



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

FILIPÉ CÁSSIO SILVA DE LIMA

**USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS COM O SISTEMA
RIGENERA E BIOMEMBRANA A BASE DE QUITOSANA NO TRATAMENTO DE
LESÕES DE CALVÁRIA EM RATOS**

**RECIFE / PE
2021**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

FILIPPE CÁSSIO SILVA DE LIMA

**USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS COM O SISTEMA
RIGENERA E BIOMEMBRANA A BASE DE QUITOSANA NO TRATAMENTO DE
LESÕES DE CALVÁRIA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Concentração Morfofisiologia, Sanidade humana, Animal e ambiental.

Orientador:

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares

Coorientador:

Prof. Dr. Marcelo Weinstein Teixeira

RECIFE / PE

2021

Dados Internacionais de Catalogação
na Publicação Universidade Federal
Rural de Pernambuco Sistema
Integrado de Bibliotecas

Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F483u de Lima, Filipe Cássio
USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS COM O SISTEMA RIGENERA E
BIOMEMBRANA A BASE DE QUITOSANA NO TRATAMENTO DE LESÕES DE CALVÁRIA EM
RATOS /
Filipe Cássio de Lima. - 2021.
68 f. : il.

Orientador: Anisio Francisco
Soares. Coorientador: Marcelo
Weinstein Teixeira. Inclui
referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de
Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.

1. Regeneração óssea. 2. Célula-tronco. 3. Sistema Rigenera. 4. Microenxertos.
I. Soares, Anisio Francisco, orient. II. Teixeira, Marcelo Weinstein, coorient. III. Título

CDD 636.089

FILIPE CÁSSIO SILVA DE LIMA

**USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS OBTIDAS COM O SISTEMA
RIGENERA E BIOMEMBRANA A BASE DE QUITOSANA NO TRATAMENTO DE
LESÕES DE CALVÁRIA EM RATOS**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Anísio Francisco Soares (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. Marcelo Jorge Cavalcante de Sá (1º membro - Titular)
Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza (2º membro - Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (3º membro - Titular)
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE.

PhD. Welma Emídio da Silva (4º Membro - Titular)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (Suplente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. Marcelo Weinstein Teixeira (Suplente)
Doutora em Biociência Animal – UFRPE.

Aprovada em ____/____/____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, um mestre superior por excelência por dar forças para chegar até aqui mesmo sem eu merecer e estar tão afastado dele.

Agradeço à família, bem maior que dividiu esses 12 anos de UFRPE de poucas vitórias, aprendizados diversos e angústias diversas.

Aos membros da UFRPE que atuaram diretamente nesse processo de 5 anos. Começo pela equipe do LAFICE em especial o professor Marcelo Teixeira, Hugo Viana, Ana Beatriz e Victor pela dedicação e empenho nos dias de experimento. Agradeço ao professor Fabiano Séllos pelas tomografias e análises das imagens realizadas no Focus Diagnóstico com uma equipe super atenciosa formada pela professora Thaiza Tavares e Rafael Tavares. A Doutora e amiga de laboratório em tempos de Mestrado Welma Emídio, cuja pessoa me ensinou tantas técnicas de histologia e me ajudou nessa reta final de doutorado. Ao professor Valdemiro Amaro Jr por abrir as portas de seu laboratório e nos ajudar quanto a as análises histopatológicas. A equipe do laboratório FAMA pelas oportunidades, parcerias e aprendizados, em especial aos professores Manoel Adrião e Áurea e às pesquisadoras Silvany Araújo (em memória), Luciana Costa e Ericka Queiroz.

Ao professor Anísio Soares por me receber em 2012, abriu as portas e acompanhou de perto minha discreta evolução como pesquisador e ser humano. Foi uma jornada de altos e baixos, mas seguimos e chegamos ao final do processo. Toda sorte e sucesso do mundo em sua jornada!

Agradeço a minha teimosia e autocontrole, por não me fazer desistir quando tive oportunidade. Cá estou. Ciclo que se encerra! Preciso descansar em caráter de urgência (risos)!

Agradeço aos técnicos do Biotério do DMFA, André e Renata, profissionais que têm todo o meu respeito. Ganhei um pai e uma amiga para puxar minha orelha. Formamos uma família sem querer.

Obrigado aos que estiveram do meu lado nesse processo!

RESUMO

Defeitos ósseos constituem um problema de saúde global. O sistema *Rigenera* através do dispositivo *Rigeneracons*® permite a extração de microenxertos ricos em termos de células progenitoras, o que tem sido uma excelente opção de estudos em medicina regenerativa. Os biomateriais também têm sido utilizados na área médica ou biomédica, como alternativas efetivas para a substituição de tecidos, inclusive do tecido ósseo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o processo de regeneração óssea através de enxertos autólogos obtidos através do dispositivo *Rigeneracons* e biomembrana a base de quitosana com microcelulose fibrilada (MFC) em calvária de ratos. Foram utilizados 54 ratos Wistar, machos (285 ± 29 g), provenientes do Biotério de Criação e Experimentação do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas com alimentação e água *ad libitum*, na temperatura de $22 \pm 5^\circ\text{C}$ e iluminação artificial, com ciclos alternados de claro-escuro de 12 horas. Esses animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos cada um constituído por 18 animais a saber: Grupo A-Tratado com os microenxertos obtidos do sistema *Rigenera*; Grupo B- Tratado com a Biomembrana a base de quitosana/MFC; e Grupo AB- Biomembrana associado com os microenxertos obtidos do dispositivo *Rigenera*. Posteriormente, duas lesões (5mm) em cada antímero na calvária de cada animal, sendo o animal controle dele mesmo. As tomografias computadorizadas foram realizadas usando um scanner GE Hi-Speed FXI CT e, após o processo de varredura, foi feita a reconstrução das imagens em software de visualização DICOM. Os animais foram eutanasiados 15, 30 e 60 dias após os tratamentos, as calvárias coletadas e processadas para análise histopatológica e histoquímica. Nas análises de densitometria óssea verificamos que no grupo A foi mais eficiente aos 60 dias, o grupo B aos 15 dias e pouco eficiente com 60 dias e no grupo AB mostraram aumento da densitometria óssea aos 30 e 60 dias. Foi verificado que não houve regeneração nas lesões dos controles de cada grupo, diferentemente das tratadas, onde foram verificadas áreas de formação óssea e tecido mesenquimal bem ativado. Conclui-se que o sistema *Rigenera* é eficiente para o uso em terapia celular em animais associado com a biomembrana a base de quitosana/MFC. Será possível utilizar a mesma para o uso em medicina veterinária e, principalmente, em cirurgias de lesão óssea em busca da regeneração óssea.

Palavras-chave: Regeneração óssea, Células-tronco, Sistema *Rigenera*, Microenxertos.

ABSTRACT

Bone defects are a global health problem. The Rigenera system through the Rigeneracons® device allows the extraction of micrografts rich in terms of progenitor cells, which has been an excellent option for studies in regenerative medicine. Biomaterials have also been used in the medical or biomedical fields, as effective alternatives for the replacement of tissues, including bone tissue. Thus, this work aimed to evaluate the bone regeneration process through autologous grafts obtained through the Rigeneracons device and a chitosan-based biomembrane with fibrillated microcellulose (MFC) in rat calvaria. 54 male Wistar rats (285 ± 29 g), from the Animal Breeding and Experimentation Laboratory of the Department of Animal Morphology and Physiology of the Federal Rural University of Pernambuco, were used. The animals were kept in cages with food and water ad libitum, at a temperature of $22 \pm 5^\circ\text{C}$ and artificial lighting, with alternating light-dark cycles of 12 hours. These animals were randomly divided into 3 groups each consisting of 18 animals, namely: Group A- Treated with the micro-grafts obtained from the Rigenera system; Group B- Treated with Biomembrane based on chitosan / MFC; and Group AB- Biomembrane associated with the micro-grafts obtained from the Rigenera device. Subsequently, two lesions (5mm) on each antimer in the calvaria of each animal, the animal being its control. The CT scans were performed using a GE Hi-Speed FXI CT scanner and, after the scanning process, the images were reconstructed using DICOM visualization software. The animals were euthanized 15, 30 and 60 days after the treatments, the calvaria collected and processed for histopathological and histochemical analysis. In bone densitometry analyzes we found that in group A it was more efficient at 60 days, group B at 15 days and not very efficient at 60 days and in group AB they showed increased bone densometry at 30 and 60 days. It was verified that there was no regeneration in the lesions of the controls of each group, differently from the treated ones, where areas of bone formation and well-activated mesenchymal tissue were verified. It is concluded that the Rigenera system is efficient for use in cell therapy in animals associated with the chitosan / MFC-based biomembrane. It will be possible to use it for use in veterinary medicine and, mainly, in bone injury surgeries in search of bone regeneration.

Keywords: Bone regeneration, Stem cells, Rigenera system, Micro grafts.

SUMÁRIO

Capítulos		Pág.
I	1. Introdução.....	14
	2. Revisão de literatura.....	16
	2.1. Células-tronco mesenquimais e sua capacidade de diferenciação e regeneração.....	16
	2.2. Osso e processo de regeneração óssea devido a lesões....	19
	2.3. Uso de biomateriais a base de quitosana na reconstrução óssea.....	21
	2.4. Cartilagem xifóide.....	24
	2.5. Calvária.....	25
	2.6. Dispositivo médico em uso: o Sistema <i>Rigenera</i>	26
	3. Objetivos.....	28
	3.1. Objetivo geral.....	28
	3.2. Objetivos específicos.....	28
	Referências.....	28
II	Avaliação da eficácia do Sistema <i>Rigeneracon</i> no tratamento de lesões de calvária em ratos.....	34
	Resumo e abstract.....	34
	Introdução.....	36
	Material e métodos	36
	Resultados e discussão.....	40
	Conclusão.....	47
	REFERÊNCIAS.....	47
III	Dispositivo rigenera e biomembrana a base de quitosana: estudo de regeneração óssea em defeito crítico em calvária de ratos.....	49
	Resumo e abstract.....	50
	Introdução.....	51
	Material e métodos.....	53

Resultados e discussão.....	57
Referências.....	64
Anexos.....	68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I	Pag
Figura 1. Esquema demonstrativo da capacidade proliferativa e potencial de diferenciação das células-tronco.....	17
Figura 2. Estruturas químicas da quitina e da quitosana. A quitina é um polissacarídeo composto por N-acetilglicosamina. A quitosana é o derivado da quitina, sendo constituída por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina.....	23
Figura 3. Ilustração da caixa torácica humana. Observe que o processo xifoide está localizado na extremidade inferior do esterno.....	25
CAPÍTULO II	
Figura 1: Figura 1. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema <i>Rigenera</i> . A: coleta da cartilagem xifoide; B: cartilagem inserida no dispositivo <i>rigeneracon</i> com solução salina estéril a 0,9%; C: sistema <i>Rigenera</i> para processamento da cartilagem xifoide e obtenção de microenxertos, mantido sob rotação constante durante cinco minutos.....	38
Figura 2. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema <i>Rigenera</i> . A: realização de defeito ósseo crítico por meio de broca trefina rotativa de 5mm de diâmetro; B: aspecto do defeito crítico nos ossos parietais, lado direito – Controle, lado esquerdo – Tratamento com sistema <i>Rigenera</i> ; C: administração da cartilagem xifoide processada no sistema <i>Rigenera</i> na lesão crítica da calvária do rato.....	39
Figura 3. Aspecto da recuperação da ferida cirúrgica de ratos Wistar, após procedimento em calvária e tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema <i>Rigenera</i> . A: Após cinco dias; B: após 10 dias; C: após 15 dias.....	39

Figura 4. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G15-C) e Tratado (G15-T) após 15 dias do tratamento com cartilagem xifoide. Tricrômico de Gomori. Figura A: G15-C, tecido ósseo e osteoblastos. Figura B: G15-C, deposição de colágeno, osteócitos e osteoblastos. Figura C: G15-C, ilhotas em diferentes pontos. Figura D: G15-T, membrana conjuntiva. Figura E: G15-T, área de formação óssea, Ilhotas de tecido ósseo circundado por membrana conjuntiva ossificante, com osteoblasto..... 41

Figura 5. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do controle (G30-C) e tratado (G30-T) após 30 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G30-C, projeção de tecido ósseo e osso compacto se formando. Figura B: G30-C, ossificação intramembranosa. Figura C: G30-C, membrana conjuntiva com bastante colágeno fibroso. Figura D: G30-T, ossificação endocondral. Figura E: G30-T, extremidades distantes, mostrando que não houve fechamento..... 43

Figura 6: Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G60-C) e *Rigenera* (G60-R) após 60 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G60-C, ossificação intramembranosa. Figura B: G60-C, membrana dando origem a tecido ósseo. Figura C: G60-C, sistema de Havers. Figura D: G60-T, Tecido conjuntivo fibroso denso, fibrocartilagem e osteoblastos. Figura E: G60-T, remodelação acontecendo..... 46

CAPÍTULO III

Figura 1: análise estatística densitometria óssea dos animais realizada no GraphPad Prism 8.3.4. utilizando a ANOVA como teste post hoc de Borrefoni ($P < 0,05$)..... 58

Figura 2: reconstrução das imagens em software de visualização DICOM (OsiriX-64 bits, versão 7.0), cujo as regiões da calvária foram selecionadas e explorado o tempo de 60 dias de tratamento. Imagens demonstram a região de interesse dos grupos Rigenera (A), Rigenera associado ao biomaterial (B) e Biomaterial (C). Os valores foram obtidos em unidades Hounsfield para osso trabecular (HUt)..... 59

Figura 3: Falha/defeito crítico em calvária craniana de ratos Wistar do Controle do Grupo B- 15 dias (A, B e C) e tratado com a biomembrana a base de quitosana/MFC 15 dias (D, E e F). A e C: observa-se tecido ósseo do defeito crítico (TOC) e membrana conjuntiva (MC); B: deposição de cálcio (DC); D: tecido mesenquimal (TM); E: tecido conjuntivo denso (TCD) e oss díploe (OD); F: tecido mesenquimal osteogênico. Barra: corte em 5 µm.

HE..... 61

..

Figura 4: Figura 3: Falha/defeito crítico em calvária craniana de ratos Wistar do Controle do Grupo B- 15 dias (A, B e C) e tratado com a biomembrana a base de quitosana/MFC 15 dias (D, E e F). A e C: observa-se tecido ósseo do defeito crítico (TOC) e membrana conjuntiva (MC); B: deposição de cálcio (DC); D: tecido mesenquimal (TM); E: tecido conjuntivo denso (TCD) e oss díploe (OD); F: tecido mesenquimal osteogênico. Barra: corte em 5 µm.

HE..... 62

Figura 5: Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle do Grupo B- 60 dias (A, B e C) e tratamento com a biomembrana a base de quitosana/MFC 60 dias (D, E e F). Observados e A: tecido ósseo compacto no defeito crítico (TC), tecido ósseo compacto (TOC) e tecido mesenquimal osteogênico (TMO); B: tecido mesenquimal osteoprogenitor (TM), TOC e tela subcutânea (TS); C: TM; D: tecido ósseo jovem (TO) e TM; E: TC; F: TO e TMO. Barra: corte em 5 µm

HE..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS

ATA – Células-tronco adultas

BMPs – Proteína morfogenética óssea

CT – Célula-tronco

CTE – Células-tronco embrionárias

CTM – Células-tronco mesenquimal

CT-MO – Célula-tronco da medula óssea

CTMs – Células-tronco mesenquimais

CTM-MO – Célula-tronco mesenquimal da medula óssea

CTM-MOh – Célula-tronco mesenquimal da medula óssea humana

FGF – Fator de crescimento de fibroblasto

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

MFC- Celulose microfibrilada

PDGF – Fator de crescimento derivado de plaqueta

TC – Tomografia Computadorizada

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

VEGF– Fator de crescimento endotelial vascular

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes que têm funções de apoio e efeitos terapêuticos em medicina regenerativa. Elas são capazes de liberar citocinas anti-inflamatórias, moléculas tróficas e anti-apoptóticas, para promover a proteção e reparação de tecidos danificados (GIACCONE et al., 2014). São operacionalmente definidas como células que têm o potencial de autorenovação ilimitada ou prolongada, bem como a capacidade de dar origem a pelo menos um tipo de células maduras e diferenciadas (CHAGASTELLES, 2011).

A diferenciação de CTMs em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênica têm permitido a utilização destas células no tratamento das alterações degenerativas, mostrando-se eficaz tanto em modelos animais quanto em humanos (AL-NBAHEEN et al., 2013; BAVARESCO et al., 2020). No entanto, este é um assunto de investigação em curso, e muitas questões permanecem sem resposta. Alguns estudos têm mostrado que o potencial osteogênico das CTMs pode variar em função do tipo do tecido, local de coleta, espécies animais, idade, estado de saúde e desempenho de atividade física (KANG, 2012).

As CTMs têm recebido bastante atenção nos campos da engenharia de tecidos e medicina regenerativa porque elas podem ser facilmente coletadas numa forma minimamente invasiva, propagar *in vitro*, possuem valiosas propriedades tais como multipotência, atividades parácrinas e capacidade de modulação imune (ALVES et al., 2014). Uma área importante de grande potencial é a utilização de CTMs para a restauração de má formação óssea. Em virtude da sua diferenciação celular potencial e efeitos tróficos, as CTMs são promissoras candidatas para seu uso na medicina regenerativa e reparadora. Existem CTMs em vários compartimentos do tecido conjuntivo, e têm sido isolados a partir de vários tecidos (NEUPANE et al., 2008).

As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (CTM-MOh), também conhecidas como células-tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea ou, como recentemente sugerido pela *International Society for Cytotherapy*, células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células

clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea, capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e, possivelmente, mas ainda controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos, como células neurais ou hepatócitos (BYDLOWSKI, 2009).

Fazendo-se uso destas abordagens, pesquisas recentes com CTMs criaram uma nova possibilidade de abordagem para procedimentos regenerativos com tecido autólogo. O novo sistema, conhecido como sistema *Rigenera* de desagregação de tecidos, promove a extração de micro enxertos, ricos em CT, a partir de pequenas amostras de tecido conjuntivo autólogo (TROVATO et al., 2015). O procedimento leva apenas alguns minutos para ser realizado, o que permite a sua utilização em tempo real, durante um único procedimento cirúrgico (GIACCONE et al., 2014).

Esta inovação evita a necessidade de cultura celular e permite a utilização imediata das amostras colhidas (BAENA, 2015). No sistema Rigeneracon® os pacientes passam, ao mesmo tempo, a ser doador e receptor dos micros enxertos. Atualmente, o campo principal de aplicação do sistema tem sido em pacientes humanos, submetidos a procedimentos reparadores em cirurgia buco-maxilo-facial (BRUNELLI et al., 2013) dermatológica (ZANZOTTERA et al., 2014), utilizando células oriundas de amostras da pulpa dental (GIACCONE et al., 2014).

