

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 ± 29 g, 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 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 ± 29 g, 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

Recebido em 30 de setembro de 2019

Aceito em 22 de junho de 2020

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: anisiofsoares@gmail.com

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 sementeira, 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 antisepsia 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

metzemaum, 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 dermorrafia 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).

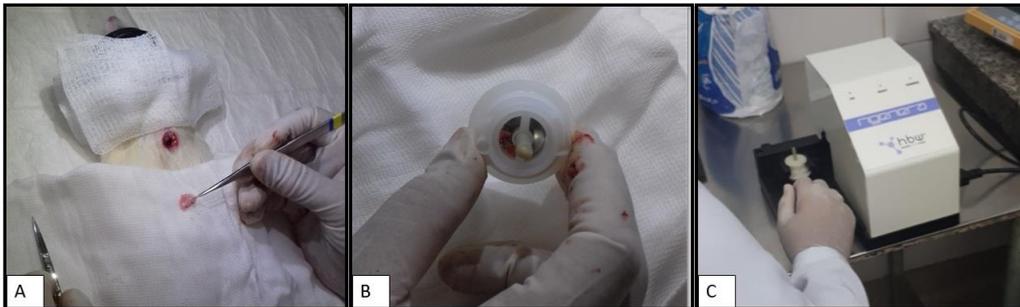


Figura 1. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: coleta da cartilagem xifoide; B: cartilagem inserida no dispositivo *rigenerecon* com solução salina estéril a 0,9%; C: sistema *Rigenera* 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 antimer 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 dermorrafia 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).

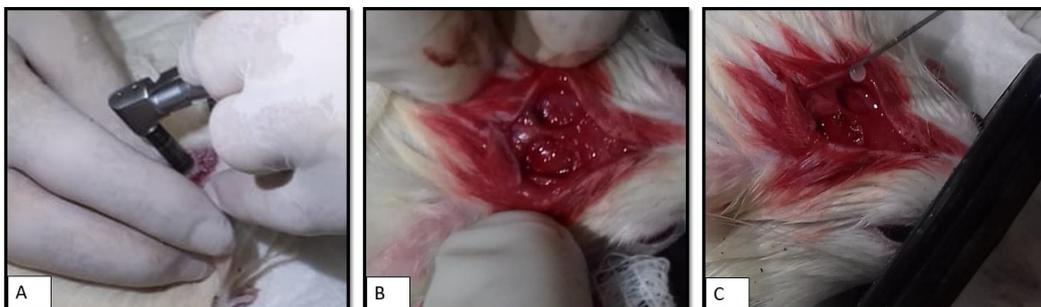


Figura 2. Procedimento cirúrgico em calvária de ratos Wistar tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: realização de defeito ósseo crítico por meio de broca trefina rotativa de 5mm de diâmetro; B: aspecto do defeito crítico nos ossos 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.

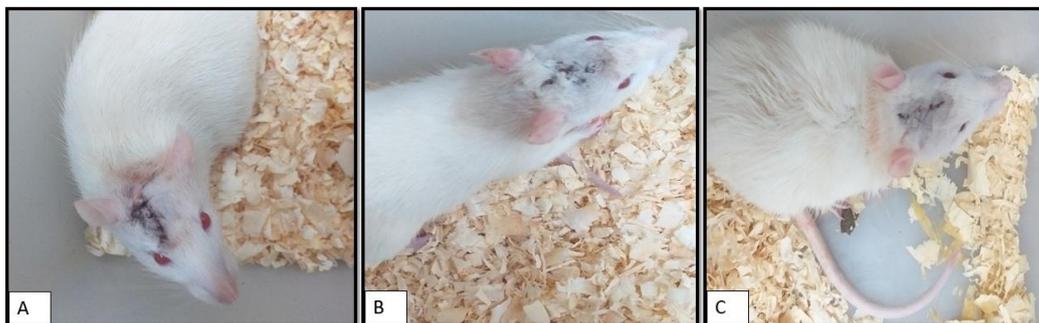


Figura 3. Aspecto da recuperação da ferida cirúrgica de ratos Wistar, após procedimento em calvária e tratados com células-tronco autólogas, oriundas da cartilagem xifoide e processada no sistema *Rigenera*. A: Após cinco dias ; B: após 10 dias; C: após 15 dias.

Foi realizada avaliação dos animais diariamente no mesmo horário, observando-se parâmetros fisiológicos, comportamentais, além da ingestão 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 realiado 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 5µm; submetidos à coloração hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Gomory 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 ingestão 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).

