=0,19$, respectivamente).

Figura 8. Parâmetros morfométricos obtidos após a reconstrução microtomográfica dos defeitos ósseos criados nas calvárias de ratas osteoporóticas e preenchidos com membrana de P(VDF-TrFE)/BT sem células (MEMB SC), membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MEMB MO) e membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MEMB TA). Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significantes. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão ($n=6$).

4.4.2. Análise Histológica.

Os cortes histológicos confirmaram os resultados da morfometria por microtomografia. Houve maior formação óssea no grupo MEMB MO (Figura 9 C e D), e preenchimento de tecido conjuntivo sem sinais inflamatórios tanto no grupo MEMB TA (Figura 9 E e F) quanto no grupo MEMB SC (Figura 9 A e B).

Figura 9. Fotomicrografias de defeitos ósseos criados em calvárias de ratas osteoporóticas e preenchidos com membrana de P(VDF-TrFE)/BT sem células (MEMB SC) (A,B), membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MEMB MO) (C,D), e membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MEMB TA) (E,F). A cabeça de seta indica a linha cimentante entre o osso maduro e o osso novo (F). Asteriscos (*) indicam tecido ósseo formado (B, D, F). Coloração de vermelho de alizarina e azul de Stevenel. Barra de escala: 800 μ m = A, C e E; 200 μ m =B, D e F.

4.5. Avaliação do Reparo dos Defeitos Ósseos tratados com Arcabouços de BioS-2P associados às CTMs-MO e CTMs-TA e da Membrana de P(VDF-TrFE)/BT combinada com Injeção de CTMs-MO ou CTMs-TA

Devido às diferenças na obtenção dos parâmetros morfométricos, a combinação entre as duas estratégias, arcabouço ou membrana, somente é possível para o parâmetro volume ósseo/volume total porque os dados são normalizados pelo volume total considerado. Tal comparação mostra que apenas a combinação de membrana de P(VDF-TrFE)/BT e Injeção de CTMs-MO resultou em maior formação óssea (ANOVA; $p=0,02$) do que todos os outros grupos (Fig. 10).

Figura 10. Parâmetro morfométrico obtido após a reconstrução microtomográfica do tecido ósseo formado nos defeitos ósseos criados nas calvárias de ratas osteoporóticas e implantados com arcabouços de Biosilicato® com duas fases cristalinas sem células (BioS-2P SC), associado às célula-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (BioS-2P MO), associado às célula-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (BioS-2P TA); membrana de P(VDF-TrFE)/BT sem células (MEMB SC), membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MEMB MO) e membrana e injeção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (MEMB TA). O asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa. Os dados estão representados como média $\pm$ desvio padrão. Grupo BioS-2P SC, BioS-2P MO, BioS-2P TA (n=5); grupo MEMB SC, MEMB MO e MEMB TA (n=6).

5. DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito de CTMs-MO e CTMs-TA no reparo ósseo de defeitos de calvária de ratas osteoporóticas utilizando estratégias de engenharia de tecido. Para tanto, as CTMs foram incorporadas à arcabouços de BioS-2P ou injetadas sobre membranas de P(VDF-TrFE)/BT e a formação óssea avaliada por meio de microtomografia computadorizada e análise histológica. Os resultados obtidos mostraram que ocorreu formação óssea em todos os grupos avaliados, no entanto, a associação de CTMs com BioS-2P não resultaram em maior formação óssea do que o emprego do BioS-2P sem células, enquanto a combinação da membrana de P(VDF-TrFE)/BT com injeção de CTMs-MO aumentou a formação de tecido ósseo. Apesar de haver formação de osso, nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de produzir a completa regeneração dos defeitos.

Selecionamos o modelo experimental utilizando ratas ovariectomizadas, no qual a deficiência de estrógeno irá induzir a osteoporose, com consequente perda da massa óssea e suas sequelas, semelhante às encontradas em mulheres pós-menopausa (Kalu, 1991; Thompson *et al.*, 1995). A indução da osteoporose por ovariectomia em ratas é reconhecido como um dos modelos mais adequados por afetar vários ossos (Lelovas *et al.*, 2008). Limitamos nossa investigação à microarquitetura óssea trabecular do fêmur por ser uma região particularmente sensível aos efeitos da ovariectomia (Turner, 2001), reconhecida como componente chave da qualidade (Dempster, 2000), e força (resistência) óssea (Muller, 2002), comparáveis a osteoporose em humanos (Thompson, 1995; Francisco *et al.* 2011) e detectável por microtomografia computadorizada (Francisco *et al.* , 2011).

