



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 12, Issue, 06, pp. 56778-56782, June, 2022

<https://doi.org/10.37118/ijdr.24670.06.2022>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

NARRATIVE REVIEW ON THE USE OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN ANIMAL CALVARIA LESIONS

Filipe Cassio Silva de Lima*¹, Vilton Edson Figueirôa de Moura², Marcelo Weinstein Teixeira³, Mariza Brandão Palma⁴ and Anísio Francisco Soares⁵

¹Doutor em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-DMFA, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE; ²Discente de Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE; ³Doutor em Medicina Veterinária, professor do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal-DMFA; Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE; ⁴Doutora em Biociência Animal, professora do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - DMFA da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE; ⁵Doutor em Bioquímica e Fisiologia, Professor Associado do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - DMFA; Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal - PPGBA da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

ARTICLE INFO

Article History:

Received 03rd March, 2022

Received in revised form

16th April, 2022

Accepted 19th May, 2022

Published online 28th June, 2022

Key Words:

Células-tronco mesenquimais;
Enxertos biológicos; Lesão calvária;
Tecnologia Rigenera®.

*Corresponding author:

Filipe Cassio Silva de Lima

ABSTRACT

O artigo é uma análise sobre as células-tronco, em específico as mesenquimais e seu uso no tratamento de lesões calvárias em animais. Para o levantamento dos estudos empregou-se o uso de pesquisas bibliográficas como artigos, livros e teses pertinentes à temática de lesões calvárias e uso de células-tronco. Busca-se abordar em primeira instância, uma análise sobre o que é, e como são formadas as células tronco mesenquimais, posteriormente destaca-se o uso de terapia celular como enxertos enriquecidos com células-tronco obtidos da tecnologia Rigenera®. Pode-se analisar que o uso de células tronco mesenquimais, separadas pelo desagregador celular da tecnologia Rigenera® para melhor eficácia em lesões calvária, são mecanismos de grande efetividade para a ossificação e cicatrização dessas lesões, não apenas em animais, mas também em humanos. Concluindo-se que, os procedimentos de terapia celular podem ser uma via alternativa no aceleramento contra lesões calvárias visto que o processo natural de cicatrização é lento.

Copyright © 2022, Filipe Cassio Silva de Lima et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Filipe Cassio Silva de Lima, Vilton Edson Figueirôa de Moura, Marcelo Weinstein Teixeira, Mariza Brandão Palma and Anísio Francisco Soares. "Narrative review on the use of mesenchymal stem cells in animal calvaria lesions", *International Journal of Development Research*, 12, (06), 56778-56782.

INTRODUCTION

As células-tronco (CT) constituem grupo de células indiferenciadas, caracterizadas pela capacidade de originar células especializadas e de autorrenovação (CHEUNG & RANDO, 2013). O conceito de CT surgiu a partir de experimentos pioneiros realizados no início dos anos 1960 por Ernest A. McCulloch e James E. Till, nos quais eles 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 blastocistos de fetos humanos abortados, 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 células-tronco adultas (CTA) (ROCHA et al. 2012). As CTA dividem-se em células-tronco mesenquimais (CTMs) e células-tronco hematopoiéticas (CTH) (BIANCO et al. 2008). Dentre as CTA, as CTMs, compõem um grupo que vem despertando particular interesse, devido a sua capacidade clonogênica e elevada plasticidade, o que lhes confere a capacidade de originar células de linhagem mesenquimal e não mesenquimal (DA SILVA SOARES et al. 2020). Segundo a International Society for Cellular Therapy, são três os requisitos mínimos para uma população de células ser classificada como Célula Tronco Mesenquimal. A primeira é que CTMs são isoladas de uma população de células mononucleares com base na 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 osteócitos, adipócitos e condrócitos (BYDLOWSKI *et al.* 2009). 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). Quando submetidas a diferentes estímulos, as CTMs são capazes de se diferenciar em células osteogênica, condrogênica, adipogênica, neurogênica e cardiogênica (BYDLOWSKI *et al.* 2009), o que as tornaram uma alternativa terapêutica atrativa e com amplo espectro de aplicações. Bang *et al.* (2015) relataram que o transplante com CTMs derivados da medula óssea (CTM-MO) melhorou os sinais clínicos de acidente vascular cerebral isquêmico. Um outro estudo sobre degeneração do disco intervertebral canino, averiguou que a injeção de CTM-MO no disco degenerado diminui a progressão da degeneração (HIYAMA *et al.* 2008). Resultados clínicos sobre o uso de CTMs de diferentes fontes para terapias regenerativas em cavalos parecem ser comparáveis com CTM-MO (ARNHOLD & WENISCH, 2015). Pinto Filho *et al.* (2013) avaliaram 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 regeneração, tais como citocinas pró-inflamatórias (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 a proliferação e diferenciação celulares, tanto em CTMs como outras linhagens progenitoras (DIMITRIOU *et al.* 2005; GHANBARI & VAKILI-GHARTAVOL, 2016).