Recentemente, pesquisadores também têm mostrado a eficácia de materiais capazes de serem associados a outras substâncias que favoreçam a formação óssea, especialmente os biopolímeros naturais, em particular a quitosana (PARK et al., 2003). Este biopolímero hidrofílico é obtido a partir da quitina, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Características como biocompatibilidade e a biodegradabilidade são características biológicas que permitem diversas aplicações para este biomaterial na área da saúde (SPIN-NETO et al., 2013).

Na medicina regenerativa e bioengenharia de tecidos, o uso de biopolímeros como a quitosana vem sendo estudada para terapias de regeneração óssea, apresentando-se como uma alternativa promissora (ROSENDO et al., 2020). Segundo ROLIM et al. (2018) esse biomaterial tem sido extensivamente estudado em pesquisas, como arcabouço tridimensional na regeneração óssea. Entretanto, ela

ainda é mais utilizada como um curativo e agente hemostático, demonstrando a necessidade de realização de estudos mais avançados e com novas abordagens de aplicabilidade, seja em associação ou não com outros compostos (Dimitriou et al., 2011). Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a eficácia da utilização de células-tronco mesenquimais autólogas, obtidas por meio do sistema *Rigenera*, e biomaterial a base de quitosana no tratamento de lesões em calvária de ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células-tronco mesenquimais e sua capacidade de diferenciação e regeneração

As células-tronco (CT) constituem grupo de células indiferenciadas, caracterizadas pela propriedade de originar células especializadas e de autorrenovação (CHEUNG; RANDO, 2013). O conceito de células-tronco surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till demonstraram que a medula óssea abriga CT com capacidade de originar todas as células sanguíneas (TILL, MCCULLOCH, 1961). Estudos posteriores, realizados em 1998 a partir de fetos abortados e de blastocistos humanos, isolaram células com capacidade de diferenciação em todos os tecidos do corpo e ficaram conhecidas como células-tronco embrionárias (THOMSON, et al., 1998).

Dessa forma, as CT foram classificadas em dois grupos: células-tronco embrionárias (CTE) e célulastronco adultas (CTA) (ROCHA et al., 2012). As CTA se dividem em células-tronco mesenquimais (CTM) e células-tronco hematopoiéticas (CTH) (BIANCO et al., 2008). Dentre as CTA, as CTM, compõem um grupo que vem despertando particular interesse, devido a sua capacidade clongênica e elevada plasticidade, o que lhes confere a capacidade de originar, no organismo, células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal (SOARES; ARGOLO NETO; CARVALHO, 2020) (Fig. 1).

Segundo a *International Society for Cellular Therapy*, são três os requerimentos mínimos para uma população de células ser classificada como CTM. A primeira é que CTMs são isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua

aderência seletiva, em cultura, à superfície plástica. A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem (BYDLOWSKI et al., 2009).

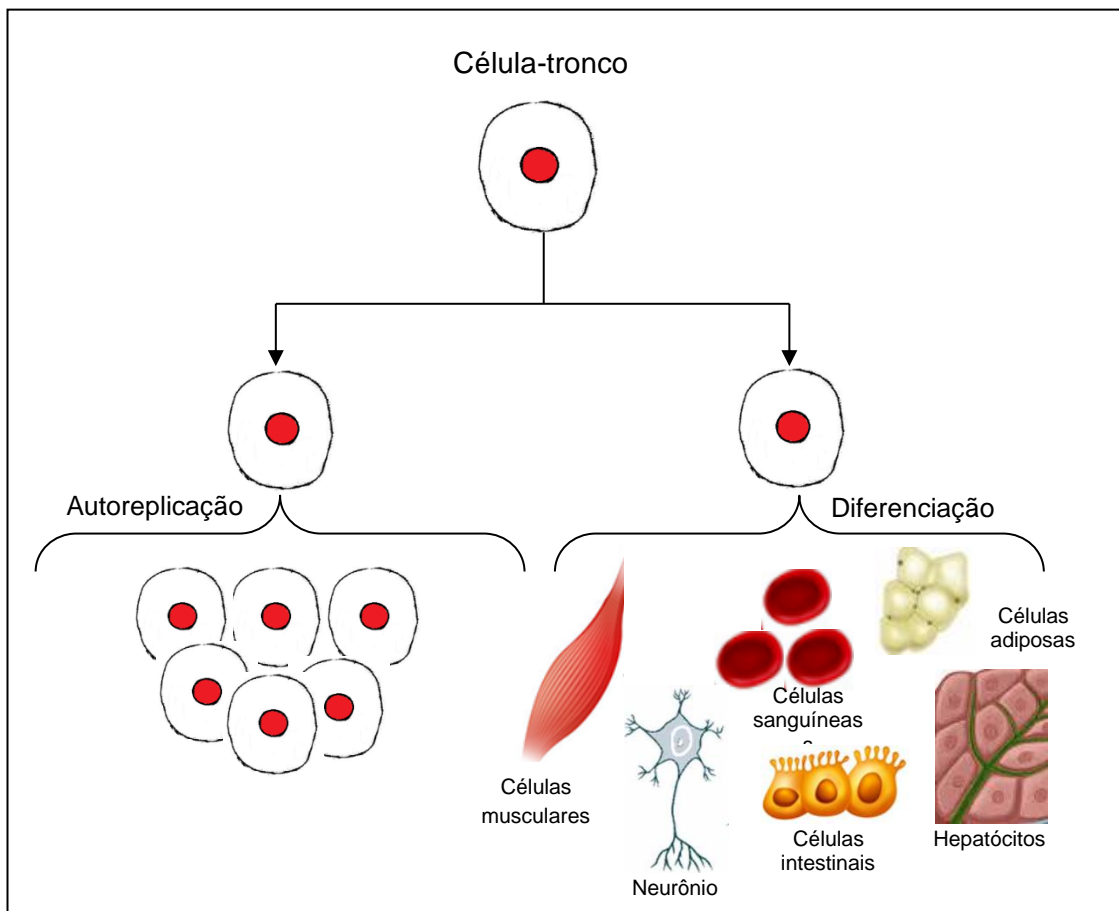


Figura 1. Esquema demonstrativo da capacidade proliferativa e potencial de diferenciação das células-tronco. As células-tronco são células com capacidade de autorrenovação e diferenciação. Ou seja, elas podem se dividir e se produzir células-filhas idênticas ou se dividir e produzir células que irão se diferenciar em outro tipo celular.

A capacidade proliferativa, potencial de diferenciação, e perfil de marcadores de superfície das CTMs varia com base no tecido de origem (WYLES et al., 2015). E, se sabe que quando submetidas a diferentes estímulos, as CTMs são capazes de se diferenciar em células osteogênica, condrogênica, adipogênica, neurogênica e

cardiogênica (BYDLOWSKI, 2009), o que as tornaram uma alternativa terapêutica atrativa e com amplo espectro de aplicações. Vários estudos têm relatado que o transplante com CTMs derivados da medula óssea (CTM-MO) melhorou os sinais clínicos de acidente vascular cerebral isquêmico (BANG et al., 2005). Um estudo sobre degeneração do disco canino, averigou que injeção de CTM-MO no disco degenerado desaceleraram os efeitos da degeneração (KISIEL et al., 2012). Resultados clínicos sobre o uso de CTMs de diferentes fontes para terapias regenerativas em cavalos parecem ser comparáveis com CTM-MO (ARNHOLD, 2015). Filho et al. (2013) avaliou a capacidade de regeneração do nervo tibial de coelhos, mediante a associação da terapia celular com técnica de tubulização por prótese de silicone, e observou a diminuição significativa da presença de degeneração walleriana nos animais tratados.

O efeito positivo das CTMs nos processos degenerativos parece estar relacionado à diferentes conjuntos de moléculas que interagem com as células locais e células circulantes para coordenar a cascata de cura, tais como efetores de inflamação (IL-1, IL-6, TNF- α), mitógenos (TGF- β , IGF, FGF e PDGF), morfógenos (BMPs) e fatores angiogênicos (VEGF e angiopoietinas). Os efeitos destas moléculas na proliferação e diferenciação de CTMs foram amplamente investigados *in vitro* e os resultados indicaram que estas moléculas sinalizadoras podem induzir proliferação e diferenciação celular, tanto CTM como outras linhagens progenitoras (DIMITRIOU, 2005; GHANBARI, 2016).

Recentemente, as CTMs têm ganhado atenção como um instrumento de potencial terapêutico para a medicina regenerativa e tem sido isolada a partir de uma grande variedade de tecidos, como: polpa dentária humana imatura, tecido adiposo, periósteo, osso trabecular, músculo esquelético, membrana sinovial, sangue, pele ou fluido sinovial. No entanto, a fonte primária de isolamento, em adultos, é a medula óssea (BYDLOWSKI et al., 2009). Células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (CTM-MO), também conhecidas como células-tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea ou células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas, presentes no estroma da medula óssea (BYDLOWSKI, 2009).

Apesar de representam uma rara subpopulação das células-tronco da medula óssea (CT-MO), cerca de < 0,01% das células mononucleares da medula óssea, elas podem ser expandidas mitoticamente em meio de cultura. Além disso, por serem capazes de diferenciação em várias linhagens de células capazes de diferenciação em várias linhagens de células do tipo mesodérmico e, possivelmente, mas ainda controverso, em outros tipos celulares não mesodérmicos (BYDLOWSKI, 2009), essas células representam uma fonte promissora para regeneração e reparo de diversos tecidos (FLORENTINO et al., 2018).

2.2. Osso e processo de regeneração óssea devido a lesões

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado (MARTIN, 2018), que tem a capacidade de cura e regeneração (MATASSI et al., 2011). Ele exerce funções importantes no corpo, tais como: locomoção, suporte e proteção de tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato e ancoragem da medula óssea. As propriedades mecânicas variam de acordo com a localização e função (ROSETI et al., 2017). Microscópicamente o tecido ósseo encontra-se constituído por dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre a qual se depositam os componentes inorgânicos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006). A matriz orgânica é formada de colágeno (principalmente tipo I), proteoglicanas e glicoproteínas adesivas, e a inorgânica por íons fosfato, cálcio, bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A união do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo (LOPES; OLIVEIRA; ESTEVES, 2015; TURNBULL et al., 2018). O colagénio tipo I representa 90% das proteínas, sendo os restantes 10% compostos por um grande número de proteínas não colagénicas (por exemplo, osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas ósseas e várias proteoglicanas). As proteínas não colagenosas participam do processo de maturação da matriz, mineralização e podem regular a atividade funcional das células ósseas (ARVIDSON et al., 2011).

Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são células ósseas especializadas. Elas estão envolvidas nos processos de formação, reabsorção, manutenção e

remodelação óssea, sendo derivadas de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção (osteoblastos e osteócitos) e outra à reabsorção (osteoclastos) (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006).

Em diversos momentos da vida, o tecido ósseo precisa modificar sua forma ou estrutura. Seja para um osso primário tornar-se maduro, para um osso crescer mantendo sua forma, para um osso esponjoso tornarse compacto ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas, o osso está em constante remodelação, por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORO, 2006). A reabsorção e deposição de matriz são processos estreitamente acoplados, que dependem da dinâmica balanceada entre as atividades dos osteoblastos e osteoclastos. No entanto, se ocorrer um desbalanço deste processo, poderá ocorrer o estabelecimento de reabsorções patológicas, prejudicando o desenvolvimento e a homeostase do tecido ósseo (TAKAYANAGI, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Os defeitos ósseos devido a trauma e a reabsorção óssea patológica e fisiológica representam um grande desafio e constituem um problema de saúde global. A necessidade de regeneração óssea em cirurgias cranianas, orais, maxilo-faciais e ortopédicas é uma das questões clínicas centrais na medicina regenerativa e de reabilitação. É difícil transmitir a enorme desvantagem social e psicológica das pessoas com defeitos ósseos e a redução significativa na sua qualidade de vida (ARVIDSON et al., 2011).

No entanto, a regeneração óssea é um processo biológico complexo de renovação da arquitetura e função do tecido ósseo perdido. A regeneração óssea guiada é um método que vem sendo utilizado e estudado há décadas, sendo definido como uma renovação óssea controlada em áreas onde existe o defeito ósseo, através da osteogênese, osteoindução ou osteocondução, a fim de restabelecer as características funcionais e estruturais do tecido lesado (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1995).

Quando um defeito ósseo ocorre devido à lesão, as células são fornecidas pelo periósteo e a regeneração ocorre. No entanto, a regeneração satisfatória torna-se mais difícil quanto maior for o defeito ósseo. É por isso que, mesmo com essa propriedade de cura, em muitas situações o enxerto ósseo é necessário (MARTIN,

2018). Ocasionalmente, um defeito ósseo pode ser formado em ortopedia e traumatologia e, neste caso, o osso não cicatriza e precisa de reconstrução. A reconstrução óssea bem-sucedida requer osteoprodução, osteoindução, osteocondução, estimulação mecânica e vascularização, além de drogas que atuam no metabolismo ósseo desempenham um papel importante no crescimento ósseo (MATASSI et al., 2011).

Um suprimento adequado de células (CTMs e osteoprogenitores) é importante para a regeneração óssea eficiente. A abordagem atual de entrega de células osteogênicas diretamente ao local de regeneração inclui o uso de aspirado de medula óssea da crista ilíaca, que também contém fatores de crescimento. É um procedimento minimamente invasivo para melhorar a reparação óssea e produz resultados satisfatórios. No entanto, a concentração e a qualidade das CTMs podem variar significativamente, dependendo do indivíduo (especialmente em pessoas mais velhas) (DIMITRIOU et al., 2011).

2.3. Uso de biomateriais a base de quitosana na reconstrução óssea

O osso é o segundo tecido mais comumente transplantado em todo o mundo, com pelo menos quatro milhões de operações fazendo uso de enxertos ósseos e materiais substitutos ósseos anualmente (TURNBULL et al., 2018). Perda óssea, defeitos, falta de vascularização, danos aos tecidos moles, falta de mecânica adequada a estabilidade, as infecções e os tumores continuam sendo os principais desafios para o sucesso da cicatrização óssea (WINKLER, 2018).

No que diz respeito aos biomateriais, a osteocondução é definida pela capacidade de um implante apoiar o crescimento do osso no local de um defeito. Osteoindução é o processo de recrutamento de células osteoprogenitoras imaturas para o local e a posterior diferenciação delas em osteoblastos sob a influência de um fator morfogenético ósseo difusível (GHANBARI, 2016). Em geral, os biomateriais (ou construções inteligentes) referem-se àqueles que: (1) possuem efeitos instrutivos / indutivos ou desencadeadores / estimulantes em células e tecidos ao projetar a resposta do material a estímulos internos ou externos, como pH, temperatura, força e magnetismo, para promover a reparação e regeneração de tecidos danificados; ou (2)

personalizam de forma inteligente as propriedades individuais e as funções controladas para participar ativamente na regeneração de tecidos (ZHANG et al., 2018). Embora os autoenxertos sejam o padrão-ouro, pesquisadores têm mostrado interesse em biomateriais que, em associação ou não a outros materiais, sejam capazes de favorecer a formação óssea (SPIN NETO et al., 2008). Os biomateriais são definidos como aqueles materiais não vivos utilizados na área médica ou biomédica, objetivando a interação com o sistema biológico. No entanto, para a composição química, as propriedades físicas e mecânicas, a biodegradabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade são características cruciais para que um biomaterial seja utilizado na engenharia de tecido ósseo (GEORGOPOULOU et al., 2018).

Nesse sentido, os biomateriais naturais têm atraído atenção particular na medicina de regeneração tecidual devido à sua baixa toxicidade, baixa resposta inflamatória crônica e capacidade de aumentar a viabilidade, proliferação e diferenciação celular (HUANG et al., 2005; SPIN-NETO et al., 2008). Devido às características biológicas, como biocompatibilidade e biodegradabilidade, a quitosana tem se destacado entre os biopolímeros naturais, fazendo com que fossem encontradas diversas aplicações para este biomaterial na área da saúde, principalmente na engenharia de tecidos (SPIN NETO et al., 2008; CHATZIPETROS et al., 2018).

A quitosana é um derivado desacetilado obtido a partir da desacetilação da quitina (Fig. 2), que se encontra abundantemente na natureza, sendo encontrada em carapaças de crustáceos, insetos, moluscos e parede celular de fungos (ABREU et al., 2013). Ela é um polissacarídeo linear composto por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (GEORGOPOULOU et al., 2018). Este material apresenta composição variável em função do grau médio de acetilação e da massa molar aparente, o que influencia em suas propriedades, pois ambos os parâmetros são importantes para definir a solubilidade do polissacarídeo em meio aquoso (SINHA et al., 2004; ASSIS; SILVA, 2005).

Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, seu derivado é reativo e solúvel em ácidos fracos. Esta promove osteocondução, capacidade de produzir estruturas

porosas e crescimento celular, natureza antibacteriana e reação mínima ao corpo estranho. Além disso, a quitosana possui similaridade estrutural com os glicosaminoglicanos e permite a incorporação de biocerâmicas, como a hidroxiapatita (CHATZIPETROS et al., 2018).

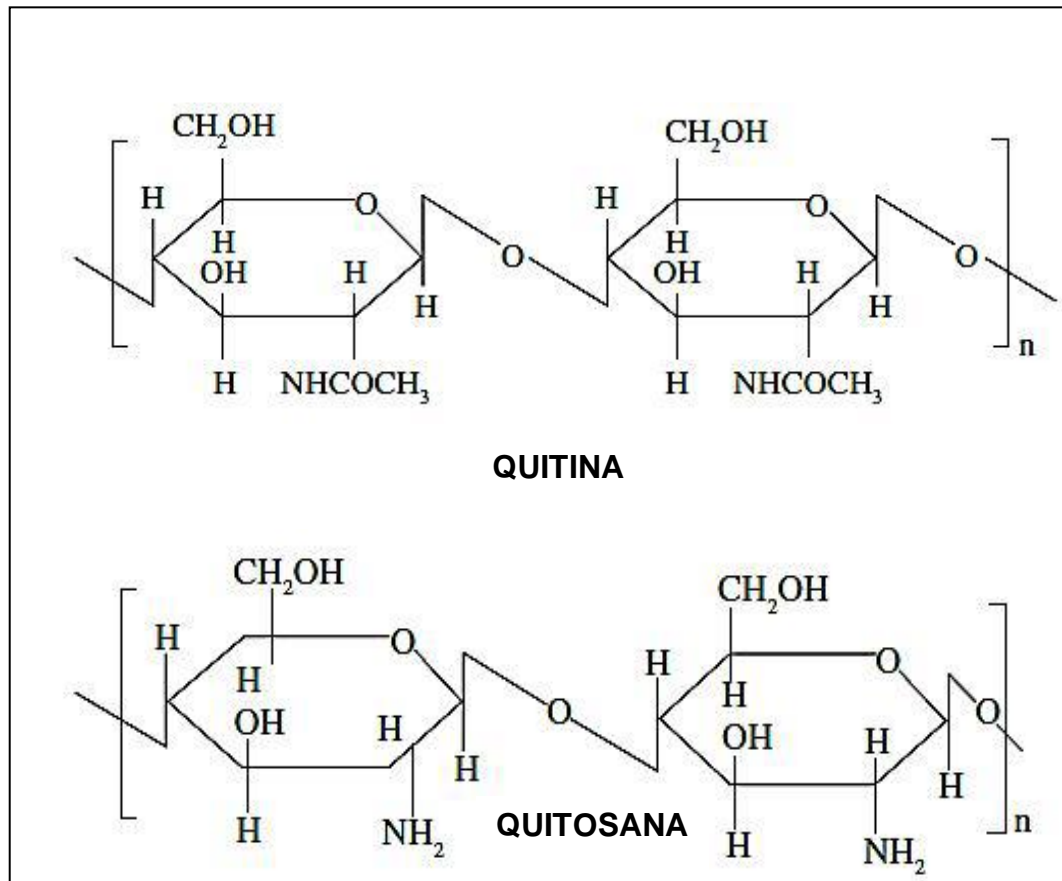


Figura 2. Estruturas químicas da quitina e da quitosana. A quitina é um polissacarídeo composto por N-acetilglicosamina. A quitosana é o derivado da quitina, sendo constituída por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina. Adaptado de SPIN-NETO et al. (2008).