Os resultados evidenciaram a baixa qualidade óssea dos fêmures das ratas OVX em relação às SHAM. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos parâmetros superfície óssea/volume ósseo e espessura trabecular, pode estar associada ao espessamento das trabéculas na tentativa de compensar a diminuição de resistência óssea produzida pela reabsorção trabecular das ratas osteopóroticas (Marcu *et al.*, 2011). Os dados da literatura, combinados com os nossos achados microtomográficos, confirmam o padrão osteoporótico do modelo experimental selecionado e corroboram os resultados obtidos por outros grupos de pesquisa (Lelovas *et al.*, 2008; Siéssere *et al.*, 2011; Kosugi *et al.*, 2013, Scalize *et al.*, 2015). Adicionalmente, as reconstruções microtomográficas dos defeitos ósseos sem tratamento das calvárias de ratas osteoporóticas comparadas com as SHAM evidenciam a redução na capacidade de formação óssea resultante da osteoporose.

Para ambas as estratégias utilizadas nesse estudo, os biomateriais foram combinados com CTMs-MO ou CTMs-TA. Em estudos anteriores nos quais foram empregados os mesmos métodos de cultivo, essas células já foram caracterizadas como CTMs por aderirem ao plástico de cultura, apresentarem perfil semelhante de expressão de marcadores de superfície com predominância de células expressando CD29 e CD90 e baixa expressão de CD31, CD34, CD45 e CD106 (Ferraz, 2016), bem como potencial de diferenciação osteoblástica e adipocítica (Abuna *et al.*, 2016).

Como uma das estratégias de engenharia de tecidos, utilizou-se a combinação de um arcabouço poroso carregado com células. Elegemos o BioS-2P como arcabouço devido às suas propriedades osteoindutora *in vitro* e

osteocondutora *in vivo* (Ferraz, 2016), associado ou não às CTMs-MO e CTMs-TA, para avaliarmos o reparo ósseo em ratas osteoporóticas. Além disso, é conhecido que as células carregadas aos arcabouços de BioS-2P permanecem nos defeitos ósseos por mais de 7 dias (Ferraz, 2016).

Houve formação de tecido ósseo em todos os defeitos tratados com BioS-2P independentemente do uso de células comparados à defeitos não-tratados. Dos seis parâmetros utilizados, em dois deles (volume ósseo e espessura trabecular) parece que a associação às células resultou em menor formação óssea, sugerindo que tanto CTMs-MO como CTMs-TA têm impacto negativo na osteocondução induzida por BioS-2P. Em parte, esses resultados estão em concordância com aqueles obtidos sob as mesmas condições experimentais em ratos normais (Ferraz, 2016) e corroboram as observações de que o uso de células não aumenta o potencial osteocondutor do BioS-2P.

Por outro lado, foram observadas diferenças relevantes que podem ser atribuídas à presença da osteoporose. A formação óssea nas ratas osteoporóticas foi drasticamente reduzida, sendo que para alguns parâmetros ela foi 50% daquela observada em ratos normais (Ferraz, 2016). Além disso, nas ratas osteoporóticas observou-se uma reação inflamatória crônica intensa, e a presença de células gigantes multinucleadas em contato com o BioS-2P independente da presença de células. Considerando que em ratos normais esse arcabouço não causa esse tipo de reação (Kido *et al.*, 2015; Ferraz, 2016), tal resposta pode ser atribuído à inflamação associada à osteoporose (Zhang *et al.*, 2015). Em favor dessa hipótese, já foi demonstrado que citocinas e mediadores inflamatórios foram identificados em grandes quantidades em mulheres osteoporóticas (Pacifci *et al.*, 1991; Pino *et al.*, 2010).

Estudos prévios utilizando a membrana de P(VDF-TrFE)/BT já haviam mostrado a capacidade dessa membrana em estimular a formação óssea nos defeitos de calvárias de ratos normais (Lopes *et al.*, 2014) e ratas osteoporóticas (Scalizi *et al.*, 2016). A estratégia de combinar essa membrana com injeção de CTMs também resultou na formação de tecido ósseo e, dos seis parâmetros utilizados, em dois deles (volume ósseo e volume ósseo/volume total) parece que a combinação com CTMs-MO aumentou essa formação. Ao utilizar estratégia similar em ratos normais já havíamos demonstrado que as células permanecem nos defeitos por mais de 7 dias e que a injeção de osteoblastos diferenciados de CTMs-MO também é capaz de aumentar a formação de tecido ósseo (Freitas *et al.*, 2016).