Estudos 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.* 2009). Este biopolímero hidrofílico é obtido a partir da quitina, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Características como a 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). Diante do exposto, este artigo tem como objetivou-se realizar uma revisão de literatura sobre células-tronco mesenquimais e seu uso para regeneração óssea e cicatrização de lesões.

METODOLOGIA

Este artigo se trata de uma revisão de literatura narrativa qualitativa. A revisão foi produzida utilizando como base artigos, teses, monografias da área relacionados a lesões em calvárias de animais e células-tronco. Para a busca do material bibliográfico a ser consultado, foram utilizadas as palavras-chaves: células-tronco mesenquimais; lesões na calvária; dispositivo Rigeneracon; regeneração óssea; defeitos ósseos. As revisões de literatura foram feitas por análise e síntese de informações adquiridas de estudos relevantes já publicados, todos estes foram lidos e sintetizados, então

designados apenas os relevantes e as informações existentes neles foram utilizadas para o tema de importância do artigo. Não foi levado em consideração as datas dada a importância na recolha de artigos, utilizando-se dos mais recentes como base de informação. Todos os livros empregados na pesquisa foram referenciados.

ANÁLISE BIBLIOGRÁFICA

Células-tronco mesenquimais e sua capacidade de diferenciação e regeneração: As CTMs são células multipotentes que têm funções de apoio e efeitos terapêuticos em medicina regenerativa (FEITOSA *et al.* 2022). 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 auto-renovação ilimitada ou prolongada, bem como a capacidade de dar origem a pelo menos um tipo de célula madura e diferenciada (CHAGASTELLES & NARDI 2011). A diferenciação de CTMs em linhagens adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas 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 que ainda vem sendo estudado, e muitas questões permanecem sem resposta. Tem sido 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 & RYU 2012). As CTMs podem ser encontradas em diferentes compartimentos do tecido conjuntivo e elas têm sido isoladas a partir de vários tecidos (NEUPANE *et al.* 2008). A engenharia tecidual e medicina regenerativa tem dado atenção às CTMs porque elas podem ser coletadas com técnicas minimamente invasivas, podem propagar-se *in vitro* e possuem propriedades importantes, tais como multipotência, atividades parácrinas e capacidade de modulação imune (ALVES *et al.* 2014). Em virtude da sua capacidade de diferenciação celular e efeitos tróficos, as CTMs são promissoras candidatas para uso na medicina regenerativa e reparadora. Uma área importante de grande potencial é a utilização de CTMs no tratamento de má formação óssea. As células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea humana (CTMh), também conhecidas como células estromais da medula óssea ou, como 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).

Sistema Rigenera®: O desagregador de tecidos biológicos Rigeneracon, com base na tecnologia Rigenera®, permite a extração de microenxertos a partir de uma amostra de tecido conjuntivo autólogo, cujos componentes são menores que 50 μ m (TROVATO *et al.* 2015). Eles são utilizados imediatamente após a sua obtenção sem qualquer manipulação ou cultura de células. Além disso, esta tecnologia é capaz de cortar com a hélice de desagregação, utilizando de força mecânica, os constituintes da matriz extracelular, que desempenham um papel importante na redução do processo inflamatório e assim auxiliam na regeneração do tecido (ZANZOTTERA *et al.* 2014). Deste modo, usando este dispositivo médico inovador, os pacientes são, ao mesmo tempo, o doador e o receptor destes microenxertos (GIACCONE *et al.* 2014). A eficácia dos microenxertos obtidos a partir da tecnologia Rigenera® é percebida em diversas áreas, dentre elas, estão as cirurgias bucomaxilo-facial e dermatológica, gastroenterologia (TROVATO *et al.* 2015; GIACCONE *et al.* 2014). A qualidade e quantidade de osso regenerado utilizando-se células-tronco da polpa dentária associadas à biomateriais foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* (D'AQUINO *et al.*, 2007; GRAZIANO *et al.* 2008). A polpa dentária pode ser considerada como uma fonte potencialmente importante de células-tronco eficazes para fins terapêuticos, tais como a reparação/regeneração de ossos craniofaciais (GIACCONE *et al.* 2014).