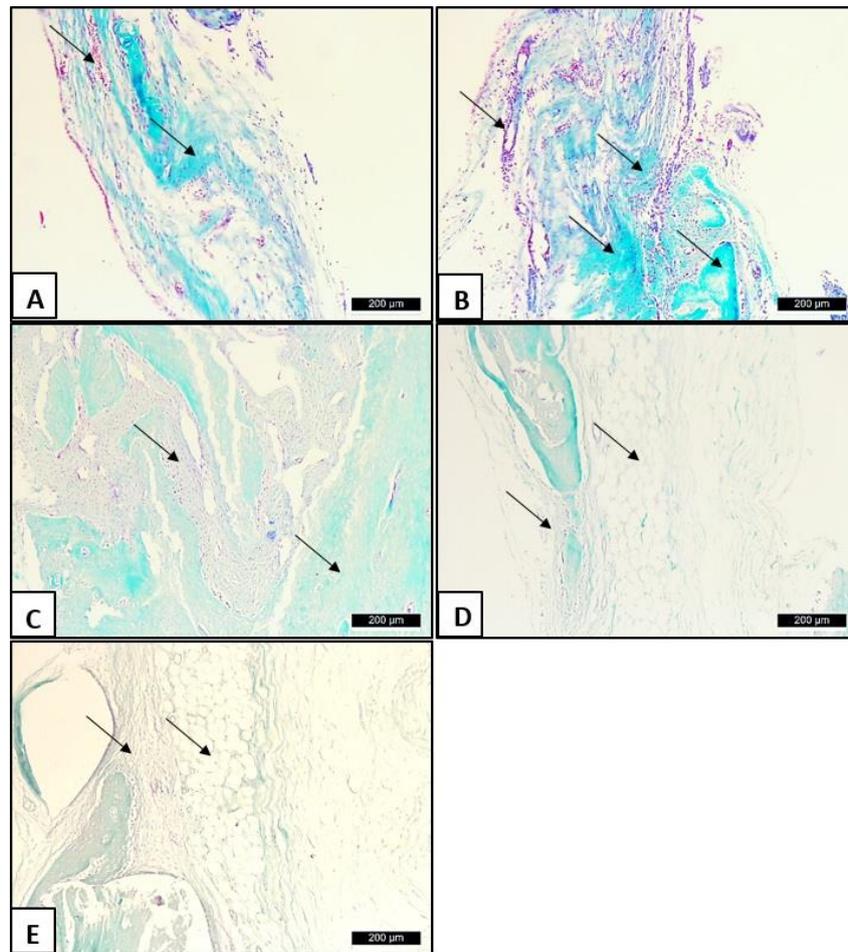


Figura 4. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G15-C) e Tratado (G15-T) após 15 dias do tratamento com cartilagem xifoide. Tricrômico de Gomori. Figura A: G15-C, tecido ósseo e osteoblastos. Figura B: G15-C, deposição de colágeno, osteócitos e osteoblastos. Figura C: G15-C, ilhotas 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*.

Avaliação da eficácia...

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 a 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.

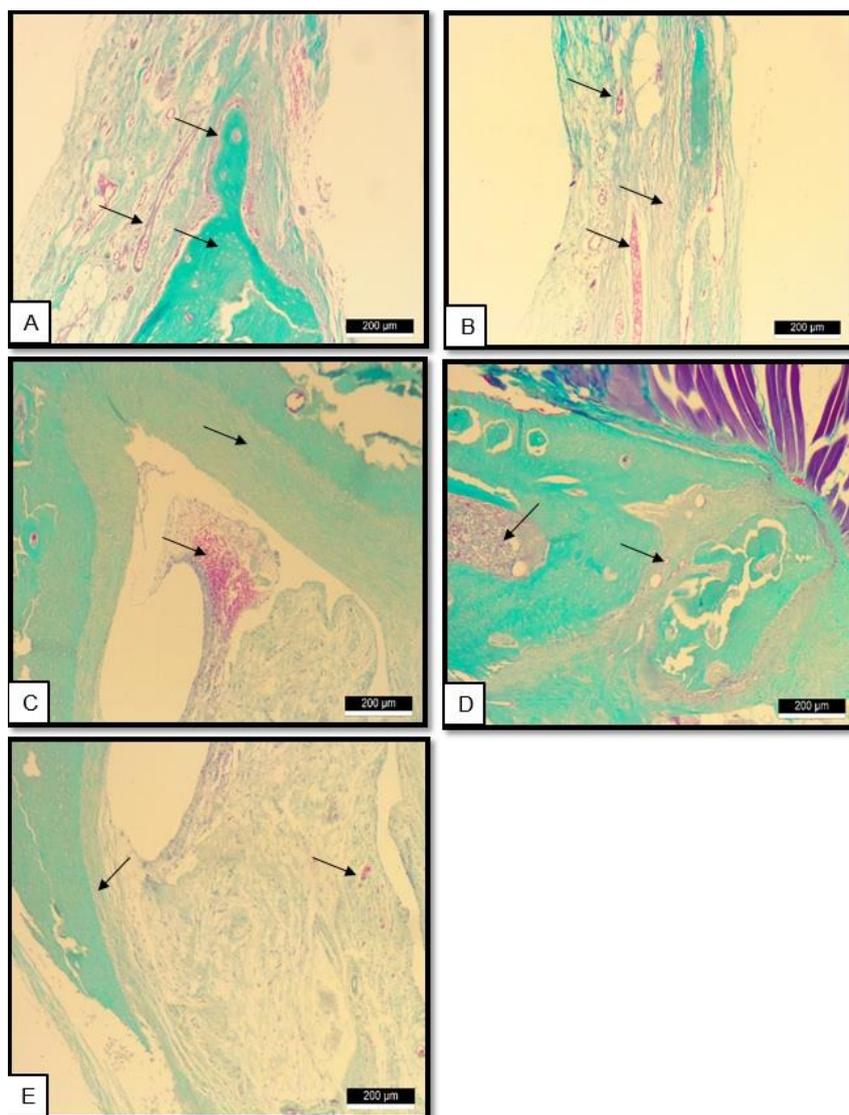


Figura 5. Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G30-C) e Tratado (G30-T) após 30 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G30-C, projeção de tecido ósseo e osso compacto se formando. Figura B: G30-C, ossificação intramembranosa. Figura C: G30-C, membrana conjuntiva 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 díploe afastado 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.