Também para a utilização da membrana de P(VDF-TrFE)/BT foi observado efeito marcante na redução da formação óssea que pode ser atribuída à presença da osteoporose. Alguns parâmetros morfométricos, como volume ósseo e superfície óssea foram reduzidos em 50% nas ratas osteoporóticas comparadas aos ratos normais (Lopes *et al.*, 2014). No entanto, diferentemente do ocorrido com o uso do BioS-2P, não foi observada qualquer resposta inflamatória, mas também raramente observou-se contato direto do tecido ósseo com a membrana. Não é possível determinar se e em que extensão isso possa ter afetado a formação óssea nos defeitos tratados com a membrana de P(VDF-TrFE)/BT, mas é conhecido que ela pode inibir a osteoclastogênese (Lopes *et al.* 2016).

Como demonstrado acima, ambas estratégias permitiram a formação de tecido ósseo, mas devido às diferenças para a obtenção dos parâmetros morfométricos a comparação entre ambas somente é possível para o volume

ósseo formado normalizado pelo volume total analisado (volume ósseo/volume total). Tal comparação mostra que o volume de osso formado é praticamente o mesmo em todos os grupos, com exceção da combinação da membrana de P(VDF-TrFE)/BT com injeção de CTMs-MO que resultou na formação do maior volume ósseo e, talvez, se constitua na estratégia mais adequada. No entanto, há que se ressaltar que, a osteoporose é realmente uma condição que causa prejuízo à formação óssea e que nenhum dos tratamentos resultou na regeneração dos defeitos ósseos.

6. CONCLUSÕES

- 1- O procedimento de ovariectomia bilateral induziu a osteoporose em ratas após 150 dias.
- 2- O BioS-2P induziu a formação óssea e a associação com CTMs-MO e CTMs-TA não resultou em aumento da quantidade de tecido ósseo.
- 3- A membrana de P(VDF-TrFE)/BT induziu a formação óssea e somente sua combinação com injeção de CTMs-MO foi capaz de aumentar o volume ósseo formado.
- 4- Nenhuma das estratégias utilizadas resultou na regeneração dos defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abuna RPF, Oliveira FS, Santos TS, Guerra TR, Rosa AL, Beloti MM. Participation of TNF- α in inhibitory effects of adipocytes on osteoblast differentiation. *J Cell Physiology*. 2015. doi:10.1002/jcp.25073.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012; 40(5):363-408.

Al-Kattan R, Retzepi M, Calciolari E, Donos N. Microarray gene expression during early healing of GBR-treated calvarial critical size defects. *Clin Oral Implants Res*. 2016. doi:10.1111/clr.12949.

Alves, OC. Análise da diferenciação osteoblástica in vitro sobre superfícies de materiais vítreos e vitrocerâmicos bioativos. Mestrado. Ribeirão Preto, 2012.

Araújo DV, Oliveira JH, Bracco OL. Cost of osteoporotic hip fracture in the Brazilian private health care system. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49:897-901.

Arwert EN, Hoste E, Watt FM. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:170-180.

Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*. 2010;20:121-133.

Baino F, Vitale-Brovarone C. Three-dimensional glass-derived scaffolds for bone tissue engineering: Current trends and forecasts for the future. *J Biomed Mater Res A*. 2011;97:514-535.

Bartee BK, Carr JA. Evaluation of a high-density polytetrafluoroethylene (n-PTFE) membrane as a barrier material to facilitate guided bone regeneration in the rat mandible. *J Oral Implantol*. 1995;21(2):88-95.

Beloti MM, de Oliveira PT, Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini MJ, Rosa AL. In vitro biocompatibility of a novel membrane of the composite poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate. *J Biomed Mater Res A*. 2006;79(2):282-8.

Beloti MM, Sicchieri LG, de Oliveira PT, Rosa AL. The influence of osteoblast differentiation stage on bone formation in autogenously implanted cell-based poly(lactide-co-glycolide) and calcium phosphate constructs. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:999-1005.