Estudos *in vitro* sugerem que a quitosana possui propriedades osteogênicas, pois promove a diferenciação de células-tronco em osteoblastos formadores de ossos e promove o crescimento de colônias ósseas. Além disso, sugerem que a quitosana sozinha é suficiente para estimular a osteogênese (KJALARSDÓTTIR et al., 2019). A biocompatibilidade da quitosana, a biodegradabilidade, as propriedades antimicrobianas, a capacidade de estimular macrófagos, induzir a formação óssea e

interagir com moléculas carregadas negativamente, como glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos, são os principais motivos para explicar por seu amplo uso como andaime de biomaterial (GEORGOPOULOU et al., 2018).

2.4. Cartilagem xifóide

O esterno é composto por três porções distintas: manúbrio, corpo (gladíolo) e processo xifóide. A primeira porção, o manúbrio, se articula com a clavícula e a primeira costela e, portanto, é fixada na posição. A segunda porção, o corpo, serve como ponto de articulação para as costelas de dois a sete. Por fim, o processo xifóide contribui minimamente para a articulação da sétima costela (LACHKAR et al., 2019).

O processo xifoide (Fig. 3), também conhecido como xiphisternum, é cartilagem vestigial ligado à extremidade inferior do corpo do esterno, localizado ao lado interno do peritônio. Por conseguinte, a cartilagem processo xifóide pode ser removida sem prejudicar qualquer função biológica, e é a única fonte de tecido de cartilagem elástica que pode ser obtido sem destruir a forma ou função externa (NAM et al., 2014). O processo xifóide é composto por dois tipos de cartilagem: cartilagem hialina na porção proximal e cartilagem elástica na porção distal (ANDERSON, 2018).

Anteriormente, o processo xifoide serve como ponto de fixação das fibras do músculo reto abdominal e da aponeurose dos músculos oblíquos internos e externos da parede abdominal anterior. O processo xifóide se liga à linha alba inferiormente e aos deslizamentos diafragmáticos, torácico transverso e ligamentos costoxifóides posteriormente (MASHRIQI et al. 2017). Variações morfológicas variam de pontiagudas, bifurcadas, trifurcadas, largas, curvadas ou defletidas. Essas variações anatômicas são importantes a serem consideradas para evitar um diagnóstico incorreto durante intervenções radiológicas e para prevenir uma lesão iatrogênica durante procedimentos torácicos invasivos. Além das morfologias variáveis, o processo xifóide parece exibir diferentes características durante o desenvolvimento (EID et al. 2018).

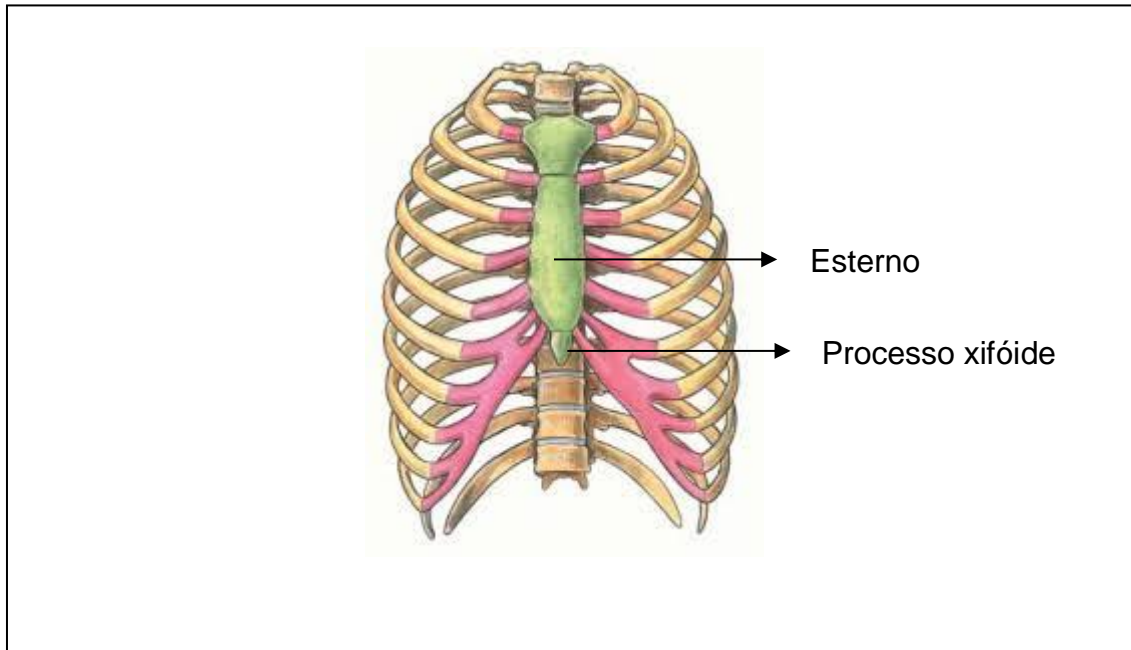


Figura 3. Ilustração da caixa torácica humana. Observe que o processo xifóide está localizado na extremidade inferior do esterno.

2.5. Calvária

A calvária é composta por oito ossos chatos: o frontal e ossos occipitais, os ossos parietais, o escamoso e porções zigomáticas dos ossos temporais e a ponta da maior asa dos ossos esfenoidais bilateralmente. Originam-se de células da crista neural craniana e ossificação intramembranosa em um padrão radial. Pelo sexto ano de desenvolvimento, há formação completa de camada intradiploica, composta de osso esponjoso e medula óssea, resultando em tábuas internas e externas do osso cortical, que aparecem densas na tomografia computadorizada (Mitra et al., 2016).

As lesões calvárias frequentemente se apresentam como achados clinicamente silenciosos em radiografias de crânio ou como massas palpáveis que podem causar dor localizada ou dor (GARFINKLE, 2011), em adição, podem ter origem nas estruturas ósseas ou podem ser secundárias à invasão de lesões à base de couro cabeludo ou lesões cerebrais na abóbada do crânio (GOMES, 2018).

Muitas espécies têm sido utilizadas para modelos animais de defeitos ósseos, incluindo ratos, coelhos, cães, porcos, ovelhas e cabras, mas grande parte da pesquisa se concentrou em modelos de roedores, devido à reprodutibilidade,

considerações estruturais e econômicas. Anatomicamente, muitas áreas do esqueleto de roedores podem servir como locais receptores de defeitos ortotópicos, incluindo os fêmures, a coluna, a mandíbula e a calvária (Spicer et al., 2013).

A restauração de defeitos ósseos no esqueleto maxilofacial continua sendo um dos problemas mais desafiadores enfrentados pelos cirurgiões bucomaxilofaciais. Traumatismos, locais de osteotomia, ressecções oncológicas, infecções ou anomalias de desenvolvimento são situações clínicas nas quais os defeitos precisam ser reconstruídos. Em adultos, apenas pequenos defeitos ósseos são capazes de cicatrizar espontaneamente (Porto et al., 2012).

2.6. Dispositivo médico em uso: o *Rigeneracon*

O dispositivo *rigeneracom* é constituinte de um sistema de preparação de amostras padronizado e seguro para a desagregação mecânica automatizada da população de células. Esta fragmentação mecânica permite extrair do tecido apenas as células menores que representam as células progenitoras responsáveis pela formação do tecido. Além disso, este sistema é capaz de cortar, sem colisão, os constituintes da matriz extracelular única, que desempenham um papel importante na redução do processo inflamatório e assim ajude a cura do tecido (Zanzottera et al., 2014).

O desagregador de tecidos biológicos *rigeneracon*, com base no protocolo *Rigenera*, permite a extração de micro enxertos de 50 µm de uma amostra de tecido conjuntivo autólogo, diretamente dentro de uma cirurgia e imediatamente utilizado sem qualquer manipulação ou cultura de células. Deste modo, usando este dispositivo médico inovador chamado *rigeneracon*, os pacientes são, ao mesmo tempo, o doador e o receptor destes micro enxertos. Atualmente o principal campo de aplicações do protocolo *regenera* são cirurgia oromaxilo-facial e dermatologia. Para este propósito que recentemente demonstrou a eficácia do dispositivo *rigeneracon* na obtenção de células progenitoras de células da poupa dentária e tecido adiposo recuperado a partir do descarte de corte folicular (TROVATO, 2015).

A qualidade e quantidade de osso regenerado formado por células tronco da polpa dentária foi demonstrada *in vitro* e em experiências *in vivo* utilizando células-tronco e biomateriais (D'AQUINO et al., 2007; GRAZIANO et al., 2008). Assim, polpa dentária pode ser considerada como uma fonte interessante e potencialmente importante de células-tronco autólogas / células progenitoras que estão prontas para utilização para fins terapêuticos, tais como a reparação/ regeneração de ossos craniofaciais (GIACCONE et al., 2014).

O protocolo estabelecido pelo sistema *Rigenera* para tratamento de feridas cirúrgicas consiste em quatro passos: (i) recolha de uma pequena amostra de tecido da pele de 1 cm a partir de um local doador distante no que diz respeito ao local receptor, (ii) a desagregação de tecido através do dispositivo *rigeneracon* por meio da adição de 1 mL de solução salina estéril solução, (iii) coleta de micro-enxerto autólogo obtido após a desagregação e (iv) a injeção destes micro-enxertos sozinho no local da lesão por infiltrações ou perilesional em combinação com andaimes incorporados com micro-enxertos (MARCARELLI et al., 2016).

3-OBJETIVOS

3.1- GERAL

Avaliar a eficácia do sistema Rigeneracon® no processo de regeneração óssea em calvária de ratos.

3.2- ESPECÍFICOS

- -Avaliar métodos de obtenção e processamento de células-tronco mesenquimais à partir da cartilagem xifóide de ratos;
- -Estudar a eficácia do sistema Rigeneracon® para o isolamento de células-tronco mesenquimais;
- -Avaliar histologicamente através de análise histoquímica o processo de reparo de defeitos na calvária de ratos após micro-enxertos de cartilagem xifoide obtidos a partir do Rigeneracon® ;
- Analisar o processo de densitometria óssea em calvária de ratos após tratamento com o sistema Rigeneracon® e a biomembrana a base de quitosana;
- Avaliar histologicamente através de análise histoquímica o processo de reparo de defeitos na calvária de ratos após implante com biomembrana porosa a base de quitosana.

REFERÊNCIAS

ABREU, F. et al.; Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. *Polímeros*, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.

ALVES, E.G.L. et al.; Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Veterinary Research* 2014, 10:190.

AL-NBAHEEN, M. et al.; Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Rev Rep*. 2013;9(1):32-43.

ANDIA DC, CERRI PS, SPOLIDORIO LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos; *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006; 35(2): 191-98.

ANDERSON, B.W., BURNS B.; Anatomy, Thorax, Xiphoid Process. [Updated 2018 Dec 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 Jan-

ARNHOLD, S.; WENISCH, S.; Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *Am J Stem Cells* 2015; 4(1):1-12.

ARVIDSON, K., ABDALLAH, B.M., APLEGATE, L.A., BALDINI, N., CENNI, E., GOMEZ-BARRENA E., GRANCH, D., KASSEM M., KONTTINEN Y. T., MUSTAFA K., PIOLETTI D. P., SILLAT, T., FINNE-WISTRAND, A.; Bone regeneration and stem cells; *J. Cell. Mol. Med.* Vol 15, No 4, 2011 pp. 718-746.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros*, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.

BAENA, R.R.; D'AQUINO, R.; TROVATO, L.; Human Tissue Regeneration in Maxillo-facial Area: From Stem Cells to Micrografts. *Current Tissue Engineering*, V. 4, N.1, 2015.

BANG, O.Y, LEE, J.S., LEE, P.H., Lee, G. (2005) Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57:874–882.

BAVARESCO CS, GROSSMANN TK, REHM DS, GROSSMANN E. Efeito de células-tronco mesenquimais na regeneração das estruturas associadas à articulação temporomandibular: revisão narrativa. *BrJP*. São Paulo, 2020 jul-set;3(3):275-9.

BERTOLO, A., et al.; Comparative Characterization of Canine and Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow. *Int J Stem Cell Res*, 2015. Ther 2:005.

BOSCH C.; MELSEN B.; VARGERVIK K. Guid bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *Cleft Palate Craniofac J.* v. 32, n. 4, p. 311-317, 1995.

BRUNELLI G, MOTRONI A, GRAZIANO A, D'AQUINO R, ZOLLINO I, CARINCI F. Sinus lift tissue engineering using autologous pulp micro-grafts: A case report of bone density evaluation. *J Indian Soc Periodontol.* 2013;17(5):644–647.

BYDLOWSKI, S.P., DEBES, A.A., Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, 2009.

CHAGASTELLES, P.C., NARDI, N.B.; Biology of stem cells: an overview. *Kidney inter.*, v. 1, p. 63–67, 2011.

Chatzipetros et al. Application of nano-hydroxyapatite/ chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 23, n. 5, p. 625-632, 2018.

D'AQUINO R, GRAZIANO A, SAMPAOLESI M, LAINO G, PIROZZI G, DE ROSA A, et al. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ.* 2007; 14: 1162-1171.

DIMITRIOU et al.; Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 2011. <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/9/66>.

EID, S., IWANAGA, J., OSKOUJIAN, R.J.; Bifid Xiphoid Process: Case Report and Review. *Cureus* 10(8): e3153. DOI 10.7759/cureus.3153 (2018).

FILHO, S.T.L.P. et al.; Células-tronco mesenquimais adultas: características e Aplicações experimentais em animais. *Vet. e Zootec.* 2013; 20 (Edição Comemorativa): 49-59.

GARFINKLE, J., MELANÇON, D., CORTES, M., TAMPIERI, D.; Imaging pattern of calvarial lesions in adults. *Skeletal Radiol*, v. 40, p. 1261–1273, 2011.

GEORGOPOULOU et al. Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 29, n. 5, p. 1-14, 2018.

GHANBARI, H., VAKILI-GHARTAVOL, R.; Bone Regeneration: Current Status and Future Prospects. *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, 2016.

GIACCONE, M. et al.; A New Medical Device, Based on Rigenera Protocol, in the Management of Complex Wounds. *J Stem Cells Res, Rev & Rep.* 2014;1 (3):3.

GOMEZ, C.K., SCHIFFMAN, S.R., BHATT, A.A.; Radiological review of skull lesions. *Insights into Imaging* (2018) 9:857–882.

GRAZIANO, A. d'Aquino, R.; LAINO, G.; PROTO, A.; GIULIANO, M.T. PIROZZI, G. et al.; Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell Prolif.* 2008; 41: 1-11.

HENKEL, J. et al.; Bone Regeneration Based on Tissue Engineering Conceptions – A 21st Century Perspective. *Bone Research* (2013) 3: 216-248.

LOPES, J R; OLIVEIRA, J A C; ESTEVES, A A. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE PÓS DE HIDROXIAPATITA [CA₁₀(PO₄)₆(OH)₂] OBTIDAS A PARTIR DO PROCESSO SOL-GEL. *FOCO*, v. 6, n. 8, p. 55-72, 2015.

MITRA et al.; Imaging of focal calvarial lesions. *Clinical radiology*, p. 389-398, 2016.

JESUS, A.A., SOARES, M.B.P.; Coleta e cultura de células-tronco obtidas da polpa de dentes decíduos: técnica e relato de caso clínico. *Dental Press J Orthod*, 2011.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. *Histologia básica*. 13ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2017, 568 p.

KANG, B.J., RYU, H.H.; Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *J. Vet. Sci*, 2012.

KANG, J.W., KANK, K.S.; Soluble Factors–Mediated Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue–Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells and development*, 2008.

KISIEL, A. H. et al.; Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research*, 2012.

Kjalarsdóttir et al. (2019); Bone remodeling effect of a chitosan and calcium phosphate-based composite. *Regenerative Biomaterials*, 241–247.

LACHKAR, S., IWANAGA, J., TUBBS, R.S.; An elongated dorsally curved xiphoid process. *Anatomy Cell Biology*, 2019; 52:102-104.

MAITI, S.K., SHIVA KUMAR, M.U., SRIVASTAVA, L. NINU, A.R., KUMAR, N.; Isolation, Proliferation and Morphological Characteristics of Bone-Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (BM-MS) from Different Animal Species. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 27(1), 29-35 (2013).

MARCARELLI, M. et al.; Rigenera protocol in the treatment of surgical wound Dehiscence. *International Wound Journal*, 2016.

MARTIN, V., BETTENCOURT, A.; Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties *Materials Science and Engineering* (2018) 363–371.

MARTINI, L., FINI, M., GIAVARESI, G., GIARDINO, R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comp Med* (2001) 51: 292-299.

MASHRIQI, F., D'ANTONI, A.V., TUBBS, R. Xiphoid Process Variations: A Review with an Extremely Unusual Case Report. *Cureus* (2017) 9 (8): e1613.

MATASSI, F., NISTRÌ, L., PAES, D.C., INNOCENTI, M.; New biomaterials for bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2011; 8(1): 21-24.

MONTEIRO, B.S. et al.; Células-tronco mesenquimais. *Ciência Rural*, Santa Maria, Online. ISSN 0103-8478. 2010.

NAM, S., CHO, W., CHO, H., LEE, J., LEE, E., SON, Y.; Xiphoid Process-derived chondrocytes: a novel cell source for elastic cartilage regeneration. *Stem cells translational medicine* 2014; 3:1381–1391.

NEUPANE, M. et al.; Isolation and Characterization of Canine Adipose–Derived Mesenchymal Stem Cells. *TISSUE ENGINEERING: Part A* Volume 14, Number 6, 2008.