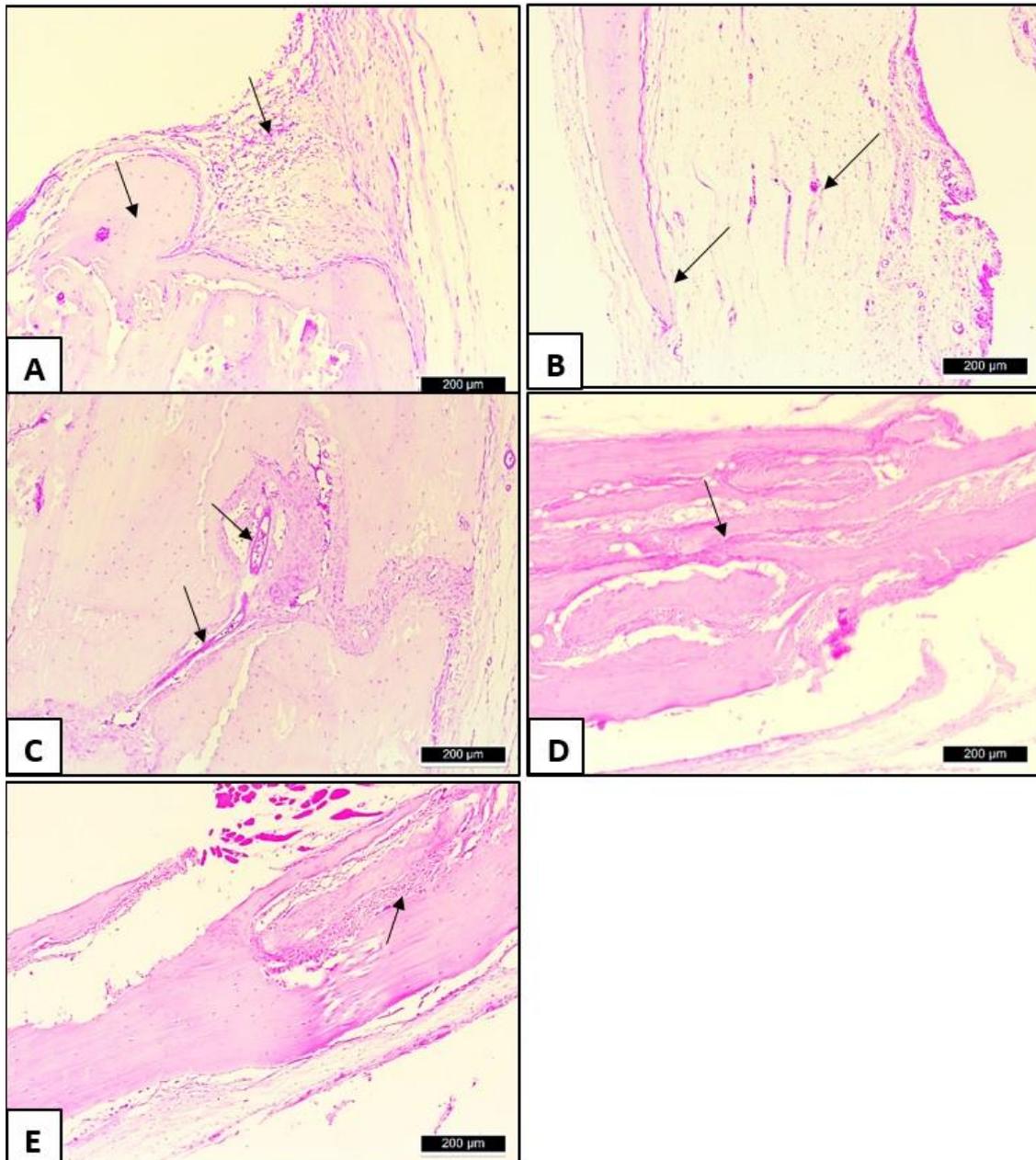


Figura 6: Tecido ósseo da calota craniana de ratos Wistar do Controle (G60-C) e *Rigenera* (G60-R) após 60 dias do tratamento com cartilagem xifoide. H-E. Figura A: G60-C, ossificação intramembranosa. Figura B: G60-C, membrana dando origem a tecido ósseo. Figura C: G60-C, sistema de Havers. Figura D: 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 Mental 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.
- BYDŁOWSKI, 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.; NISTRÌ, 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.