Bonnaire F, Zenker H, Lill C, et al. Treatment strategies for proximal femur fractures in osteoporotic patients. *Osteoporos Int*. 2005 Mar;16(2):S93–S102.

Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30:546-554.

Chen QZ, Thompson ID, Boccaccini AR. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006;27:2414-2425.

Cicuttini FM, Welch K, Boyd AW. Characterization of CD34+HLA-DR-CD38+ and CD34+HLA-DR-CD38- progenitor cells from human umbilical cord blood. *Growth Factors*. 1994;10:127-134.

Cooper C. Epidemiology of osteoporosis. *Osteoporos. Int.*, 9 (Suppl 2) (1999), pp. S2–S8.

Crovace MC, Sousa MT, Chinaglia CR, Peitl O, Zanutto ED. Biosilicate® - a multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *J Non-Crystal Solids*. 2016;432:90-110.

Dahlin C, Simion M, Nanmark U, Sennerby L. Histological morphology of the e-PTFE/tissue interface in humans subjected to guided bone regeneration in conjunction with oral implant treatment. *Clin Oral Implants Res*. 1998 Apr;9(2):100-6.

Dempster D. The contribution to trabecular architecture to cancellous bone quality. *J Bone Miner Res*. 2000;15:20–23.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2011;20:5-14.

Doll BA, Koch H. Bone physiology dynamics In: Hollinger JO, Einhorn TA, Doll BA, Sfeir C, editors. Bone Tissue Engineering. Florida: CRC Press LLC; 2005. p27.

Ferraz, EP. Engenharia de tecidos: Efeito da associação de células e o Biosilicato® com duas fases cristalinas (BioS-2P) no reparo de defeitos ósseos. Doutorado. Ribeirão Preto, 2016.

Francisco JI, Yu Y, Oliver RA, Walsh WR. Relationship between age, skeletal site, and time post-ovariectomy on bone mineral and trabecular microarchitecture in rats. J Orthop Res. 2011 Feb;29(2):189-96. doi: 10.1002/jor.21217.

Freitas G, Lopes HB, Almeida ALG, Gimenes R, Beloti, MM, Rosa, AL. Effect of locally injected osteoblasts combined with a barrier membrane on the repair of bone defects. Abstract Book - 10th World Biomaterials Congress - Montreal, Canada - May 17-22, 2016.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. Cell Tissue Kinet. 1970;3:393-403.

Gimenes R, Zaghete MA, Bertolini M, Varela JA, Coelho LO, Silva NF. Composites PVDF-TrFE/BT used as bioactive membranes for enhancing bone regeneration. Smart Structures and Materials 2004: Electroactive Polymer Actuators and Devices (eapad). Bellingham: Spie-int Soc Optical Engineering, v. 5385, p. 539-547, 2004. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/33709>.

Ghudasra JH, Nickoli MS, Hashmi SZ, Nelson JT, Mendoza M, Nicolas JD, Bellary SS, Sonn K, Ashtekar A, Park CJ, Babu J, Yun C, Ghosh A, Kannan A, Stock SR, Hsu WK, Hsu EL. Ovariectomy-Induced Osteoporosis Does Not Impact Fusion Rates in a Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2-Dependent Rat Posterolateral Arthrodesis Model. Global Spine J. 2016 Feb;6(1):60-8. doi:10.1055/s-0035-1556582.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011;45:14-24.

Greenbaum MA, Kanat IO. Current concepts in bone healing. Review of the literature. *J Am Podiatr Med Assoc*. 1993 Mar;83(3):123-9.

Hench LL. Bioactive materials: the potential for tissue regeneration. *J Biomed Mater Res*. 1998;41:511-518.

Hench LL. Bioactive ceramics. *Ann NY Acad Sci*. 1988;523:54-71.

Hench LL, Paschall HA. Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. *J Biomed Mater Res*. 1973;7:25-42.

Hum J, Boccaccini AR. Bioactive glasses as carriers for bioactive molecules and therapeutic drugs: a review. *J Mater Sci Mater Med*. 2012; doi:10.1007/s10856-012-4580-z.

International Osteoporosis Foundation: available at <https://www.iofbonehealth.org/facts-statistics>

Jung RE, Fenner N, Hämmerle CH, Zitzmann NU. Long-term outcome of implants placed with guided bone regeneration (GBR) using resorbable and non-resorbable membranes after 12-14 years. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Oct;24(10):1065-73. doi:10.1111/j.1600-0501.2012.02522.x.