NÖTH, U., STEINERT, A.F., TUAN, R.S.; Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(7):371–380.

Paretsis N.F., Arana-Chavez V.E., Correa L., Peplis A.M.G., Martins V.C.A., Cortopassi S.R.G. & Zoppa A.L.V. Histological and histomorphometric evaluation of bone regeneration with biomaterial in the tibia of sheep. *Pesq. Vet. Bras.* 37(12):1537-1544, dezembro 2017.

Porto GG et al.; Is a 5 mm rat calvarium defect really critical. *Acta Cirúrgica Brasileira* - Vol. 27 (11) 2012 – 757.

Rolim, A. E. H.; Carvalho, F. A. A.; Costa, R. C. C.; Rosa F. P. Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo. *Rev. Virtual Quim.*, 2018, 10 (2), 211-228. Data de publicação na Web: 17 de abril de 2018.

Rosendo RA, Andrade AA, Figueiredo ABM, Tavares AHS, Castro DLSS, Siqueira RR, Santos A, Medeiros MF, Penha ES, Medeiros LADM. Estruturas de quitosana utilizadas para regeneração óssea in vivo: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, e891974538, 2020.

Roseti L et al.; Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering C* 78 (2017) 1246–1262.

Sinha, V. R.; Singla, A. K.; Wadhawan, S.; Kaushik, R.; Kumria, R.; Bansal, K.; Dhawan, S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int. J. Pharm.*, v. 274, n. 1, p.1-33, 2004.

Spicer et al.; Evaluation of Bone Regeneration Using the Rat Critical Size Calvarial Defect. *Nat Protocol*. 2012 October; 7 (10): 1918–1929. doi:10.1038/nprot.2012.113.

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res*. 2005;40:287-93.

TROVATO, L.; MONTI, M.; DEL FANTE, C.; CERVIO, M.; LAMPINEN, M.; AMBROSIO, L.; RED, C.A.; PEROTTI, C.; KANKURI, E.; AMBROSIO, A.; RODRIGUEZ Y BAENA, A.; PIROZZI, G.; GRAZIANO, A. A new medical device *Rigeneracons* allows to obtain viable micro-grafts from mechanical disaggregation of human tissues. *Journal of Cellular Physiology*. This article is protected by copyright. All rights reserved. DOI 10.1002/jcp.24973. 2015.

TURNBULL, G., CLARKE, J., PICARD, F., RICHES, P., JIA, L., HAN, F., LI, B., SHU, W.; 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials* 3 (2018) 278 e 314.

WINKLER, T., SASS, A., DUDA, G. N. SCHMIDT-BLEEK K.; A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering. *Bone Joint Research* 2018;7: 232–243.

WYLES, C.C. et al.; Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2015;8 117–124.

ZANZOTTERA, F., LAVEZZARI, E., TROVATO, L., ICARDI, A. AND GRAZIANO, A. Adipose Derived Stem Cells and Growth Factors Applied on Hair Transplantation. Follow-Up of Clinical Outcome. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, 4, 268-274, 2014.

Zhang et al.; Advanced smart biomaterials and constructs for hard tissue engineering and regeneration. *Bone Research* (2018).

CAPÍTULO II

Avaliação da eficácia do sistema *rigeneracon* no tratamento de lesões de calvária em ratos

[Evaluation of the efficacy of the rigeneracon system in the treatment
of calvary injuries in rats]

F.C.S. Lima¹, M.W. Teixeira², V.A. Silva Júnior², A.B.B. Costa³,
V.C. Lima³, H.C.V. Souza¹, M.E.G. Barros², A. Graziano⁴,
F. Naro⁵, A.F. Soares^{2*}

¹Aluno de pós-graduação - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

²Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE - Recife, PE

³Aluno de graduação - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, PE

⁴Human Brain Wave - Turin, Italy

⁵Sapienza University of Rome - Rome, Italy

RESUMO

Defeitos ósseos constituem um problema de saúde global. O sistema *Rigenera* permite a extração de microenxertos ricos em células-tronco mesenquimais (CTMs). Objetivou-se avaliar o processo de regeneração óssea por enxertos obtidos pelo sistema *Rigenera* em defeitos críticos na calvária de ratos. Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos, pesando 285±29g, distribuídos em três grupos (n=6), sendo cada animal controle de si mesmo, denominados G15-Controle e G15-Tratado (15 dias); G30-Controle e G30-Tratado (30 dias) e G60-Controle e G60-Tratado (60 dias). Foram realizadas duas lesões de 5mm de diâmetro em cada antímero da calvária. Nos grupos tratados, foram utilizados microenxertos autólogos de cartilagem xifoide, obtidos pelo sistema *Rigenera*. O defeito contralateral serviu como controle em todos os animais. Os animais foram eutanasiados

Recebido em 30 de setembro de 2019

Aceito em 22 de junho de 2020

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: anisiofsoares@gmail.com

aos 15, 30 e 60 dias após a cirurgia, e as amostras foram processadas para a histoquímica. Nos grupos controle, não foram observados sinais de regeneração óssea, enquanto nos grupos tratamento foram verificadas áreas de formação óssea e tecido mesenquimal ativado. O sistema *Rigenera* foi eficiente na obtenção de microenxertos autólogos, para terapia celular em defeito crítico de calvária de ratos. Com o aprimoramento do protocolo, o sistema *Rigenera* poderá ser amplamente utilizado no tratamento de lesões ósseas.

Palavras-chave: lesão óssea, defeito crítico, regeneração, tratamento, células-tronco

ABSTRACT

Bone defects are a global health problem. The Rigenera system allows the extraction of micro grafts rich in mesenchymal stem cells (MSCs). The objective of this study was to evaluate the bone regeneration process by grafts obtained by the Rigenera system in defects in the rats calvarian. Eighteen male Wistar rats were used, weighing $285 \pm 29g$, distributed in three groups ($n = 6$), where each animal was treatment and control, called G15-Control and G15-Treated (15 days); G30-Control and G30-Treated (30 days) and G60-Control and G60-Treated (60 days). Two 5mm diameter lesions were performed on each calvaria side. In the treated groups, autologous micrograft from xiphoid cartilage, obtained by the Rigenera system, were used. The other defect served as a control in all animals. The animals were euthanized at 15, 30 and 60 days after the surgery and the samples were processed for histochemistry. In the control groups, no signs of bone regeneration were observed, while in the treatment groups, areas of bone formation and activated mesenchymal tissue were verified. The Rigenera system was efficient in obtaining autologous micrograft for cell therapy in a critical calvaria defect in rats. Rigenera system can be widely used in the treatment of bone injuries.

Keywords: bone injury, critical defect, regeneration, treatment, stem cells

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado (Martin e Bettencourt, 2018), que tem a capacidade de remodelar e se regenerar (Matassi *et al.*, 2011). A capacidade de regeneração óssea

espontânea há muito tempo é observada e apreciada devido à relação direta entre sua estrutura e função, o que pode permitir a recuperação do tecido ósseo, sendo, porém, essa característica limitada (Walmsley *et al.*, 2016). Defeitos ósseos

craniofaciais associados a trauma ou patologias ósseas, levando à não união da fratura, representam um problema clínico significativo (He *et al.* 2014) e constituem um desafio cirúrgico devido à delicada e complexa anatomia do esqueleto craniofacial. Autoenxertos, aloenxertos e substitutos ósseos sintéticos têm sido usados com sucesso variável, cada um com desvantagens distintas que limitam sua aplicação clínica (Stephan *et al.*, 2010).

A terapia celular, por meio de células-tronco mesenquimais (CTMs), oferece uma opção promissora na recuperação de diversos tecidos, incluindo o ósseo. Diversos fatores, como métodos de isolamento celular, tipo de superfície da cultura, meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos, afetam não somente a expansão e as propriedades imunogênicas das CTMs, mas também a sua diferenciação Bydlowski, *et al.* (2009).

O sistema *Rigenera* é um desagregador de tecidos biológicos, com base em um protocolo preestabelecido, que possibilita a extração de microenxertos de 50µm de uma amostra de tecido conjuntivo autólogo durante a cirurgia, permitindo seu uso imediato sem qualquer manipulação ou cultura de células. Testes *in vitro*, utilizando a composição de microenxertos, demonstraram alta concentração de células viáveis presentes nesses enxertos, notadamente ricas em

células progenitoras Trovato *et al.* (2015). Implantação de CTMs tem o potencial de melhorar a reparação do osso danificado He *et al.* (2014), portanto a utilização do sistema *Rigenera* poderá trazer um novo momento nesses procedimentos, permitindo que os pacientes sejam, ao mesmo tempo, doador e receptor das CTMs Trovato *et al.* (2015). Tendo em vista a importância dos estudos de reparação óssea, este estudo teve como objetivo avaliar o processo de regeneração óssea em defeitos críticos, em calvária de ratos, quando se utiliza microenxertos obtidos por meio do sistema *Rigenera*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 ratos Wistar, machos (*Rattus norvegicus, albinus*) com peso entre 285±29g, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantidos em ambiente com temperatura ambiente de 22°C±5°C, com ciclos alternados de claro-escuro de 12 horas, em regime de alimentação *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRPE, sob a licença nº 099/2019. Os animais foram distribuídos em três grupos (n=6 em cada), e cada animal foi controle dele mesmo (antímero direito Controle, antímero esquerdo Tratado), sendo denominados G15-C e G15-T (animais eutanasiados após 15 dias do tratamento); G30-C e G30-T

(animais eutanasiados após 30 dias do tratamento) e G60-C e G60-T (animais eutanasiados após 60 dias do tratamento).

Antes da anestesia, os animais receberam aplicação subcutânea (SC) de meloxicam e enrofloxacin, na dose de 2mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico, tendo sido administrada morfina, na dose de 4mg/kg, como medicação pré-anestésica, por via SC, no momento zero, seguido por anestesia geral inalatória via máscara, obtida por mistura de gases *contendo* concentrações de isoflurano diluído em oxigênio (250mL/kg/minuto) e administrado utilizando-se circuito anestésico avalvular, dotado de vaporizador universal em concentração suficiente para manutenção de plano anestésico adequado. A avaliação dos planos anestésicos foi realizada por meio do reflexo postural, tônus da mandíbula, reflexo palpebral e pinçamento da cauda.

Foi realizado um procedimento cirúrgico com o objetivo de realizar a extração da cartilagem xifoide. Com o animal posicionado em decúbito dorsal e após cuidados de antissepsia e colocação de campos cirúrgicos estéreis, procedeu-se à incisão de pele e subcutâneo, de aproximadamente 0,5cm, com lâmina de bisturi nº 11, imediatamente sobre o processo xifoide. A musculatura foi incidida com tesoura metzembaum, expondo a cartilagem da qual foi retirado um fragmento de 0,5x0,5cm. Após retirada do fragmento de cartilagem, foi procedida a sutura da musculatura e subcutâneo com fio poliglactina 910 (4-0) em padrão de sutura isolado simples e dermorráfia com fio de *nylon* 5-0 no mesmo padrão. O material obtido foi colocado em dispositivo de desagregação denominado *rigenerecon* (o qual é componente do sistema *Rigenera*), sendo adicionado 1mL de salina estéril a 0,9% e processado durante cinco minutos no sistema *Rigenera*, resultando numa solução pastosa turva (Fig. 1- A, B e C).

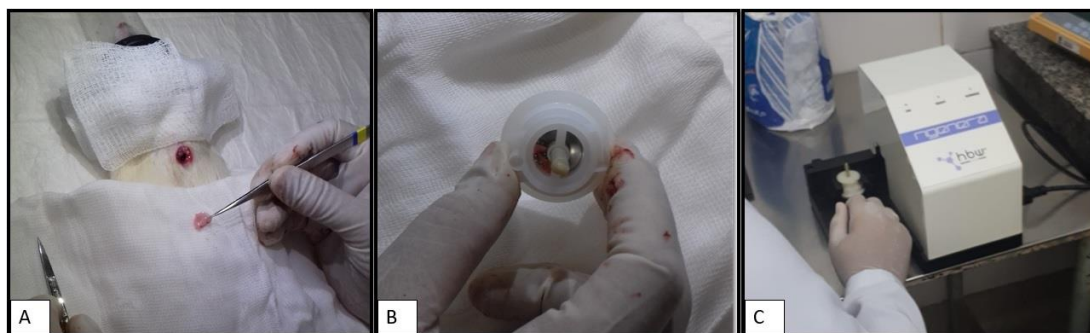


Figura 1. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: coleta da

cartilagem xifoide; B: cartilagem inserida no dispositivo *rigeneracon* com solução salina estéril a 0,9%; C: sistema *Rigenera* para processamento da cartilagem xifoide e obtenção de microenxertos, mantido sob rotação constante durante cinco minutos.

Estando o animal em decúbito esternal, com a cabeça apoiada em almofadas de posicionamento, foi procedida uma incisão de 1,5cm craniocaudal, desde um ponto médio entre os olhos até um ponto médio entre as orelhas. Após a incisão da pele e subcutâneo na região da calvária, foram feitos dois defeitos circulares equidistantes no osso parietal, com uma broca trefina de 5mm, em motor de rotação controlada. Durante a realização dos defeitos, foi procedida a irrigação do local com solução salina para evitar aquecimento excessivo do osso. Em seguida, com uma seringa, foi administrada, na lesão do antimerro esquerdo, a solução obtida da cartilagem

xifoide, em quantidade suficiente para preencher o defeito sem extravasamento da solução. Na lesão contralateral, foi utilizado mesmo volume de salina estéril a 0,9% (Fig. 2 - A, B, C). Após dois minutos deste procedimento, a lesão foi suturada, sendo primeiro fechado o subcutâneo com fio poliglactina 910 (4-0), seguido por dermorráfia com fio de *nylon* 5-0), ambos em padrão isolado simples. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério e tratados com morfina na dose de 4mg/kg, por via subcutânea, a cada 12 horas, durante três dias, e 100mg de enrofloxacina por litro de água nos bebedouros, durante cinco dias (Fig. 3 - A, B, C).

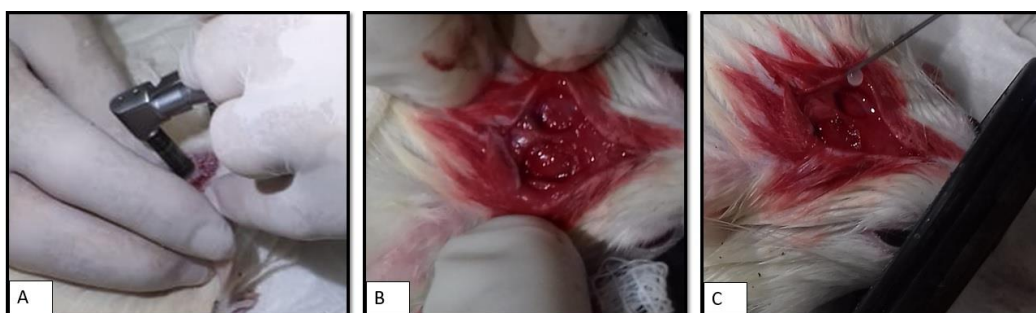


Figura 2. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: realização de defeito ósseo crítico por meio de broca trefina rotativa de 5mm de diâmetro; B: aspecto do defeito crítico nos ossos parietais, lado direito – Controle, lado esquerdo – Tratamento com sistema *Rigenera*; C: administração da cartilagem xifoide processada no sistema *Rigenera* na lesão crítica da calvária do rato.

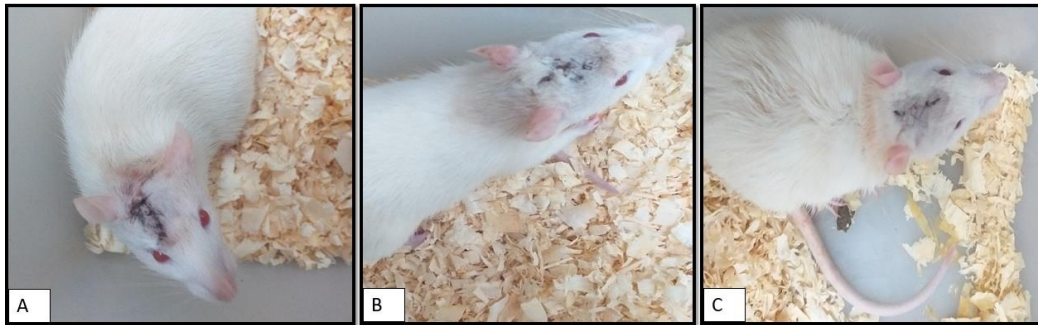


Figura 3. Aspecto da recuperação da ferida cirúrgica de ratos Wistar, após procedimento em calvária e tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: Após cinco dias ; B: após 10 dias; C: após 15 dias.

Foi realizada avaliação dos animais diariamente no mesmo horário, observando-se parâmetros fisiológicos, comportamentais, além da ingesta líquida e sólida nas últimas 24 horas, conformação dos pelos, respiração e postura do animal (Flecknell e Thomas, 2017). O monitoramento das feridas cirúrgicas e de sua evolução na recuperação foi realizado diariamente; era realizado ainda a avaliação da dor ou do desconforto nos animais (Flecknell, 2009).

Nos momentos 15, 30 e 60 dias pós-tratamento, os animais foram eutanasiados, para a obtenção da amostra de tecido ósseo para estudos morfológicos, seguindo normas propostas pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). As amostras dos ossos na região da calvária do animal foram seccionadas numa figura quadrangular e, posteriormente, imersas por 48 horas em formol a 10%, seguida de imersão em solução descalcificadora (ácido nítrico a 10%) durante 72 horas, e

subsequentemente em álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram processadas por meio da secção central longitudinal das lesões, posicionadas nos moldes, e estes preenchidos por parafina, formando blocos, os quais foram submetidos a cortes micrométricos seriados na espessura de 5 μ m; submetidos à coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gommory para histoquímica. As imagens foram capturadas por meio do microscópio Leica ICC 50W. Os cortes histológicos foram analisados a fim de se avaliar o processo de regeneração óssea em calvária, bem como sua estrutura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao exame clínico diário, os animais não apresentaram alterações comportamentais que descaracterizassem seu estado de bem-estar geral, calma aparente na gaiola, com ingesta líquida e sólida compatível para a idade e a

espécie, ausência de pelos eriçados, respiração e postura fisiológicos para a espécie. As feridas cirúrgicas se apresentaram limpas, sem exsudatos, suturas conservadas e com leve edema na região, característico para as primeiras 24 horas. As observações diárias permitiram acompanhar a rápida e eficiente cicatrização, suturas mantidas intactas até o sexto dia, seguida aqui de expulsão natural pelo organismo até o 15º dia. Foi observada ausência de dor ou de desconforto em todo o período de monitoramento dos animais.