A efetividade positiva de microenxertos obtidos em fragmentos da derme também é observada, podendo ser aplicados em cicatrizes acentuadas decorrente de queimaduras ou traumas, úlceras crônicas e feridas pós-operatórias em pacientes oncológicos, mostrando melhoras significativas nas lesões, porcentagem maior de restauração das camadas abaixo da epiderme e o realinhamento das fibras colágenas da derme papilar (SVOLACCHIA *et al.* 2016; BAGLIONI *et al.* 2016; DE FRANCESCO *et al.* 2017). O protocolo estabelecido pela tecnologia Rigenera[®] consiste em quatro passos: (i) coleta de uma pequena amostra de tecido doador distante do local receptor, (ii) a desagregação de tecido através do dispositivo Rigeneracon por meio da adição de 01 mL de solução salina estéril solução, (iii) obtenção de microenxerto autólogo após a desagregação e (iv) a injeção destes microenxertos no local da lesão por infiltrações ou em combinação com outros componentes (MARCARELLI *et al.* 2016).

Ossos e processo de regeneração óssea devido a lesões: O osso é um tecido conjuntivo mineralizado (MARTIN & BETTENCOURT, 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 alojamento da medula óssea. As propriedades mecânicas variam de acordo com a localização e função (ROSETI *et al.* 2017). Microscopicamente, o tecido ósseo encontra-se constituído por dois componentes básicos: células e matriz orgânica, sobre a qual se depositam os componentes inorgânicos (ANDIA *et al.* 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 (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂) que, associados às fibras colágenas, fornecem a resistência e dureza características do tecido ósseo (LOPES *et al.*, 2015; TURNBULL *et al.* 2018). O colágeno tipo I representa 90% das proteínas, sendo os restantes 10% compostos por um grande número de proteínas não colagênicas (por exemplo, osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas ósseas e várias proteoglicanas). As proteínas não colagênicas 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 *et al.* 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 tornar-se 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 *et al.* 2006). A reabsorção e deposição de matriz são processos estreitamente acoplados, que dependem da dinâmica balanceada entre as atividades dos osteoblastos e osteoclastos. Esse processo de remodelação inicia-se em um período de duas a três semanas após a lesão (PEREIRA, 2022). 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, 1995). Quando um defeito ósseo ocorre devido à lesão, as células são fornecidas pelo perioste 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 & BETTENCOURT, 2018). Ocasionalmente em lesões ósseas onde ocorrem grandes perdas desse órgão, como fraturas externas ou ressecção de tumores ósseos, neste caso, não ocorre cicatrização do osso e precisará 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 CTMs e osteoprogenitoras 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 idosos) (DIMITRIOU *et al.* 2011)

Calvária: A calvária é composta por cinco ossos planos: uma grande parte do frontal, occipital, maior fração dos dois ossos parietais e porção escamosa e zigomática do osso temporal (TUBBS *et al.* 2011). Originam-se de células da crista neural craniana e sofrem 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 da calvária frequentemente se apresentam como achados clinicamente silenciosos em radiografias de crânio ou como massas palpáveis que podem causar dor localizada ou traumas (GARFINKLE, 2011). Além disso, podem ter origem nas estruturas ósseas ou podem ser secundárias à invasão de lesões na base de couro cabeludo ou lesões cerebrais na abóbada do crânio (GOMEZ, 2018). Muitas espécies têm sido utilizadas para modelos animais de defeitos ósseos, incluindo ratos, coelhos, cães, porcos, ovelhas e cabras, mas grande parte das pesquisas se concentrou em modelos de roedores, devido à reprodutibilidade, considerações estruturais e econômicas. Anatômica e fisiologicamente, 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.* 2012). 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).