Kalu, DN. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91.

Karageorgiou V, Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005;26:5474-5491.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24:1294-1301.

Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med*. 2006 Jan-Mar;10(1):7-19.

Kido HW, Oliveira P, Parizzoto NA, Crovace MC, Zanutto ED, Peitl-Filho O, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Ribeiro DA, Renno AM. Histopathological, cytotoxicity and genotoxicity evaluation of Biosilicate® glass-ceramic scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2013; 101:667-673.

Kido HW, Tim CR, Bossini PS, Parizotto NA, de Castro CA, Crovace MC, Rodrigues AC, Zanutto ED, Peitl Filho O, de Freitas Anibal F, Rennó AC. Porous bioactive scaffolds: characterization and biological performance in a model of tibial bone defect in rats. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26:74.

Kosugi K, Yonezu H, Kawashima S, Honda K, Arai Y, Shibahara T. A longitudinal study of the effect of experimental osteoporosis on bone trabecular structure in the rat mandibular condyle. *Cranio*. 2013 Apr;31(2):140-50.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260:920-926.

Langer R, Vacanti JP. Artificial organs. *Sci Am*. 1995 Sep;273(3):130-3.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008 Oct;58(5):424-30.

Linde A, Hedner E. Recombinant bone morphogenetic protein-2 enhances bone healing, guided by osteopromotive e-PTFE membranes: an experimental study in rats. *Calcif Tissue Int*. 1995 Jun;56(6):549-53.

Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: challenges and obstacles. *J Cell Mol Med*. 2005 Jan-Mar;9(1):72-84.

Lopes HB, Santos Tde S, de Oliveira FS, Freitas GP, de Almeida AL, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate composite for in vivo support of bone formation. *J Biomater Appl*. 2014 Jul;29(1):104-12.

Lopes HB, Ferraz EP, Almeida AL, Florio P, Gimenes R, Rosa AL, Beloti MM. Participation of MicroRNA-34a and RANKL on bone repair induced by poly(vinylidene-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2016 Sep;27(13):1369-79.

Makhluf HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268:669-672.

Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1986;1:31-37.

Marcu F, Bogdan F, Muțiu G, Lazăr L. The histopathological study of osteoporosis. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52(1 Suppl):321-5.

Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med.* 2008 Jan;3(1):1-5.

Muller R. The Zurich experience: one decade of three-dimensional high-resolution computed tomography. *Top Magn Reson Imaging.* 2002;13:307–322.

Pacifici R, Brown C, Puscheck E. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991;88:5134–5138.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987;2:595-610.

Park J, Lakes RS. *Biomaterials an Introduction.* New York: Springer; 2010.508p.

Peitl-Filho O, Zanutto ED, Hench LL. Bioactive ceramics and method for preparing bioactive ceramics. Patent WO 97/41079, 1997.

Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K, Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.* 2008;17:761-773.

Pino AM, Ríos S, Astudillo P, Fernández M, Figueroa P, Seitz G, Rodríguez JP. Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 2010 Mar;25(3):492-8. doi:10.1359/jbmr.090802.

Pontoriero R, Nyman S, Lindhe J, Rosenberg E, Sanavi F. Guided tissue regeneration in the treatment of furcation defects in man. *J Clin Periodontol.* 1987 Nov;14(10):618-20.

Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretão MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, Oliveira J, Martins J, Kuligovski C, Mansur F, Christofis A, Amaral VF, Brofman PS, Goldenberg S, Nakao LS, Correa A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med.* 2008;233:901-913.

Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone.* 2006 Feb;38(2 Suppl 1):S4-9.

Ronda M, Rebaudi A, Torelli L, Stacchi C. Expanded vs. dense polytetrafluoroethylene membranes in vertical ridge augmentation around dental implants: a prospective randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2014 Jul;25(7):859-66. doi: 10.1111/clr.12157. Epub 2013 Apr 8.

Rosa AL, de Oliveira PT, Beloti MM. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. *Expert Rev Med Devices.* 2008;5:719-728.

Salgado AJ, Oliveira JM, Martins A, Teixeira FG, Silva NA, Neves NM, Sousa N, Reis RL. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Past, Present, and Future. *Int Rev Neurobiol.* 2013;108C:1-33.