Nos cortes histológicos do G15-C, foi observado que o tecido ósseo e a membrana conjuntiva da lesão não apresentavam sinais de regeneração

óssea, além de possuir uma grande diversidade de tecido na extremidade, o que provavelmente, dificulta o processo de reestruturação (Fig. 4-A). Houve deposição de colágeno, osteócitos e osteoblastos e a formação óssea que vêm da membrana conjuntiva (Fig. 4-B). Observa-se também vaso neoformado na membrana conjuntiva, formando ilhotas em diferentes pontos de tecido conjuntivo que se fusionam, porém existem áreas nessas ilhotas que estão avascularizadas, indicando que poderão passar por um processo de remodelação (Fig. 4-C). Já nas amostras do G15-T, foi observado um curto espaço entre as duas extremidades, com membrana conjuntiva muito tênue e abaixo dela tecido adiposo (Fig. 4-D).

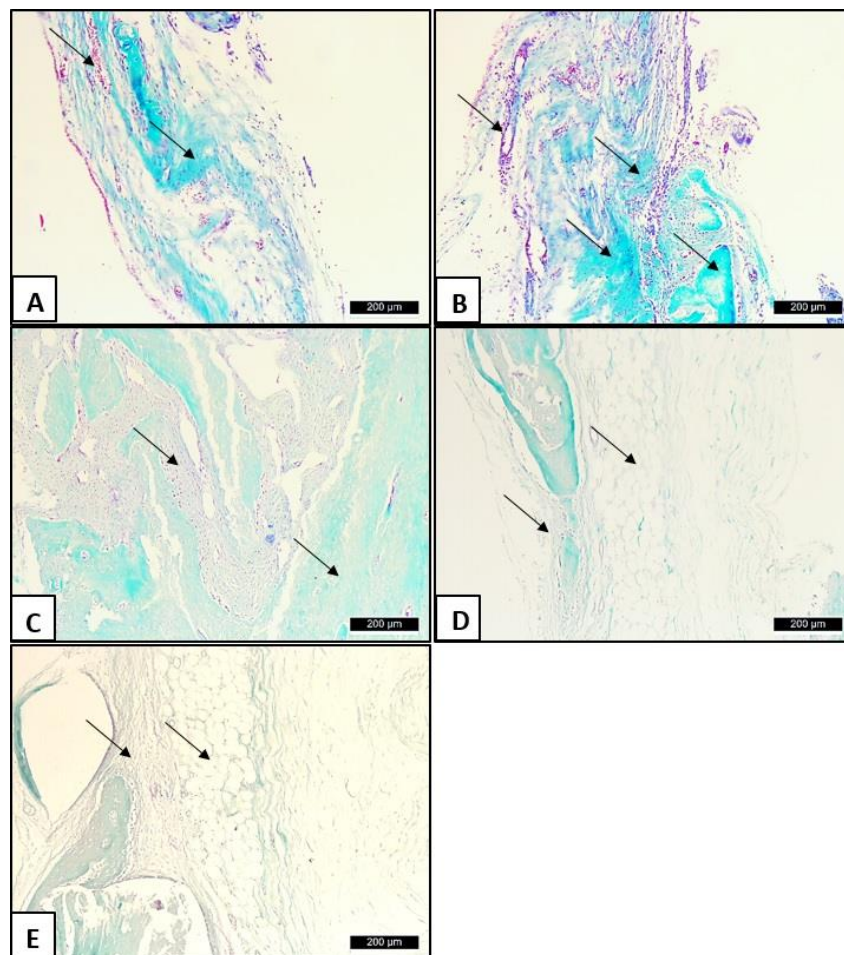


Figura 4. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G15-C) e Tratado (G15-T) após 15 dias do tratamento com cartilagem xifoide. Tricrômico de Gomori. Figura A: G15-C, tecido ósseo e osteoblastos. Figura B: G15-C, deposição de colágeno, osteócitos e osteoblastos. Figura C: G15-C, ilhotas em diferentes pontos. Figura D: G15-T, membrana conjuntiva. Figura E: G15-T, área de formação óssea, Ilhotas de tecido ósseo circundado por membrana conjuntiva ossificante, com osteoblasto.

Existem áreas de formação óssea, além de possuir um tecido mesenquimal bem ativado (Fig. 4-E). Oryan *et al.* (2018), relatam que células, em especial as células-tronco mesenquimais e células progenitoras, são os outros componentes chave da engenharia de tecidos que têm a capacidade de acelerar o processo de cicatrização óssea de defeitos de tamanho

crítico. A diferenciação de CTMs em células precursoras ósseas é um objetivo importante em engenharia de tecidos ósseos, a fim de regenerar com sucesso os defeitos de tamanho crítico *in vivo*, sem a necessidade de fatores promotores de crescimento. Durante o processo natural de cicatrização óssea, as CTMs são

recrutadas para o local do defeito e diferenciadas para formar osso novo.

O presente trabalho evidenciou a presença de ilhotas de tecido ósseo circundado por membrana conjuntiva ossificante, com osteoblasto. Esses achados *in vivo* corroboram com as concepções de Birmingham *et al.* (2012), onde os mesmos apuraram em seus experimentos que, embora o efeito regulatório dos osteoblastos seja menor que o dos osteócitos, os osteoblastos também são capazes, de acordo com o tempo, de estimular a osteogênese nas CTMs. Em estudos realizados por Steinbrech *et al.* (2000) identificaram os osteoblastos como importantes mediadores desse processo, por exemplo, o fator de crescimento vascular (FCV), um potente peptídeo angiogênico de ação direta, é altamente expresso por células osteoblásticas *in vitro*.

Na análise histológica dos animais do G30-C, foi possível observar lâmina e projeção de tecido ósseo, além de osso

compacto originando-se de membrana conjuntiva (Fig. 5-A). O processo de ossificação detectado nesta fase foi intramembranosa (Fig. 5-B), ou seja, primeiro ocorreu à formação da membrana conjuntiva para posterior ossificação. Foi notada a presença de osteoblastos, além de membrana conjuntiva com bastante colágeno fibroso, um tecido fibroso altamente vascularizado e osso se formando na extremidade oposta (Fig. 5-C). Abdullah (2016) observou que as lesões de calvária podem ser utilizadas como um modelo para formação óssea intramembranosa, corroborando os presentes achados. Em adição, é verificado que a estrutura óssea das bordas da lesão está distante do osso que está se formando, certificando que não houve fechamento total e o tecido ósseo está surgindo a partir da membrana conjuntiva.

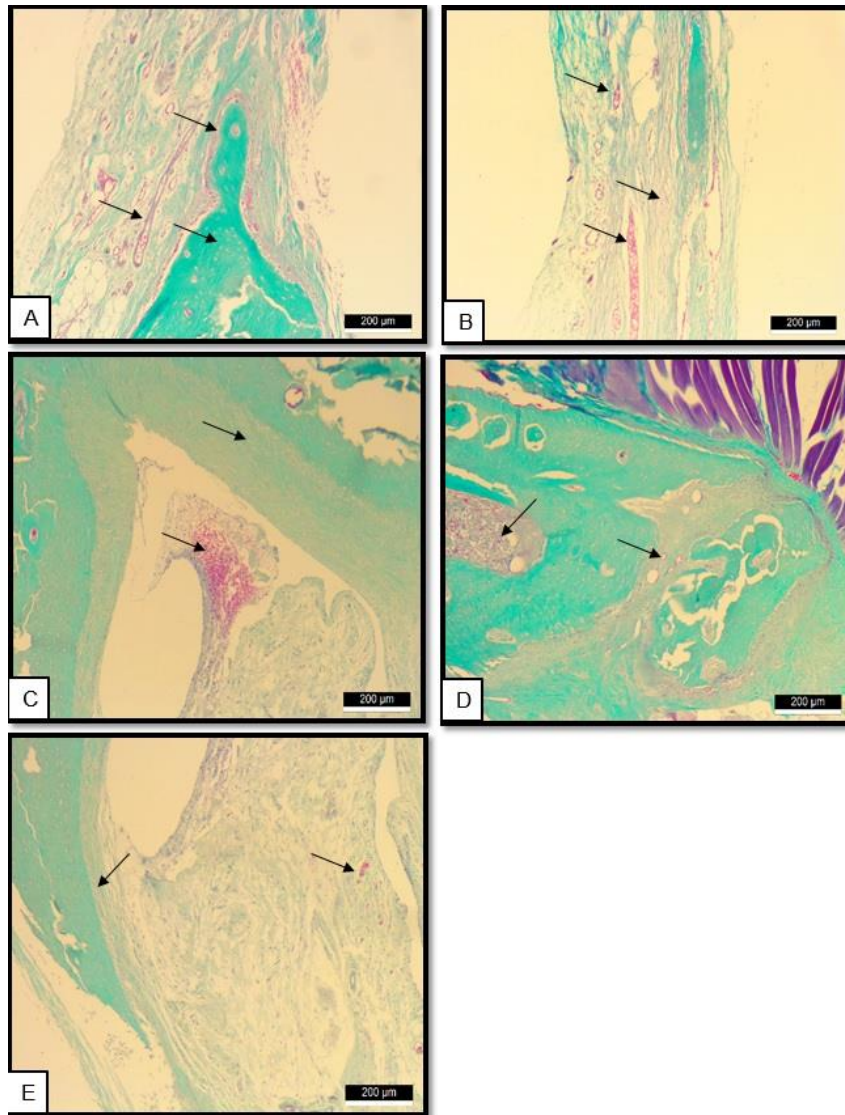


Figura 5. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G30-C) e Tratado (G30-T) após 30 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G30-C, projeção de tecido ósseo e osso compacto se formando. Figura B: G30-C, ossificação intramembranosa. Figura C: G30-C, membrana conjuntiva com bastante colágeno fibroso. Figura D: G30-T, ossificação endocondral. Figura E: G30-T, extremidades distantes, mostrando que não houve fechamento.

Na calvária dos animais do G30-T, foi visto que existe pouca quantidade de membrana conjuntiva e fibrocartilagem no tecido ósseo. É possível verificar que existem três estruturas de tecido

conjuntivo em estado de regeneração mais avançado. O tecido compacto está se formando e reconstituindo, mas a díploe não está perfeita. Em alguns campos, é observada também a presença de

membrana conjuntiva com fibroblastos e fibrocartilagem. Há uma área de tecido ósseo revestida por fibrocartilagem; isto demonstra que o enxerto submetido através do sistema *Rigenera* influenciou no processo de regeneração óssea. Nota-se a existência de membrana conjuntiva que está dando origem a várias estruturas ósseas e sendo revestida por um perióstio.

Ficou evidenciado que aos 30 dias a lesão não regenerou completamente, mas mostra que o sistema *Rigenera* dá origem a membrana conjuntiva e essa membrana é multipotente, pois originará tecido mesenquimal indiferenciado com muito fibroblasto ativo, dando origem a um tecido rico em colágeno bem vascularizado, tecido fibroso e osteoblastos. O osso não se forma de maneira regular onde é possível visualizar vários ósteons. Essas informações são também suportadas por Jin-Young *et al.* (2013) sugerem que as CTMs são células-semeadas ideais para a formação óssea. Neste trabalho pode-se inferir ainda que o G30-T tem uma menor área de membrana conjuntiva, a ossificação é endocondral (Fig. 5-D), entretanto observa-se ilhas de tecido ósseo se formando cercado por membrana conjuntiva com diferenciação osteoblástica e/ou diferenciação de cartilagem fibrosa.

É observado membrana próxima da extremidade óssea e da fibrocartilagem, tecido conjuntivo denso, tecido adiposo

(Fig. 5-E). As células primitivas situadas na membrana proliferam dando origem a células chamadas osteoprogenitoras; estas se mantêm em número através de atividades mitóticas contínuas dando origem a formação de espículas ósseas e da membrana conjuntiva rica em colágeno com muitos fibroblastos, tecido mesenquimal escasso e matriz extracelular. Nos animais do G60-C não houve estimulação; havendo espaço entre as extremidades com membrana conjuntiva pouco diferenciada, maior quantidade de tecido mesenquimal do que colágeno e fibroblasto. Entre as extremidades ósseas é notada uma membrana conjuntiva e, também que este revestimento da estrutura óssea serve como fonte de osteoblastos o que favorece a ossificação intramembranosa (Fig. 6-A).

Nota-se ainda que houve remodelação óssea com formação de díploes afastados das extremidades ósseas, sendo possível observar duas camadas, no entanto, na extremidade, onde ocorreu síntese óssea, o centro não foi remodelado. Há ósteons com típico processo de morte para reabsorção (Fig. 6- B e C). No centro da área é notada uma estrutura mesenquimal de origem externa ou da membrana (perióstio), enquanto próximo a uma das extremidades a ausência de osso díploe. O osso encontra-se em processo de remodelamento, sendo notória a presença de músculo, tecido conjuntivo denso, membrana conjuntiva formando cartilagem fibrosa e osteoblastos em

desenvolvimento. Observa-se também tecido conjuntivo fibroso denso, fibrocartilagem e osteoblastos, extremidades com osso compacto em plena remodelação (Fig. 6- D e E).

Porto *et al.* (2012), afirmam que lesão de 5mm não seja utilizado como um defeito crítico para períodos de avaliação superior a 30 dias nesta espécie. Ao analisar os animais do G60-T, comprovou-se que a ossificação foi toda intramembranosa por ser uma membrana conjuntiva e fonte dos osteoblastos. Enquanto Luby *et al.* (2019) observaram que após 60 dias, o tecido ósseo

preencheu todo o defeito após o implante de CTM-TA (tecido adiposo) ou CTM-MO (medula óssea). Além disso, não houve diferença na maturação óssea quando CTM-TA ou CTM-MO foram implantados. Os resultados demonstram a importância e eficiência do sistema *Rigenera* como desagregador celular antes da utilização de enxertos para regeneração óssea em lesão crítica na calvária e que os melhores resultados foram observados após 15 dias de realização do enxerto.

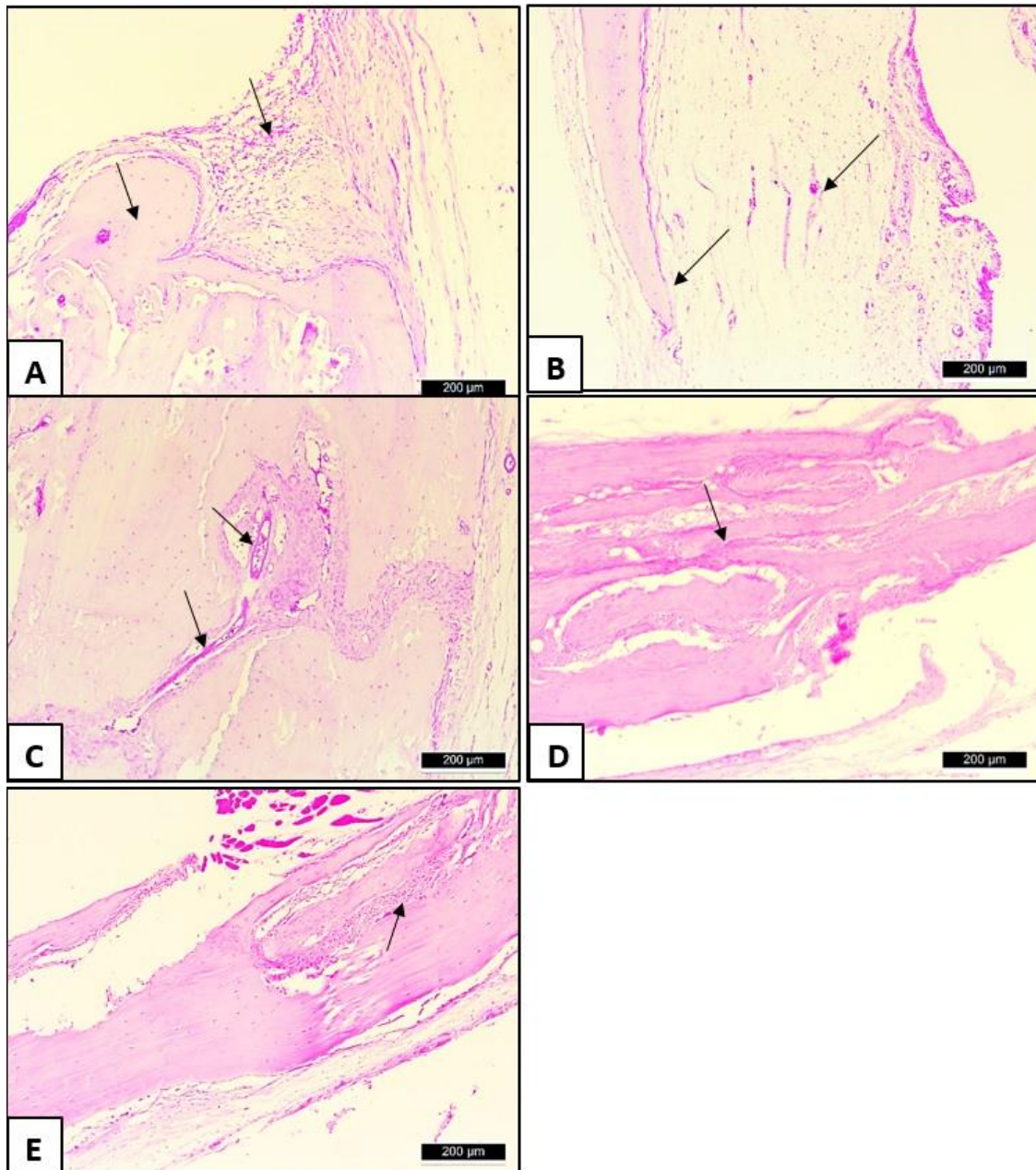


Figura 6: Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G60-C) e *Rigenera* (G60-R) após 60 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G60-C, ossificação intramembranosa. Figura B: G60-C, membrana dando origem a tecido ósseo. Figura C: G60-C, sistema de Havers. Figura D: G60-T, Tecido conjuntivo fibroso denso, fibrocartilagem e osteoblastos. Figura E: G60-T, remodelação acontecendo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso do sistema *Rigenera* contribuiu de forma eficiente na obtenção dos microenxertos autólogos de cartilagem xifoide, para terapia celular em defeito crítico de calvária de ratos, otimizando a regeneração óssea aos 30 dias após o tratamento. Com o aprimoramento do protocolo, o sistema *Rigenera* poderá ser amplamente utilizado no tratamento de lesões ósseas.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, W.A. Evaluation of bone regenerative capacity in rats calvarial bone defect using platelet rich fibrina with and without beta tri calcium phosphate bone graft material. *Saudi Medical J.*, v.28, p.109-117, 2016.
- BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G.L.; MCHUGH, P.E. *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur. Cells Mater.*, v.23, p.13-27, 2012.
- BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASELLI, L.M.F. *et al.* Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*; v.31, Supl.1, p.25-35, 2009.
- FLECKNELL, P. *Laboratory animal anaesthesia*. 3.ed. Oxford: Elsevier / Academic Press, 2009. 322p.
- FLECKNELL, P.A.; THOMAS, A.A. Anestesia e analgesia comparada em animais de laboratório. In: TRANQUILLI, W.J.; THURMON, J.C.; GRIMM, K.A. *Lumb & Jones / anestesiologia e analgesia em veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. 1056p.
- HE, X.; LIU, Y.; YUAN, X.; LU, L. Enhanced healing of rat calvarial defects with MSCs loaded on BMP-2 releasing chitosan/alginate/hydroxyapatite scaffolds. *PLoS One*, v.1, p.e104061, 2014.
- JIN-YOUNG I.M.; WOO-KIE M.I.N.; CHANGKOOK Y.O.U. *et al.* Bone regeneration of mouse critical-sized calvarial defects with human mesenchymal stem cells in scaffold. *Lab. Anim. Res.*, v.29, p.196-203, 2013.
- LUBY, A.O.; RANGANATHAN, K.; LYNN, J.V. *et al.* Stem cells for bone regeneration: current state and future directions. *J. Craniofacial Surg.*, v.30, p.730-735, 2019.
- MARTIN, V.; BETTENCOURT, A. Bone regeneration: biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Mater. Sci. Eng.*, v.1, p.363-371, 2018.
- MATASSI, F.; NISTRINI, L.; PAES, D.C.; INNOCENTI, M. New biomaterials for bone regeneration. *Clin. Cases Miner. Bone Metabol.*, v.8, p.21-24, 2011.
- ORYAN, A.; ESLAMINEJAD, M.B.; KAMALI, A. *et al.* Mesenchymal stem cells seeded onto tissue engineered osteoinductive scaffolds enhance the

healing process of critical-sized radial bone defects in rat. *Cell Tissue Res.*, v.374, p.63-81, 2018.