Aplicação de células-tronco em lesões calvária de animais: Pesquisas feitas mostram que o uso de enxertos contendo células-tronco em lesões calvárias, acelera o processo de regeneração e demonstra uma melhor cicatrização final se comparado a não utilização de células-tronco. No estudo feito por Pelegrine (2014), vinte e um coelhos foram divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais e um grupo de três animais, sendo eles: (01) grupo controle preenchido com xenoenxerto puro, (02) grupo experimental preenchido com xenoenxerto enriquecido com medula óssea, (03) grupo experimental contendo xenoenxerto enriquecido com a fração mononuclear da medula óssea, (04) grupo sem enxerto e membrana. Em todos os grupos foram feitas duas lesões bilaterais no osso parietal de 12mm. Nos três primeiros grupos foi aplicado o xenoenxerto Bio-oss[®] (um substituto artificial de osso). Além disso, foram escolhidos aleatoriamente por software de randomização, espécimes dos grupos (01), (02) e (03) para aplicação da barreira membranosa Bio-gide[®] em um dos lados da calvária também

selecionada de maneira randômica. Os resultados mostraram que nos animais do grupo (03) com e sem membrana houve uma maior mineralização e cicatrização em relação ao grupo (02) e (01) respectivamente, enquanto no grupo (04) contendo apenas três animais sem preenchimento e proteção da barreira, não houve formação óssea. Ademais, o uso da tecnologia Rigenera® para obtenção e aplicação de células-tronco é um caminho eficaz e prático para que esta possa ser usada em terapia celular (DESANDO *et al.* 2021). O estudo realizado por Lima *et al.* (2021), reforça a utilização das CTMs para a regeneração óssea. Na pesquisa, foram utilizados no total dezoito ratos que foram divididos em três grupos de seis, sendo cada indivíduo controle de si próprio. Foram utilizadas CTMs extraídas de microenxertos pelo dispositivo Rigeneracon nas lesões do antímero esquerdo da calvária. Como resultado obteve-se que, o uso das CTMs nas lesões acelerou o processo de ossificação e cicatrização, principalmente no grupo (02) e (03) com 30 e 60 dias de observação respectivamente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Consideramos então que entre as células-tronco, as mesenquimais podem desempenhar um papel importante para apressurar o processo de ossificação e cicatrização de lesões calvárias. Além disso, demonstra também eficácia nos estudos em humanos. Por fim, o uso de recursos como xenoenxertos e microenxertos enriquecidos com células-tronco e a obtenção de células-tronco mesenquimais através da tecnologia Rigenera®, são opções ideais para pesquisas relacionadas à melhoria da regeneração celular em lesões ósseas, utilizando os microenxertos autólogos como uma solução biológica, podendo oferecer benefícios significativos que poderiam superar as limitações dos tratamentos atuais, como invasividade, morbidade do local doador e morte celular.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001A. À Universidade Federal Rural de Pernambuco que também proporcionou todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS

Al-nbaheen, M.; Ali, D.; Bouslimi, A.; Al-Jassir, F.; Megges, M.; Prigione, A.; Aldahmash, A. 2013. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(1), 32-43.

Alves, E. G.; Serakides, R.; Boeloni, J. N.; Rosado, I. R.; Ocarino, N. M.; Oliveira, H. P.; Rezende, C. M. 2014. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC veterinary research*, 10(1), 1-9.

Andia, D. C.; Cerri, P. S.; Spolidorio, L. C. 2006. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP*, 35(2), 191-198.

Arnhold, S.; Wenisch, S. 2015. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. *American Journal of Stem Cells*, 4(1), 1.

Arvidson, K.; Abdallah, B. M.; Applegate, L. A.; Baldini, N.; Cenni, E.; Gomez-Barrena, E.; Finne-Wistrand, A. 2011. Bone regeneration and stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(4), 718-746.

Baglioni, E.; Trovato, L.; Marcarelli, M.; Frenello, A.; Bocchiotti, M. A. 2016. Treatment of oncological post-surgical wound dehiscence with autologous skin micrografts. *Anticancer Research*, 36(3), 975-979.

Bang, O. Y.; Lee, J. S.; Lee, P. H.; Lee, G. 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals*

of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society, 57(6), 874-882.

Bavaresco, C. S.; Grossmann, T. K.; Rehm, D. S.; Grossmann, E. 2020. Efeito de células-tronco mesenquimais na regeneração das estruturas associadas à articulação temporomandibular: revisão narrativa. *Brazilian Journal Of Pain*, 3, 275-279.

Bianco, P.; Robey, P. G.; Simmons, P. J. 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313-319.

Bosch, C.; Melsen, B.; Vargervik, K. 1995. Guided bone regeneration in calvarial bone defects using polytetrafluoroethylene membranes. *The Cleft palate-craniofacial journal*, 32(4), 311-317.

Bydlowski, S. P.; Debes, A. A.; Maselli, L. M.; Janz, F. L. 2009. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31, 25-35.