Scalize PH, Bombonato-Prado KF, de Sousa LG, Rosa AL, Beloti MM, Semprini M, Gimenes R, de Almeida AL, de Oliveira FS, Hallak Regalo SC, Siessere S.

Poly(Vinylidene Fluoride-Trifluoroethylene)/barium titanate membrane promotes de novo bone formation and may modulate gene expression in osteoporotic rat model. *J. Mater Sci Mater Med.* 2016 Dec;27(12):180.

Scalize PH, de Sousa LG, Regalo SC, Semprini M, Pitol DL, da Silva GA, de Almeida Coelho J, Coppi AA, Laad AA, Prado KF, Siessere S. Low-level laser therapy improves bone formation: stereology findings for osteoporosis in rat model. *Lasers Med Sci.* 2015 Jul;30(5):1599-607. doi:10.1007/s10103-015-1773-y.

Sensebé L, Bourin P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. *Transplantation.* 2009;87(9 Suppl):S49-S53.

Sicchieri LG, Crippa GE, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Pore size regulates cell and tissue interactions with PLGA-CaP scaffolds used for bone engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2012;6:155-162.

Siéssere S, de Sousa LG, Issa JP, Iyomasa MM, Pitol DL, Barbosa AP, Semprini M, Sebald W, Bentley MV, Regalo SC. Application of low-level laser irradiation (LLLI) and rhBMP-2 in critical bone defect of ovariectomized rats: histomorphometric evaluation. *Photomed Laser Surg.* 2011;29:453-458.

Siqueira RL, Zanotto ED. Biosilicate®: Historical of a highly bioactive brazilian glass-ceramic. *Quim Nova.* 2011;7:1231-1241.

South-Paul JE. Osteoporosis: Part I- evaluation and assessment. *Am Fam Physician.* 2001;63:897-904.

Sverzut AT, de Albuquerque GC, Crippa GE, Chiesa R, Valle CD, de Oliveira PT, Beloti MM, Rosa AL. Bone tissue, cellular, and molecular responses to titanium implants treated by anodic spark deposition. *J Biomed Mater Res A.* 2012;100:3092-3098.

Teixeira LN, Crippa GE, Gimenes R, Zaghete MA, de Oliveira PT, Rosa AL, Beloti MM. Response of human alveolar bone-derived cells to a novel poly(vinylidene fluoride-trifluoroethylene)/barium titanate membrane. *J Mater Sci Mater Med.* 2011; 22(1):151-8. doi:10.1007/s10856-010-4189-z.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. 1995 Oct;17(4 Suppl):125S-133S.

Turner S. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cells Mater*. 2001;1:66–81.

Witkowska-Zimny M, Walenko K. Stem cells from adipose tissue. *Cell Mol Biol Lett*. 2011;16:236-257.

Wu X, Wang S, Chen B, An X. Muscle-derived stem cells: isolation, characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Cell Tissue Res*. 2010;340:549-567.

Van Leeuwen AC, Huddleston Slater JJ, Gielkens PF, de Jong JR, Grijpma DW, Bos RR. Guided bone regeneration in rat mandibular defects using resorbable poly(trimethylene carbonate) barrier membranes. *Acta Biomater*. 2012 Apr;8(4):1422-9. doi:10.1016/j.actbio.2011.12.004.

Yang YL, Chang CH, Huang CC, Kao WM, Liu WC, Liu HW. Osteogenic activity of nanonized pearl powder/poly (lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomed Mater Eng*. 2013; 23:S1019-S1025.

Yu SJ, Liu HC, Ling-Ling E, Wang DS, Zhu GX. Proliferation and differentiation of osteoblasts from the mandible of osteoporotic rats. *Exp Biol Med*. 2012; 237:395-406.

Zhang WB, Zhong WJ, Wang L. A signal-amplification circuit between mir-218 and wnt/ β -catenin signal promotes human adipose tissue-derived stem cells osteogenic differentiation. *Bone*. 2013 Sep 30. doi:pil: S8756-3282(13)00369-4.

Zhang J, Fu Q, Ren Z, Wang Y, Wang C, Shen T, Wang G, Wu L. Changes of serum cytokines-related Th1/Th2/Th17 concentration in patients with postmenopausal osteoporosis. *Gynecol Endocrinol*. 2015 Mar; 31(3):183-90. doi:10.3109/09513590.2014.975683.