PORTO, G.G.; VASCONCELOS, B.C.E.; ANDRADE, E.S.S. *et al.* Is a 5 mm rat calvarium defect really critical?. *Acta Cir. Bras.*, v.27, p.753-757, 2012.

STEINBRECH, D.S.; BABAK J.; MEHRARA, P.B. *et al.* VEGF expression in an osteoblast-like cell line is regulated by a hypoxia response mechanism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.278, p.C853-C860, 2000.

STEPHAN, [S.J.](#); [THOLPADY](#), S.S.; [GROSS](#), B. *et al.* Injectable tissue-engineered bone repair of a rat calvarial defect. *Laryngoscope*, v.120, p.895-901, 2010.

TROVATO, L.; MONTI, M.; DEL FANTE, C. *et al.* A new medical device Rigeneracons allows to obtain viable micro-grafts from mechanical disaggregation of human tissues. *J. Cell. Physiol.*, v.230, p.2299-303, 2015.

WALMSLEY, G.G.; RANSOM, R.C.; ZIELINS, E.R. *et al.* Stem cells in bone regeneration. *Stem Cell Rev.*, v.12, p.524-529, 2016

CAPÍTULO III

DISPOSITIVO RIGENERA E BIOMEMBRANA A BASE DE QUITOSANA: ESTUDO DE REGENERAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE RATOS

LIMA, F.C.S^{1*}; TEIXEIRA, M.W.⁴; TEIXEIRA, A.A.C.⁴ COSTA, F.S.²; SILVA,
W.E.⁵; SOUZA, H.C.V.⁴; BARROS, M.E.G.³; JUNIOR, V.A.S.³, NARO, F.⁶,
LIMA, G.G.⁷; SOARES, A.F.⁴;

^{1*} Discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, nível de Doutorado, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Brasil.

² Docente em Bacharelado em Medicina Veterinária- UFRPE.

³ Técnica do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco-DMFA/UFRPE, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical – DMFA/UFRPE, Brasil.

⁵ Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal-DMFA/UFRPE.

⁶ Sapienza University of Rome | la sapienza · Department of Anatomical, Histological, Forensic Medicine and Orthopedic Science.

⁷ Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência dos materiais- PIPE, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

RESUMO

Defeitos ósseos constituem um problema de saúde global. O sistema Rigenera permite a extração de microenxertos ricos em células-tronco mesenquimais (CTMs). Objetivou-se avaliar o processo de regeneração óssea por enxertos obtidos pelo sistema Rigenera e comparando com a biomembrana a base de quitosana com microcelulose fibrilada (MFC) em defeitos críticos na calvária de ratos. Foram utilizados 54 ratos Wistar, machos, pesando 285 ± 29 g, distribuídos em três grupos (n=18), sendo cada animal controle de si mesmo, divididos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo A: Controle e Rigenera; Grupo B: Controle e biomembrana de Quitosana/MFC; Grupo AB: Controle e Rigenera associado com a biomembrana a base de quitosana/MFC (15, 30 e 60 dias, com n=6 cada grupo). Foram realizadas duas lesões de 5mm de diâmetro em cada antímero da calvária. Nos grupos tratados, foram utilizados microenxertos autólogos de cartilagem xifoide obtidos pelo sistema Rigenera (grupo A), biomembrana a base de quitosana/MFC (grupo B) e a associação entre os microenxertos autólogos com a biomembrana (grupo AB). O defeito contralateral serviu como controle em todos os animais. As tomografias computadorizadas foram realizadas usando um scanner GE Hi-Speed FXI CT e, após o processo de varredura, foi feita a reconstrução das imagens em software de visualização DICOM. Os animais foram eutanasiados aos 15, 30 e 60 dias após a cirurgia, e as amostras foram processadas para análise histoquímica. Nas análises de densitometria óssea verificamos que no grupo A foi mais eficiente aos 60 dias, o grupo B aos 15 dias e pouco eficiente com 60 dias e no grupo AB mostraram aumento da densitometria óssea aos 30 e 60 dias. Nos grupos controle, não foram observados sinais de regeneração óssea, enquanto nos grupos tratamento foram verificadas áreas de formação óssea e tecido mesenquimal ativado. O sistema Rigenera foi eficiente na obtenção de microenxertos autólogos, para terapia celular em defeito crítico de calvária de ratos. A biomembrana de quitosana/MFC possuem propriedades osteoindutoras auxiliando no processo de regeneração óssea em calvária de ratos. Com o aprimoramento do protocolo, o sistema Rigenera e a biomembrana a base de quitosana/MFC poderão ser amplamente utilizados no tratamento de lesões ósseas.

Palavras-chave: lesão óssea, defeito crítico, regeneração, tratamento, células-tronco

ABSTRACT

Bone defects are a global health problem. The Rigenera system allows the extraction of micro-grafts rich in mesenchymal stem cells (MSCs). The objective of this study was to evaluate the bone regeneration process using grafts obtained by the Rigenera system and comparing it with the chitosan-based biomembrane with fibrillated microcellulose (MFC) in critical defects in the calvaria of rats. 54 male Wistar rats, weighing $285 \pm 29\text{g}$, were used, distributed in three groups ($n = 18$), each animal being its own control, randomly divided into 3 groups: Group A: Control and Rigenera; Group B: Chitosan / MFC control and biomembrane; Group AB: Control and Rigenera associated with the chitosan-based chitosan / MFC biomembrane (15, 30 and 60 days, with $n = 6$ each group). Two 5mm diameter lesions were performed on each calvaria antimere. In the treated groups, autologous micrografts of xiphoid cartilage obtained by the Rigenera system (group A), chitosan / MFC-based biomembrane (group B) and the association between autologous micrografts and the biomembrane (group AB) were used. The contralateral defect served as a control in all animals. The CT scans were performed using a GE Hi-Speed FXI CT scanner and, after the scanning process, the images were reconstructed using DICOM visualization software. The animals were euthanized at 15, 30 and 60 days after surgery, and the samples were processed for histochemical analysis. In bone densitometry analyzes we found that in group A it was more efficient at 60 days, group B at 15 days and not very efficient at 60 days and in group AB they showed increased bone densometry at 30 and 60 days. In the control groups, no signs of bone regeneration were observed, while in the treatment groups, areas of bone formation and activated mesenchymal tissue were verified. The Rigenera system was efficient in obtaining autologous micrografts, for cell therapy in a critical defect in rat calvaria. The chitosan / MFC biomembrane has osteoinductive properties assisting in the bone regeneration process in rat calvaria. With the improvement of the protocol, the Rigenera system and the chitosan / MFC-based biomembrane may be widely used in the treatment of bone injuries.

Keywords: bone injury, critical defect, regeneration, treatment, stem cells

1. INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos, devido a trauma e a reabsorção óssea patológica e fisiológica, representam um grande desafio e constituem um problema de saúde global. A necessidade de regeneração óssea em cirurgias cranianas, orais, maxilo-faciais e ortopédicas é uma das questões clínicas centrais na medicina regenerativa e de reabilitação (Martin et al., 2018). Ocasionalmente, um defeito

ósseo pode ser formado em ortopedia e traumatologia e, neste caso, o osso não cicatriza e precisa de reconstrução óssea. A reconstrução óssea bem-sucedida requer osteoprodução, osteoindução, osteocondução, estimulação mecânica e vascularização, além de drogas que atuam desempenhando um papel importante no metabolismo e crescimento ósseo (Matassi et al., 2011).

A reconstrução e a regeneração de defeitos esqueléticos significativos surpreenderam a humanidade por milhares de anos (Ghambari et al., 2016). Os substitutos sintéticos do enxerto ósseo, desenvolvidos em um esforço para superar as limitações inerentes ao autoenxerto e aloenxerto, representam uma estratégia alternativa. Os biomateriais são matrizes temporárias para o crescimento ósseo e fornecem um ambiente e uma arquitetura específicos para o desenvolvimento dos tecidos. Além disso, podem ser utilizados como veículo para a administração de medicamentos, como antibióticos, agentes quimioterapêuticos ou fatores de crescimento (Matassi et al. 2011).

A quitosana, comumente encontrada nas conchas de crustáceos marinhos, paredes celulares de fungos e exoesqueleto de artrópodes, é o derivado desacetilado da quitina e apresenta um polissacarídeo linear composto por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina (Georgopoulou et al. 2018). Esta promove osteocondução, capacidade de produzir estruturas porosas e crescimento celular, possuem natureza antibacteriana e reação mínima ao corpo estranho. Além disso, a quitosana possui similaridade estrutural com os glicosaminoglicanos e permite a incorporação de biocerâmicas, como a hidroxiapatita (Chatzipetros et al. 2018).

Estudos *in vitro* sugerem que a quitosana possui propriedades osteogênicas, pois promove a diferenciação de células-tronco em osteoblastos formadores de ossos e promove o crescimento de colônias ósseas. Além disso, sugerem que a quitosana sozinha é suficiente para estimular a osteogênese (Kjalarsdóttir et al. 2019). A biocompatibilidade da quitosana, a biodegradabilidade, as propriedades antimicrobianas, a capacidade de estimular macrófagos, induzir a formação óssea e interagir com moléculas carregadas negativamente, como glicosaminoglicanos (GAGs) e proteoglicanos, são os

principais motivos para explicar por seu amplo uso como substrato de biomaterial (Georgopoulou et al., 2018).

O desagregador de tecidos biológicos *Rigeneracon*, com base no protocolo *Rigenera*, permite a extração de micro enxertos de 50 μm de uma amostra de tecido conjuntivo autólogo diretamente dentro de uma cirurgia e imediatamente utilizado sem qualquer manipulação ou cultura de células. Se colocar na cultura para testar a natureza e a composição de micro enxertos, o último mostra células viáveis dentro deles e a população de células dotadas destes enxertos é particularmente rica em termos de células progenitoras (Trovato et al., 2015).

Tendo em vista a importância dos estudos de regeneração óssea com a quitosana, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o processo de regeneração óssea através do uso de uma biomembrana a base de quitosana/MFC associados ou não com auto enxertos obtidos através do dispositivo *Rigeneracon* em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS

Foram utilizados 54 ratos machos da linhagem *Wistar*, adultos, com peso corporal de $298\pm 30\text{g}$, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA/UFRPE). Os animais foram mantidos em gaiolas com água e alimentação *ad libitum*, sob temperatura ambiente de $22^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12h claro-escuro. O estudo foi realizado seguindo as orientações para o cuidado e uso de animais emanados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com devida aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA/UFRPE) sob a licença de nº 099/2019.

Todo procedimento experimental no animal foi realizado na sala de experimentação do Biotério do DMFA/UFRPE. Os animais foram divididos

aleatoriamente em 3 tratamentos, cada um constituído por 54 animais, e separados de acordo com o tempo do procedimento cirúrgico representados da seguinte forma: Grupo A: Controle e Rigenera; Grupo B: Controle e biomembrana a base de Quitosana/MFC; Grupo AB: Controle e Rigenera associado com a biomembrana a base de quitosana/MFC (15, 30 e 60 dias, com n=6 cada grupo)

2.2. MEDICAÇÃO PRÉ-ANESTÉSICA E ANESTÉSICA

Em cada grupo, após pesados, os animais foram submetidos a um protocolo de medicação pré-anestésica (MPA), adotando-se a administração de morfina na dose de 4 mg/kg, por via subcutânea (SC). Também foram aplicados meloxicam e enrofloxacino, nas doses de 2 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente, também por via SC. Para realização da anestesia, utilizou-se a mistura de gases contendo oxigênio e isoflurano, através de vaporizador universal. A indução anestésica foi realizada através de câmara de indução e manutenção em sistema aberto utilizando máscara para anestesia, de tamanho adequado.

2.3. RETIRADA DA CARTILAGEM XIFOIDE E PROCESSAMENTO NO DISPOSITIVO RIGENERACON

O procedimento cirúrgico sucedeu-se com a extração da cartilagem xifóide, a qual foi acessada pelo tórax (por meio de um corte anteroposterior de aproximadamente 1 cm de comprimento; e a posterior sutura), coletada e processada (conjugada com cerca de 0,5 ml de soro fisiológico, por um período de 5 minutos, pelo sistema de desagregação de tecido biológico *Rigenera*, resultando num material aquoso-pastoso. Após este procedimento, foi realizada uma abertura anteroposterior (aproximadamente 2cm) na região da calvária do animal e, com o uso de uma trefina dentária de 5mm de diâmetro, duas lesões circulares controladas foram feitas no osso parietal. Por conseguinte, com a utilização de uma seringa, a amostra processada no *Rigenera* foi administrada nas cavidades esquerda do animal, enquanto a lesão controle recebeu solução salina.

Após 2 minutos da ministração do composto, a lesão foi fechada e suturada. Logo em seguida, os animais foram colocados isoladamente nas caixas do biotério. Dessa forma, os animais receberam 0,10 mL de morfina subcutaneamente a cada 12 horas, durante três dias; e 100 mg de enrofloxacina por litro de água, que foi adicionada nos bebedouros dos animais, durante 5 dias.

2.4. USO DO FILME DE QUITOSANA COM CELULOSE MICROFIBRILADA

O biomaterial foi suturado com auxílio de um punch de uso veterinário, visando obter a medida das lesões circulares controladas realizadas com a trefina. No grupo em que a quitosana foi utilizada em associação com o material previamente submetido ao *Rigenera*, o mesmo foi embebido no material pastoso resultante do processamento no dispositivo.

2.5. PRODUÇÃO DAS LESÕES NAS CALVÁRIAS

Neste procedimento, foi realizada uma incisão na linha média e espalhamento das camadas da pele, facial e periosteal, sobre a sutura sagital da calvária. Com uma broca trefina dentária rotativa de 5 mm de diâmetro, foram realizadas duas lesões no crânio do animal sendo uma para controle e a outra a receber o material processado do dispositivo, a biomembrana a base de quitosana/MFC ou a associação dos dois. O osso não foi completamente penetrado pela trefina, a fim evitar danos nos tecidos duros e cerebrais subjacentes.

Duas lesões foram realizadas nas calvárias dos animais, sendo os controles representados através de um defeito vazio no lado direito e um que recebeu o enxerto no lado esquerdo. À medida que o defeito se aproximava da espessura apropriada, a porção trefinada do osso era deslocada para baixo com uma ligeira pressão com o auxílio de uma pinça cirúrgica, indicando um corte quase total na calvária. De acordo com Luby et al., (2019) para os modelos de defeitos de calvária, muitos estudos utilizaram um defeito de tamanho crítico bicortical de espessura total nos ossos frontal ou parietal para avaliar o potencial

regenerativo de células-tronco mesenquimais do tecido adiposo e células-tronco mesenquimais da medula óssea.

2.6. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DOS TECIDOS

Aos 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgico, os animais foram eutanasiados através de indução anestésica por CO₂, e após parada cardiorrespiratória, foi realizada perfuração do tórax. As amostras dos ossos na região da calvária do animal foram seccionadas numa moldura quadrangular e, posteriormente, imersas por 48h em formol a 10% e, em seguida, foram descalcificadas (ácido nítrico a 10%) durante três dias e logo depois acondicionadas em álcool 70%. Posteriormente, no Laboratório de Histologia do DMFA/UFRPE, as amostras foram processadas por meio da secção central longitudinal das lesões e posicionadas corretamente nos moldes que, foram preenchidos por parafina para formar os blocos, os quais foram utilizados para os cortes micrométricos seriados na espessura de 5µm; sendo em seguida realizadas as análises histoquímicas. O material foi cortado e submetido às técnicas de coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gomory. Para este procedimento, apenas os grupos A e B foram analisados. As imagens foram capturadas por meio do microscópio Leica ICC 50W.

2.7. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA

As varreduras de tomografia computadorizada (TC) foram realizadas usando um scanner GE Hi-Speed FXI CT (General Electric, Fairfield, CT 06824, EUA), que tinha sido calibrado antes das varreduras. Para este procedimento, os animais foram anestesiados para uma eficiente obtenção de dados. Após o processo de varredura, foi feita a reconstrução das imagens em software de visualização DICOM (OsiriX-64 bits, versão 7.0), cujo as regiões da calvária foram selecionadas. Os valores foram obtidos em unidades Hounsfield para osso trabecular (HUt).

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a avaliação de densitometria óssea dos animais, a estatística foi realizada no GraphPad Prism 8.3.4. utilizando a ANOVA como teste post hoc de Borrefoni ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises tomográficas realizadas nos animais indicaram aumento da densidade óssea nos animais pertencentes ao grupo AB com 30 e 60 dias pós-cirurgia, como mostra a figura 1. Estes achados estão de acordo com dados da literatura que evidenciam as propriedades osteogênicas e regenerativas de microenxertos produzidos pela *Rigenera* devido à presença de células progenitoras (D'Aquino et al., 2016). Biomateriais à base de quitosana também têm sido utilizados em estudos de regeneração de tecido ósseo, uma vez que a quitosana atua como elemento físico scaffold permitindo a migração, adesão e proliferação de células ósseas (Rolim et al., 2018).