Chagastelles, P. C.; Nardi, N. B. 2011. Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*, 1(3), 63-67.

Cheung, T. H.; Rando, T. A. 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(6), 329-340.

Da Silva Soares, L. L.; de Carvalho, M. A. M.; Neto, N. M. A. 2020. Análise citogenética de células-tronco mesenquimais em cultivo prolongado: uma revisão/Cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells in prolonged cultivation: a review. *Jornal Interdisciplinar de Biociências*, 5(1), 20-23.

D'aquino, R.; Graziano, A.; Sampaoli, M.; Laino, G.; Pirozzi, G.; De Rosa, A.; Papaccio, G. 2007. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death & Differentiation*, 14(6), 1162-1171.

De Francesco, F.; Graziano, A.; Trovato, L.; Ceccarelli, G.; Romano, M.; Marcarelli, M.; Ferraro, G. A. 2017. A regenerative approach with dermal micrografts in the treatment of chronic ulcers. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 139-148.

Desando, G.; Grigolo, B.; Deangelles Pereira Florentino, A.; Teixeira, M. W.; Barbagallo, F.; Naro, F.; Soares, A. F. 2021. Preclinical Evidence of Intra-Articular Autologous Cartilage Micrograft for Osteochondral Repair: Evaluation in a Rat Model. *Cartilage*, 13, 1770S-1779S.

Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P. V. 2011. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*, 9(1), 1-10.

Dimitriou, R.; Tsiridis, E.; Giannoudis, P. V. 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*, 36(12), 1392-1404.

Feitosa, M. C.; Guerrera, M. U.; Siqueira, J. O.; Feitosa, R. O.; Soares, A. F.; Weinstein, M. T. 2022. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Coxofemoral Dysplasia in a Dog. *Acta Scientiae Veterinariae*, 50.

Garfinkle, J.; Melançon, D.; Cortes, M.; Tampieri, D. 2011. Imaging pattern of calvarial lesions in adults. *Skeletal radiology*, 40(10), 1261-1273.

Ghanbari, H.; Vakili-Ghartavol, R. 2016. Bone regeneration: Current status and future prospects. *Advanced Techniques in Bone Regeneration*, 3-26.

Giaccone, M.; Brunetti, M.; Camandona, M.; Trovato, L.; Graziano, A. 2014. A new medical device, based on rigenera protocol, in the management of complex wounds. *J Stem Cells Res. Rev & Rep*, 1(3), 3.

Gomez, C. K.; Schiffman, S. R.; Bhatt, A. A. 2018. Radiological review of skull lesions. *Insights into Imaging*, 9(5), 857-882.

Graziano, A.; d'Aquino, R.; Laino, G.; Proto, A.; Giuliano, M. T.; Pirozzi, G.; Papaccio, G. 2008. Human CD34+ stem cells produce bone nodules in vivo. *Cell proliferation*, 41(1), 1-11.

Hiyama, A.; Mochida, J.; Iwashina, T.; Omi, H.; Watanabe, T.; Serigano, K.; Sakai, D. 2008. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *Journal of orthopaedic research*, 26(5), 589-600.

Junqueira L. C.; Carneiro J. 2017. *Histologia básica* (13ª ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

Kang, B. J.; Ryu, H. H.; Park, S. S.; Koyama, Y.; Kikuchi, M.; Woo, H. M.; Kweon, O. K. 2012. 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. *Journal of veterinary science*, 13(3), 299-310.
- Lima, F. C. S.; Teixeira, M. W.; Silva Júnior, V. A.; Costa, A. B. B.; Lima, V. C.; Souza, H. C. V.; Soares, A. F. 2021. Avaliação da eficácia do sistema rigeneracon no tratamento de lesões de calvária em ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 73, 132-140.
- Lopes, R. J.; Oliveira, J. A. C.; Esteves, A. A. 2015. Síntese e caracterização de pós de hidroxiapatita [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] obtidas a partir do processo sol-gel. *foco: caderno de estudos e pesquisas*, 8, 55-72.
- Marcarelli, M.; Trovato, L.; Novarese, E.; Riccio, M.; Graziano, A. 2017. Rigenera protocol in the treatment of surgical wound dehiscence. *International wound journal*, 14(1), 277-281.
- Martin, V.; Bettencourt, A. 2018. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties. *Materials Science and Engineering: C*, 82, 363-371.
- Matassi, F.; Nistri, L.; Paez, D. C.; Innocenti, M. 2011. New biomaterials for bone regeneration. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, 8(1), 21.
- Mitra, I.; Duraiswamy, M.; Benning, J.; Joy, H. M. 2016. Imaging of focal calvarial lesions. *Clinical Radiology*, 71(4), 389-398.
- Neupane, M.; Chang, C. C.; Kiupel, M.; Yuzbasiyan-Gurkan, V. 2008. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 14(6), 1007-1015.
- Park, J. W.; Jang, J. H.; Bae, S. R.; An, C. H.; Suh, J. Y. 2009. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clinical oral implants research*, 20(4), 372-378.
- Pelegri, A. A.; Aloise, A. C.; Zimmermann, A.; de Mello e Oliveira, R.; Ferreira, L. M. 2014. Repair of critical-sized bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clinical Oral Implants Research*, 25(5), 567-572.
- Pereira, L. M. M.; Soares, A. F.; Melo, I. M. F.; Palma, B. M. 2022. The use of mesenchymal stem cells, obtained through the rigenera® technology, in the treatment of chronic wounds. *International Journal of Development Research*. 12, (03), 54936-54938.
- Pinto Filho, S. T. L.; Treichel, T. L. E.; Aramburú Junior, J. S.; Rosa, M. B. D.; Dalmolin, F.; Brun, M. V.; Pippi, N. L. 2013. Células-tronco mesenquimais adultas: características e aplicações experimentais em animais. *Vet Zootec*, 20, 49-59.
- Porto, G. G.; Vasconcelos, B. C. D. E.; Andrade, E. S. D. S.; Carneiro, S. C. D. A. S.; Frota, M. S. M. 2012. Is a 5 mm rat calvarium defect really critical?. *Acta cirurgica brasileira*, 27(11), 757-760.
- Rocha, A. S.; Maia, L.; Guastali, M. D.; Volpato, R.; Alvarenga, F. D. C. L. 2012. Considerações sobre células tronco embrionárias. *Veterinária e Zootecnia*, 303-313.
- Rolim, A. E. H.; Carvalho, F. A.; Costa, R. C. C.; Rosa, F. P. 2018. Arcabouços de quitosana-propriedades físico-químicas e biológicas para o reparo ósseo. *Revista Virtual de Química*, 10(2), 211-228.
- Rosendo, R. A.; Andrade, A. A.; Figueiredo, A. B. M.; dos Santos Tavares, A. H.; de Sousa Castro, D. L.; de Siqueira, R. R.; de Medeiros, L. A. D. M. 2020. Estruturas de quitosana utilizadas para regeneração óssea in vivo: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*, 9(7), e891974538-e891974538.
- Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. 2017. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1246-1262.
- Spicer, P. P.; Kretlow, J. D.; Young, S.; Jansen, J. A.; Kasper, F. K.; Mikos, A. G. 2012. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*, 7(10), 1918-1929.
- Spin Neto, R.; Pavone, C.; Freitas, R. D.; Marcantonio, R. A. C.; Marcantonio Jr, E. 2013. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. *Revista de Odontologia da UNESP*, 37(2), 155-161.
- Svolacchia, F.; De Francesco, F.; Trovato, L.; Graziano, A.; Ferraro, G. A. 2016. An innovative regenerative treatment of scars with dermal micrografts. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 15(3), 245-253.
- Takayanagi, H. 2005. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of periodontal research*, 40(4), 287-293.
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391), 1145-1147.
- Till, J. E.; McCulloch, E. A. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14(2), 213-222.
- Trovato, L.; Monti, M.; Del Fante, C.; Cervio, M.; Lampinen, M.; Ambrosio, L.; Graziano, A. 2015. A new medical device rigeneracons allows to obtain viable micro-grafts from mechanical disaggregation of human tissues. *Journal of Cellular Physiology*, 230(10), 2299-2303.
- Tubbs, R. S.; Bosmia, A. N.; Cohen-Gadol, A. A. 2012. The human calvaria: a review of embryology, anatomy, pathology, and molecular development. *Child's Nervous System*, 28(1), 23-31.
- Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Shu, W. 2018. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive materials*, 3(3), 278-314.
- Wyles, C. C.; Houdek, M. T.; Behfar, A.; Sierra, R. J. 2015. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, 117.
- Zanzottera, F.; Lavezzari, E.; Trovato, L.; Icardi, A.; Graziano, A. 2014. 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.