Além disso, Spin-Neto et al. (2012), ao avaliar a ação de biomateriais de quitosana e de cloridrato de quitosana, com baixo e alto peso molecular, na correção de defeitos ósseos de tamanho crítico (DOTC) em calvária de ratos através de imagens radiográficas digitais, verificaram que os biomateriais testados não foram capazes de aumentar sozinhos a densidade radiográfica. No entanto, outro estudo realizado por Kang et al. (2010), mostrou que quando a membrana de quitosana foi associada às células-tronco, houve menor resposta inflamatória quando comparado ao grupo controle. Segundo estes autores, esse fato pode ser explicado pela provável imunossupressão causada pelas células-tronco transplantadas. Araújo et al. (2020) também mostrou a capacidade de regeneração óssea de microenxertos ósseos autólogos produzidos pela *Rigenera®* no reparo de defeitos críticos em calvária de rato associada a osso xenógeno.

Ao analisar os grupos, foi visto que não houve diferenças significativas entre os três grupos no período de 15 dias, quando comparado com os outros tempos. Aos 30 dias pós-cirúrgico, foi observado um aumento significativo da

densidade óssea na área analisada com relação ao grupo AB. Já nos animais analisados com 60 dias de experimento, nos grupos A e AB, houve diferenças significativas quando comparadas aos grupos controle e ao grupo B. Ainda foi observado que o grupo B não demonstrou aumento significativo nos períodos de 30 e 60 dias (Fig. 2). Estes dados indicam uma melhor osteoindução entre o grupo tratado apenas com as células do sistema *Rigenera*, bem como estas em associação com a biomembrana a base de quitosana/MFC.

De acordo com Kosaka et al. (1996), *in vivo* esta biomembrana pode estimular a proliferação de fibroblastos e modular a migração de neutrófilos e macrófagos, modificando assim os processos subsequentes de reparo, como fibroplasias e neoformação de tecidos. Azab et al. (2007) também observaram que, após a implantação do material contendo quitosana em sua constituição, houve a formação de vasos sanguíneos no local do procedimento, o que é positivo para o processo de regeneração óssea.

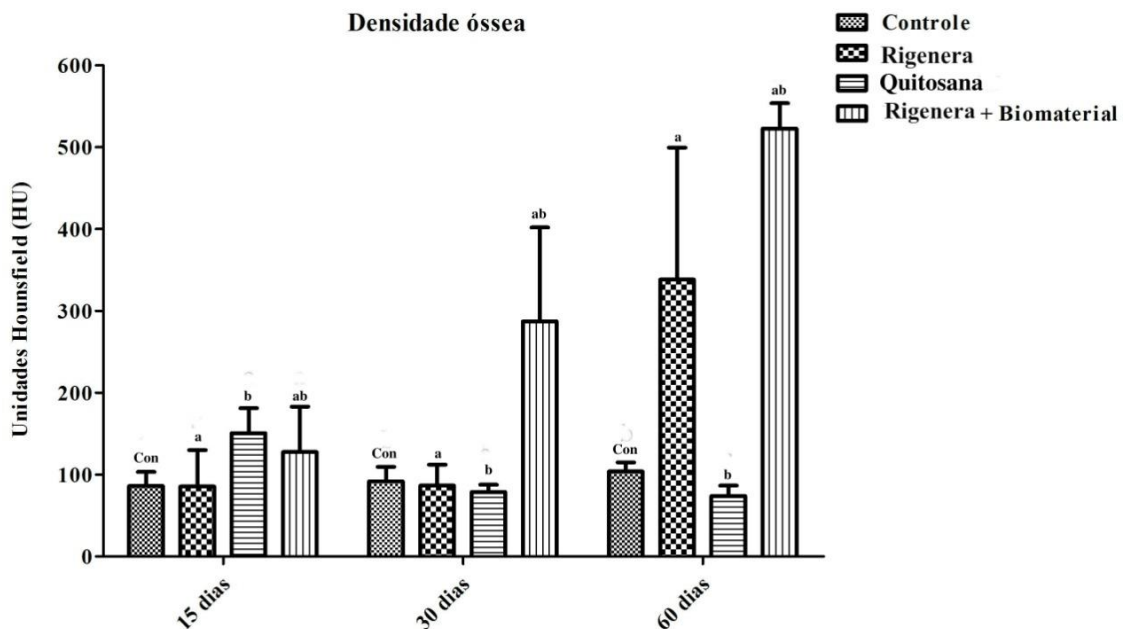


Figura 1: Densitometria óssea da falha crítica na calvária de ratos tratados com diferentes compostos aos 15, 30 e 60 dias pós-cirúrgico. Teste post hoc de Borrefoni (P <0,05)

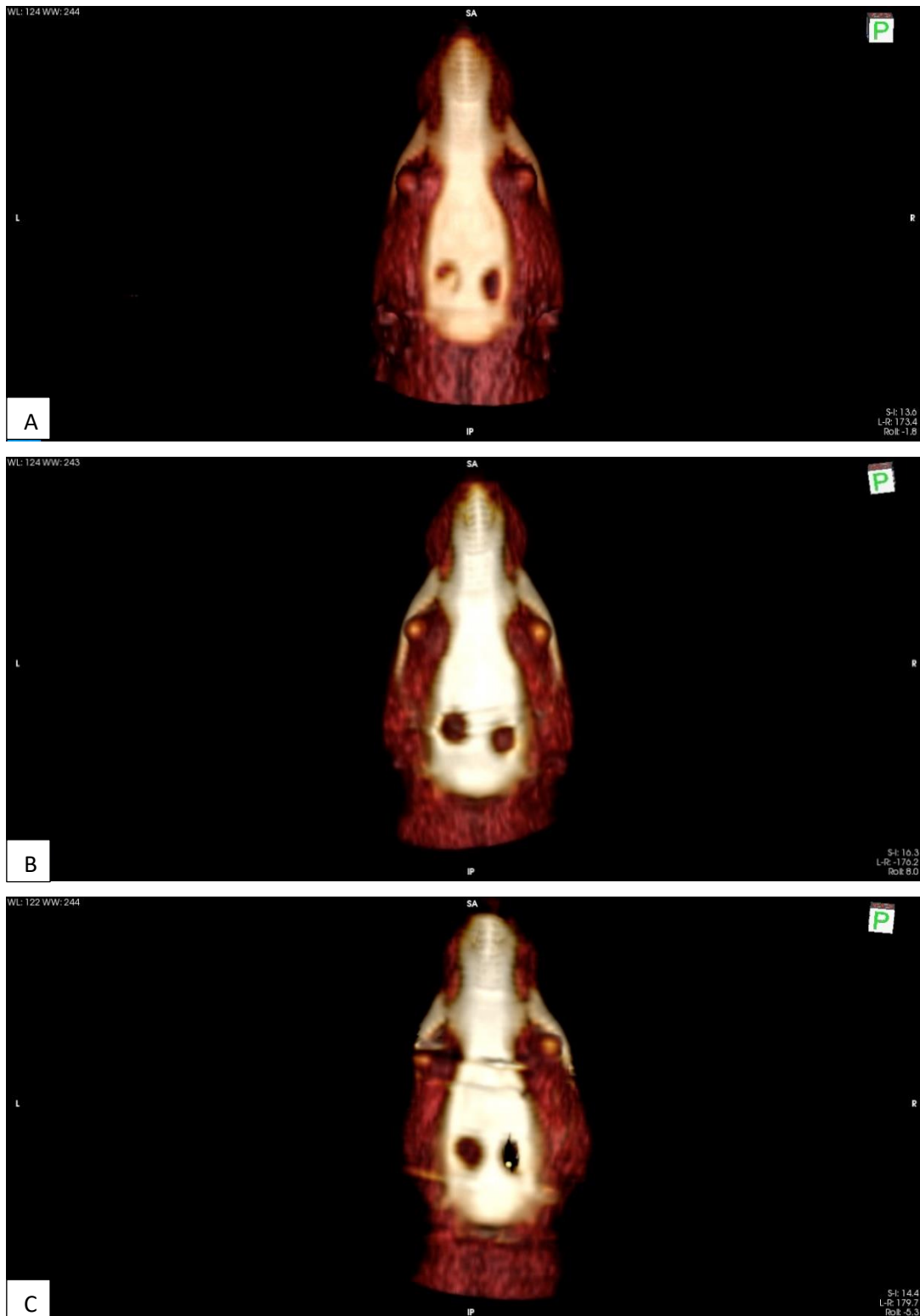


Figura 2: Reconstrução das imagens em software de visualização DICOM (OsiriX-64 bits, versão 7.0), cujo as regiões da calvária foram selecionadas após o tempo de 60 dias de tratamento. Imagens demonstram as regiões de interesse dos Rigenera associado ao biomembrana de quitosana/MFC (A), biomembrana de quitosana/MFC (B) e grupos Rigenera (C). Os valores foram obtidos em unidades Hounsfield para osso trabecular (HUt).

descaracterizassem seu estado de bem-estar geral ao exame clínico diário, ,

calma aparente na gaiola, com ingesta líquida e sólida compatível para a idade e a espécie, ausência de pelos eriçados, respiração e postura fisiológicos para a espécie.

Os resultados demonstram a importância e eficiência do sistema *Rigenera* como desagregador celular antes da utilização de enxertos para regeneração óssea em lesão crítica na calvária exceto quando foram observados que após 15 dias de realização do enxerto não houve diferença.

De acordo com as avaliações histopatológicas das calvárias no grupo B, foi observado no grupo tratado com 15 dias que a biomembrana a base de quitosana/MFC exerce um papel indutor na formação de membrana conjuntiva com presença de células osteogênicas, caracterizando ossificação intramembranosa. Foi possível observar a biomembrana sendo encapsulada por um tecido com fibroblastos ativos proliferativos. A biomembrana de quitosana/MCF gera ao redor dele uma membrana conjuntiva para ossificação, mostrando sua função osteoindutora. Estes achados vão de encontro com o que Spin-Neto et al, 2012 abordando que *in vivo*, este polímero pode estimular a proliferação de fibroblastos e modular a migração de neutrófilos e macrófagos, modificando assim os subsequentes processos de reparo como fibroplasias e neoformação tecidual. No grupo controle de 15 dias não há indução de formação óssea. O processo de regeneração óssea está normal.

Ao analisar o grupo tratado de 30 dias, foi verificado um espessamento ósseo constituído por osso compacto em processo de remodelação. Nota-se maior densidade de osso compacto em algumas regiões quando comparado com o grupo que não recebeu o biomaterial no defeito crítico induzido. Membrana conjuntiva envolvendo placas osseas formam uma ponte conjuntiva entre as diversas neoformações, caracterizando a ossificação intramembranosa. Em achados nos experimentos de Moraes et al. (2017) com relação à neoformação óssea, em todos os grupos avaliados, no intervalo inicial de sete dias, houve formação de tecido ósseo imaturo e neovascularização local. Ainda o que cita Intini et al. (2008) é que a grande vantagem dessa nova classe de biomateriais é a capacidade de estimular a invasão vascular precoce. Já com relação ao grupo controle de 30 dias, o tecido ósseo ainda vai passar por um processo de remodelação. Há uma neoformação óssea, porém, disforme, o que

nos faz concluir que a ossificação está atrasada, pois foi possível observar também tecido ósseo em processo de necrose e membrana conjuntiva cheia de fibroblastos onde está ocorrendo formação de tecido ósseo, porém de maneira desorganizada.

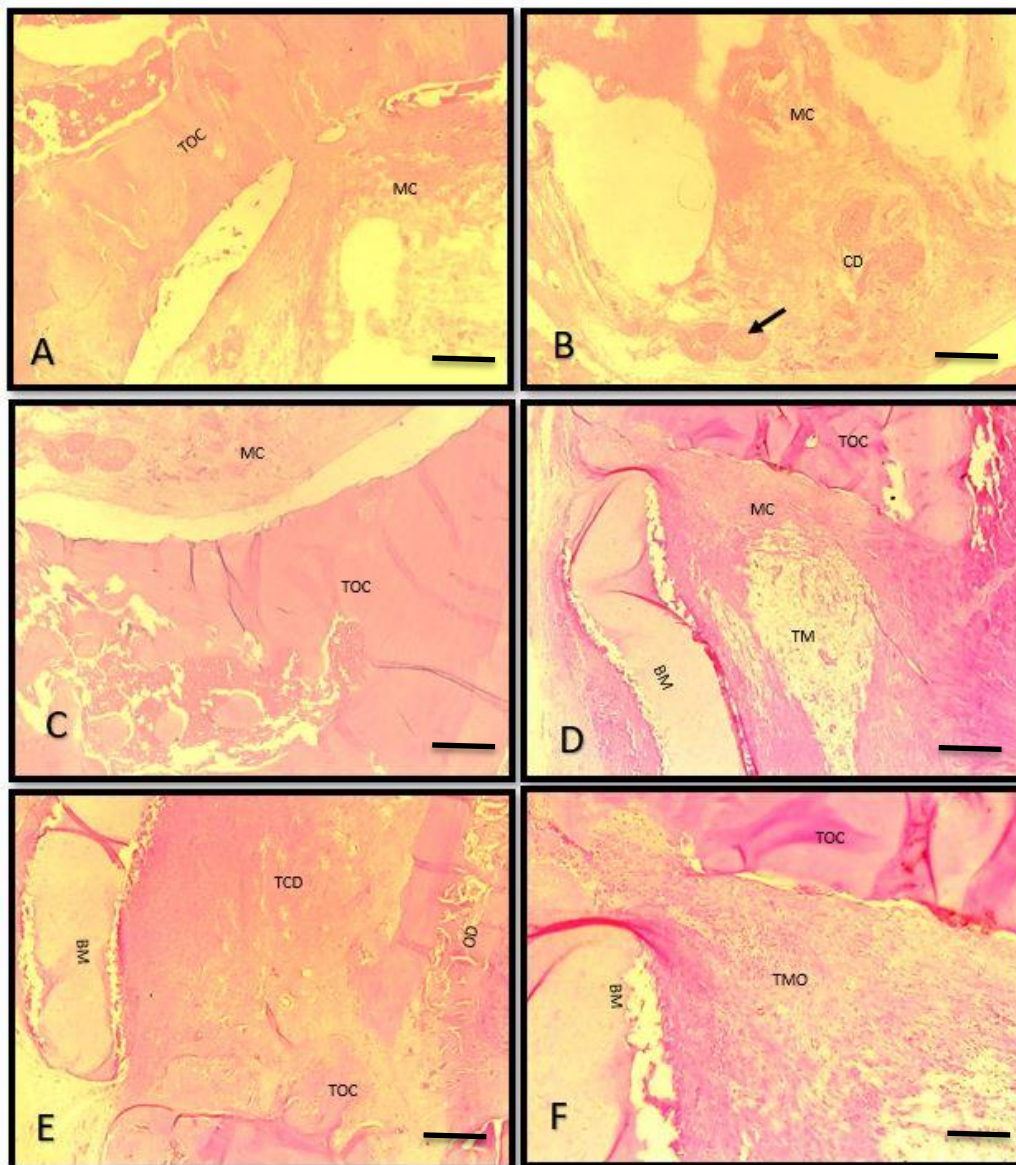


Figura 3: Falha/defeito crítico em calvária craniana de ratos Wistar do Controle do Grupo B- 15 dias (A, B e C) e tratado com a biomembrana a base de quitosana/MFC 15 dias (D, E e F). A e C: observa-se tecido ósseo do defeito crítico (TOC) e membrana conjuntiva (MC); B: deposição de cálcio (DC); D: tecido mesenquimal (TM); E: tecido conjuntivo denso (TCD) e oss díploe (OD); F: tecido mesenquimal osteogênico. Barra: corte em 5 µm. HE.

na avaliação dos animais submetidos ao defeito crítico aos 30 dias, observou-se presença de tecido associado com cartilagem na periferia dele. Notou-se a participação de membrana conjuntiva bem vascularizada na

formação da estrutura óssea. Podemos constatar diferentes formações teciduais nesta membrana: tecido mesenquimal, tecido ósseo em processo de remodelação e no centro uma estrutura óssea compacta semelhante a um plug osseo no defeito crítico. De acordo com os achados de Nassif et al. (2012) foi visto que, após a implantação do material que contém quitosana em sua constituição, também observou a formação de vasos sanguíneos na área do procedimento. Já com relação ao grupo controle de 60 dias é observado uma fibrose, membrana conjuntiva espessada com célula mesenquimal, pouco fibroblasto e boa quantidade de substância fundamental entre as extremidades.

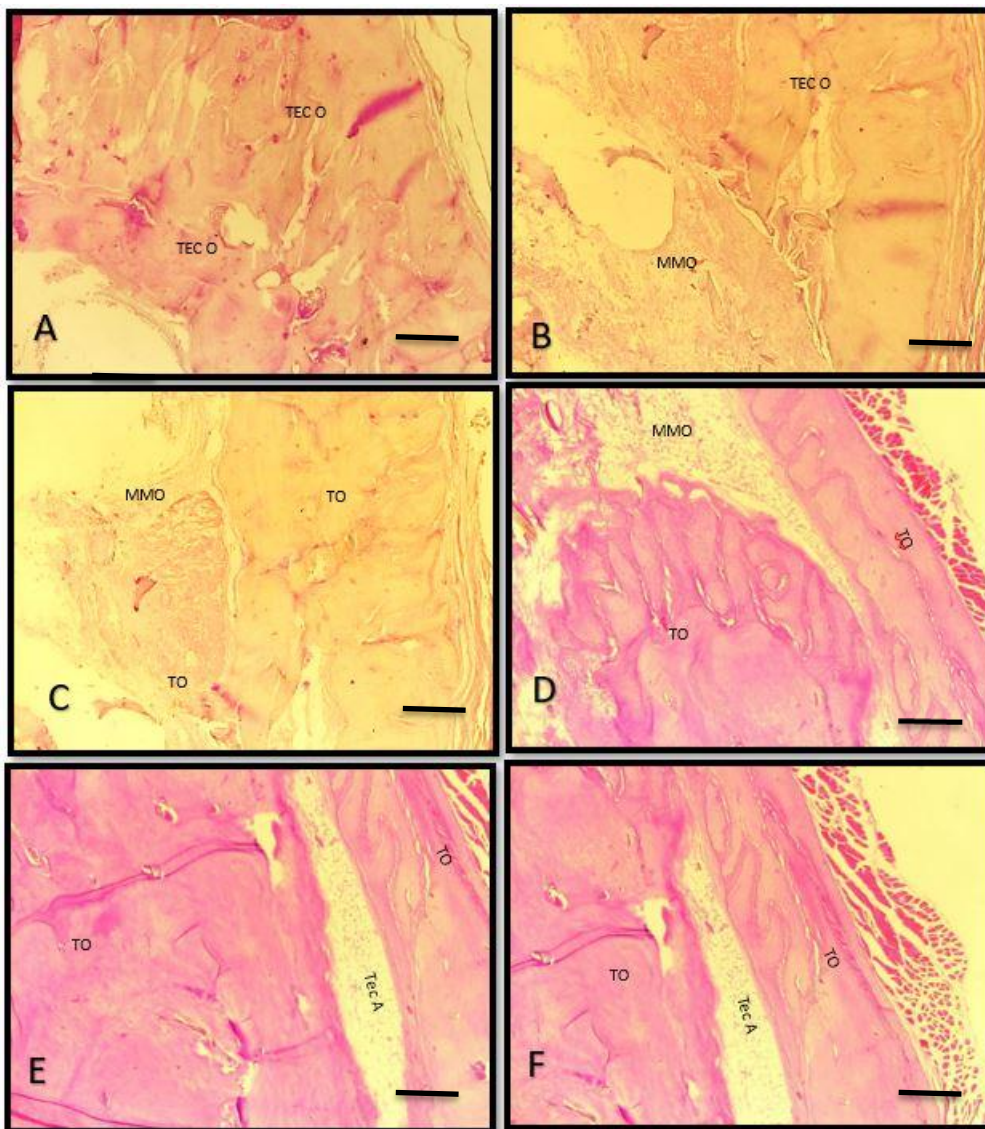


Figura 11. Tecido ósseo da calvária craniana de ratos Wistar do controle do Grupo B-30 dias (A, B e C) e tratamento com a biomembrana a base de quitosana/MFC 30 dias (D, E e F). Observados em A: tecido ósseo no limite do defeito crítico; B: membrana mesenquimal osteoprogenitora (MMO) e tecido ósseo no defeito crítico (Tec O); C e D: tecido ósseo (TO); E: tecido adiposo (Tec A); Barra: corte em 5 µm. HE.

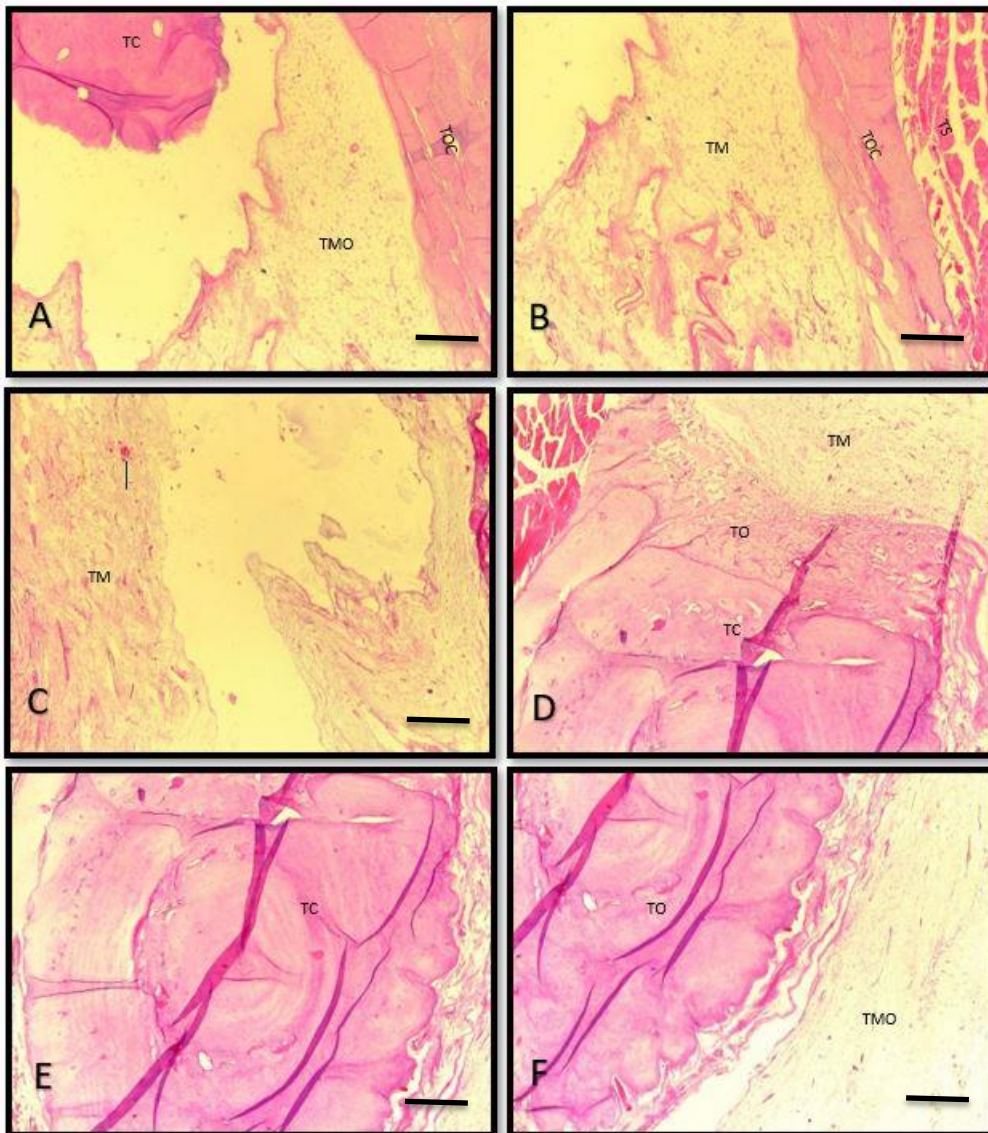


Figura 5: Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle do Grupo B- 60 dias (A, B e C) e tratamento com a biomembrana a base de quitosana/MFC 60 dias (D, E e F). Observados e A: tecido ósseo compacto no defeito crítico (TC), tecido ósseo compacto (TOC) e tecido mesenquimal osteogênico (TMO); B: tecido mesenquimal osteoprogenitor (TM), TOC e tela subcutânea (TS); C: TM; D: tecido ósseo jovem (TO) e TM; E: TC; F: TO e TMO. Barra: corte em 5 µm. HE.

CONCLUSÃO

Os resultados suportam a hipótese de que o dispositivo *Rigenera* bem como a biomembrana de quitosana/MFC, auxiliam no processo de regeneração óssea em calvária de ratos. As amostras de cartilagem xifóide submetidos ao processamento no dispositivo *Rigenera* mostraram ser um modelo ideal para os

nossos experimentos, assim como a biomembrana a base de quitosana/MFC. Ambas serviram como estimulantes no processo devido a capacidade de possuir propriedades osteoindutoras. Então, faz-se necessário testes futuros sobre este dispositivo de desagregação mecânica associado a biomembrana de quitosana/MFC para a realização de testes e uso seguro na engenharia de tecidos, além de suas utilizações no tratamento de lesões ósseas.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

- 1- Araújo, C.R.J. et al. Evaluation of Bone Regeneration in Rat Calvaria Using Bone Autologous Micrografts and Xenografts: Histological and Histomorphometric Analysis. *Materials*, v. 13, p. 1-10 , 2020.
- 2- AZAB, A.K.; DOVINER, V.; ORKIN B. et al. Biocompatibility evaluation of crosslinked chitosan hydrogels after subcutaneous and intraperitoneal implantation in the rat. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.83, n.2, p.414-422, 2007.
- 3- Chatzipetros et al. (2018). Application of nano-hydroxyapatite/ chitosan scaffolds on rat calvarial critical-sized defects: A pilot study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018 Sep 1;23 (5): e625-32.
- 4- D'AQUINO, R.; TROVATO, L.; GRAZIANO, A.; CECCARELLI, G.; DE ANGELIS, G.C.; MARANGINI, A.; NISIO, A.; GALLI, M.; PASI, M.; FINOTTI, M.; et al. Periosteum-derived micro-grafts for tissue regeneration of human maxillary bone. *J. Transl. Sci.* **2016**, 2, 125–129.
- 5- Georgopoulou et al. (2018); Chitosan/gelatin scaffolds support bone regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2018).

- 6- GHANBARI, H., GHARTAVOL, R.V.; Bone Regeneration: Current Status and Future Prospects. Bone Regeneration: Current Status and Future Prospects (2016).
- 7- INTINI, G; ANDREANA, S; BUHITE, RJ; BOBEK, LA. A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. J Periodontol 2008; 79:1217-1224.
- 8- KANG, Y.M.; LEE, B.N.; KO, J.H.; In vivo biocompatibility study of electrospun chitosan microfiber for tissue engineering. Int. J. Mol. Sci., v.11, p.4140-4148, 2010.
- 9- Kjalarsdóttir et al. (2019); Bone remodeling effect of a chitosan and calcium phosphate-based composite. Regenerative Biomaterials, 241–247.
- 10-Kosaka et al. (1996). Effect of chitosan implantation on activation of canine macrophages and polymorphonuclear cells after surgical stress. J Vet MedSci.; 58: 963-7.PMid:8915995.
- 11-Luby et al. (2019); Stem Cells for Bone Regeneration: Current State and Future Directions. The Journal of Craniofacial Surgery. Volume 30, Number 3, May 2019.
- 12-MARTIN, V., BETTENCOURT, A.; Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties Materials Science and Engineering (2018) 363–371.

- 13-MATASSI, F., NISTRINI, L., PAES, D.C., INNOCENTI, M.; New biomaterials for bone regeneration. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism* 2011; 8(1): 21-24.
- 14-MORAES, Paola Castro de et al . Repair of Bone Defects with Chitosan-Collagen Biomembrane and Scaffold Containing Calcium Aluminate Cement. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto , v. 28, n. 3, p. 287-295, June 2017 .
- 15-Nassif L, Jurjus A, Nassar J, Ghafari J, Sabban MEI (2012) Enhanced in-Vivo Bone Formation by Bone Marrow Differentiated Mesenchymal Stem Cells Grown in Chitosan Scaffold. *J Bioengineer & Biomedical Sci* 2:106. doi:10.4172/2155-9538.1000106.
- 16-Rolim, A. E. H.; Carvalho, F. A. A.; Costa, R. C. C.; Rosa F. P. Arcabouços de Quitosana - Propriedades Físico-Químicas e Biológicas para o Reparo Ósseo. *Rev. Virtual Quim.*, 2018, 10 (2), 211-228. Data de publicação na Web: 17 de abril de 2018.
- 17-SPIN-NETO, Rubens et al . Chitosan-based biomaterials used in critical-size bone defects: radiographic study in rat's calvaria. **Rev. odontol. UNESP**, Araraquara , v. 41, n. 5, p. 312-317, Oct. 2012 .
- 18-Trovato et al. (2015); A new medical device Rigeneracons allows to obtain viable micro-grafts from mechanical disaggregation of human tissues. *Journal of Cellular Physiology*. This article is protected by copyright. All rights reserved. DOI 10.1002/jcp.24973, 1162-1171.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DA TESE

O grande desafio inicial foi tentar desenvolver estudos voltados para a cultura de células, porém não obtivemos sucesso devido a problemas de estrutura. Também ficou evidente a nossa dificuldade em encontrar um tecido

alvo para obter células-tronco a serem cultivadas. Nossos achados afirmam que o dispositivo Rigenera bem como a biomembrana de quitosana/MFC atuam auxiliando no processo de regeneração óssea em calvária de ratos. Nossos resultados mostraram que os tempos de 30 e 60 dias foram importantes na densitometria óssea, mostrando que o dispositivo Rigenera e a biomembrana associada com os enxertos obtidos neste dispositivo atuam com a capacidade osteoindutora acelerando o processo de regeneração óssea. As amostras de cartilagem xifóide submetidas ao processamento no dispositivo Rigenera nos deu um melhor entendimento tanto na visão de intervenção cirúrgica, quanto na sua capacidade de servir como um modelo ideal para os nossos experimentos. Ambas serviram como estimulantes no processo devido a capacidade de possuir propriedades osteoindutoras.

Então, faz-se necessário testes futuros sobre este dispositivo de desagregação mecânica associado a biomembrana de quitosana/MFC para a realização de testes e uso seguro na engenharia de tecidos, além de suas utilizações no tratamento de lesões ósseas. Além disso, é crucial realizar testes histopatológicos dos enxertos obtidos pelo dispositivo Rigenera associado a biomembrana de quitosana/MFC para melhor avaliar o processo de reestruturação e regeneração óssea. Em adição, testes *in vitro* com cultura de células a fim de avaliar os enxertos da cartilagem xifóide obtidas no dispositivo, utilizando marcadores para células-tronco analisar o conteúdo presente na suspensão obtida é crucial para um melhor entendimento do processo.

ANEXOS

Publicações em coautoria

1 - Experimental and Molecular Therapeutics

Antitumor activity of the mesoionic compound MI H 2.4 on breast cancer cell lines

Luciana Amaral de Mascena Costa, **Filipe Cássio Silva de Lima**, Rodrigo da Silva Viana, Silvany de Sousa Araujo, Aurea Wischral, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Petrônio Filgueiras de Athayde-Filhoa, Leandro Araújo de Azevedo, Severino Alves Júnior, Manoel Adrião and J. Michael Mathis
DOI: 10.1158/1538-7445.AM2018-5877 Published July 2018
Proceedings: AACR Annual Meeting 2018; April 14-18, 2018; Chicago, IL

Abstract

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women under 60. Localized breast cancer is easily treated, resulting in high survival rates. However, treatment for advanced disease is inadequate, with a five-year survival rate of less than 24%. Thus, there is a great need for new therapies capable of increasing therapeutic efficacy. Synthetic mesoionic compounds, belonging to the 1,3-thiazolium-5-thiolate group, are recognized for their broad spectrum of biological activities including antibiotic, antiparasitic, antiviral, anticonvulsant, antidepressant, antioxidant, analgesic, anti-inflammatory, and more recently for their potential antitumor activity. These compounds have the ability to cross cell membranes; the characteristic of mesoionic structures having distinct regions of positive and negative charge associated with a poly-heterocyclic aromatic ring system, indicates the capability of strong interactions with biomolecules such as DNA and proteins. In this study, the cytotoxic effects of mesoionic compound MI H 2.4 alone and in combination with zinc was examined in breast cancer cell lines (4T1, BT-20, BT-549, MCF7, MDA-MB-231, MDA-MB-436, MM2MT, T-47D, and ZR-75-1) and normal breast cell lineages (HuMEC, MCF-10A, and MCF-12A) were evaluated. The effect of this agent on cell cycle was also investigated. Different concentrations of mesoionic compound MI H 2.4 (MI H 2.4 free) and in combination with zinc (MI H 2.4 Zinc) were added to the cultured cells and incubated for 24, 48, 72 and 96 h. Cell survival and cytotoxicity were evaluated using crystal violet and MTT assays. Cell cycle analysis was performed using MCF7 cells that were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry. The cytotoxic effects of mesoionic compounds (MI H 2.4 free and MI H 2.4 Zinc) were highest at 72 and 96 h. The MI H 2.4 free and MI H 2.4 Zinc showed a similar inhibitory effect on breast cancer cell growth in the μM range. In contrast, the normal breast cell lineages showed low cytotoxicity to treatment with the mesoionic compounds. Treatment of MCF7 cells cultured with MI H 2.4 free blocked cell cycle progression at the G2 phase of the cell cycle after 24 h of treatment. Mitochondrial function of MCF7 cells was determined using a Seahorse XF-24 Extracellular Flux Analyzer. Treatment with MI H 2.4 free and MI H 2.4 Zinc for 24 h resulted in a decreased basal and maximal mitochondrial respiration. In summary, mesoionic compound MI H 2.4 may offer a novel therapeutic strategy in the treatment of breast cancer, considering that it has significant antitumoral activity in breast cancer cell lines and low cytotoxicity in normal cells.

2 - Breast Cancer: Basic and Clinical Research: <https://doi.org/10.1177/1178223420913330>

Cytotoxic Activity of the Mesoionic Compound MIH 2.4BI in Breast Cancer Cell Lines

Luciana Amaral de Mascena Costa, Ashlyn C Harmon, Alvaro Aguiar Coelho Teixeira, **Filipe Cássio Silva de Lima**, Silvany de Sousa Araújo, Fabio Del Piero, Helivaldo Diógenes da Silva Souza, Petrônio Filgueiras de Athayde Filho, Severino Alves Junior, Maria de Mascena Diniz Maia, Aurea Wischral, Manoel Adrião Gomes Filho, J Michael Mathis
First Published July 1, 2020 Research Article

Abstract

In this work, we report the synthesis of a new 1,3-thiazolium-5-thiolate derivative of a mesoionic compound (MIH 2.4BI) and the characterization of its selective cytotoxicity on a panel of breast cancer cell lines. The cytotoxic effect of MIH 2.4BI on breast cancer cell lines was determined by XTT and crystal violet assays, flow cytometry analysis, electron microscopy characterization, and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling (TUNEL) apoptosis assays. As determined using XTT cell growth and survival assays, MIH 2.4BI exhibited growth inhibition activity on most breast cancer cell lines tested, compared with normal human mammary epithelial cells. Three breast

cancer cell lines (MCF-7, T-47D, and ZR-75-1) showed a more potent sensitivity index to growth inhibition by MIH 2.4BI than the other breast cancer cell lines. Interestingly, these 3 cell lines were derived from tumors of Luminal A origin and have ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), and HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) positive expression. Additional analysis of cytotoxicity mediated by MIH 2.4BI was performed using the MCF-7 cell line. MCF-7 cells displayed both time- and dose-dependent decreases in cell growth and survival, with a maximum cytotoxic effect observed at 72 and 96 hours. The MCF-7 cells were also characterized for cell cycle changes upon treatment with MIH 2.4BI. Using flow cytometry analysis of cell cycle distribution, a treatment-dependent effect was observed; treatment of cells with MIH 2.4BI increased the G2/M population to 34.2% compared with 0.1% in untreated (control) cells. Ultrastructural analysis of MFC-7 cells treated with MIH 2.4BI at 2 different concentrations (37.5 and 75 μ M) was performed by transmission electron microscopy. Cells treated with 37.5 μ M MIH 2.4BI showed morphologic changes beginning at 6 hours after treatment, while cells treated with 75 μ M showed changes beginning at 3 hours after treatment. These changes were characterized by an alteration of nuclear morphology and mitochondrial degeneration consistent with apoptotic cell death. Results of a TUNEL assay performed on cells treated for 96 hours with MIH 2.4BI supported the observation of apoptosis. Together, these results suggest that MIH 2.4BI is a promising candidate for treating breast cancer and support further in vitro and in vivo investigation.

3-XVIII- Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão JEPEX; 2018

A importância do conhecimento da fisiologia do exercício em equinos e sua relação com os sistemas cardiovascular, respiratório e musculoesquelético

Christye Taiany Onduras de Freitas, Ana Luiza Benício Rodrigues Evangelista, Diego Felipe Andrade do Nascimento, **Filipe Cássio Silva de Lima** e Anísio Francisco Soares.

4-XXIX Congresso de Iniciação Científica- CIC; 2019

Monitoramento anestésico e analgésico de animais durante procedimento cirúrgico em calvaria de ratos

Ana Beatriz Barbosa da Costa, **Filipe Cássio Silva de Lima**, Anísio Francisco Soares, Hugo César Viana de Souza e Marcelo Weinstein Teixeira