



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Aplicação de Bonelike® associado a células mesenquimatosas da polpa dentária humana em cirurgia ortopédica – revisão bibliográfica

Ana Rita Silva Coelho

Coimbra, julho 2020



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Aplicação de Bonelike® associado a células mesenquimatosas da polpa dentária humana em cirurgia ortopédica – revisão bibliográfica

Coimbra, julho 2020

Ana Rita Silva Coelho

Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora Anabela Almeida

Arguente: Professora Doutora Ana Colette Maurício

Orientador: Professora Doutora Sofia Duarte

Orientador Interno

Professora Doutora Sofia Duarte

Orientador(es) Externo(s)

Professor Doutor José Miguel Campos

Centro Cirúrgico Veterinário Assafarge

Doutor Artur Font

ARS Veterinaria

Dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Integrado
Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária da EUVG

Em memória dos que sempre me quiseram ver realizar
sonhos e não me puderam ver a realizar este. AC, AS, TM.

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Sofia Duarte, por todo o apoio, prestabilidade e orientação nestes últimos tempos.

Ao Professor Doutor José Miguel Campos e à Doutora Ana Luísa Pinto, os meus padrinhos da Veterinária, por toda a confiança, paciência, conhecimentos transmitidos e por estarem sempre presentes no final desta minha etapa.

Ao Doutor Artur Font e a todo o hospital ARS Veterinaria, em Barcelona, pela hospitalidade e disponibilidade durante o meu estágio.

Ao Sandro, ao João, à Rafaela, à Maria, à Andreia, ao Vítor, ao Ricardo e ao Pedro, o meu grupo de faculdade, por estarem sempre presentes neste últimos seis anos, nos bons e nos maus momentos, e por me apoiarem desde do primeiro dia.

À Adriana, à Rita, ao Carlos e ao Pedro, por serem os melhores amigos e apesar da distância nunca perderem os momentos mais importantes da minha vida, tanto académica como pessoal, e por me apoiarem incondicionalmente.

A todos os outros que fizeram parte desta caminhada e contribuíram para o meu percurso.

Aos meus pais, por todos os sacrifícios que fizeram para eu poder realizar o meu sonho e para que nunca me faltasse nada. Por todo o apoio, por nunca me deixarem desistir e me fazerem sempre acreditar que sou capaz.

E por fim, a Coimbra, esta tão nobre cidade e pela qual me apaixonei, por me acolher da melhor maneira possível, por me ter proporcionado momentos inesquecíveis, pessoas fantásticas e a sua memorável tradição. Agora confirmo que Coimbra tem mais encanto na hora da despedida. Para sempre saudade.

Índice

Agradecimentos	v
Índice.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Lista de Siglas	viii
Página de título	1
Resumo	2
<i>Abstract</i>	3
1. Introdução	4
2. Tecido ósseo	5
2.1. Morfologia e estrutura óssea	5
2.2. Formação e remodelação óssea	7
2.3. Cicatrização de fraturas ósseas	7
3. Biomateriais.....	9
3.1. Classificação	10
3.2. Substitutos ósseos sintéticos.....	11
3.3. Bonelike®	12
3.3.1. Composição	13
3.3.2. Estrutura e propriedades.....	14
3.3.3. Porosidade.....	14
4. Células estaminais	15
4.1. Células estaminais mesenquimatosas.....	17
4.2. Células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária humana	18
5. Aplicações clínicas em Veterinária	19
6. Conclusões.....	24
7. Referências Bibliográficas	26

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura interna do osso longo, com seção transversal ampliada do interior..	6
Figura 2 - Etapas da reparação da fratura..	8
Figura 3 - Categorização dos biomateriais ósseos.....	10
Figura 4 - Classificação das células estaminais	16

Lista de Siglas

BM-MSCs – células estaminais mesenquimatosas da medula óssea (do Inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*)

DPSCs – células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária (do Inglês *Dental Pulp Stem Cells*)

FTC – fosfato tricálcico

HA – hidroxiapatite

hDPSCs – células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária humana (do Inglês *Human Dental Pulp Stem Cells*)

MSCs – células estaminais mesenquimatosas (do Inglês *Mesenchymal Stem Cells*)

α – alfa

β – beta

Aplicação de Bonelike® associado a células mesenquimatosas da polpa dentária humana em cirurgia ortopédica – revisão bibliográfica

Ana Rita Coelho^a, José Miguel Campos^{a,b}, Artur Font^c, Sofia Duarte^a

^a Departamento de Ciências Veterinárias/ Centro de Investigação Vasco da Gama, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (rita.scoelho@hotmail.com; miguelestevesdecampos@hotmail.com; s.cancela.duarte@gmail.com;))

^b Centro Cirúrgico Veterinário Assafarge, R. Escola nº4, 3040-657, Assafarge, Coimbra, Portugal

^c ARS Veterinaria, Carrer dels Cavallers, 37, 08034 Barcelona, Espanha (arturfont@arsveterinaria.es)

Resumo

Nas últimas décadas verificou-se um alargamento da necessidade de utilização de autoenxertos ósseos. O recurso a enxertos ósseos é preconizado em inúmeras cirurgias sendo o tecido ósseo, na atualidade, o segundo tecido mais transplantado só ultrapassado pelo sangue e seus derivados. Os substitutos ósseos sintéticos têm sido alvo de investigação e desenvolvimento, visto que há uma necessidade de encontrar alternativas aos autoenxertos e aloenxertos. De facto estes podem apresentar inconvenientes, tais como a quantidade e disponibilidade limitada, morbilidade associada ao dador e a transmissão de doenças infectocontagiosas assim como de reações imunológicas. Estas limitações têm conduzido a uma procura sistemática e muito intensa de biomateriais para serem utilizados como substitutos ósseos sintéticos. Em resultado, a utilização clínica deste tipo de materiais aumenta anualmente.

Por outro lado, o uso de terapias celulares como o caso das células estaminais para a regeneração de tecidos vivos tem sido outro alvo de grande interesse em investigação.

A convergência destas duas áreas importantes, especificamente dos biomateriais e das células mesenquimatosas, tem sido perspectivada como uma estratégia promissora na Engenharia de Tecidos ósseos.

Esta dissertação consiste numa revisão bibliográfica, onde são realçados os conteúdos mais importantes no âmbito da Medicina Regenerativa, nomeadamente, a estrutura e a fisiologia do tecido ósseo, os substitutos ósseos sintéticos (especificamente o *Bonelike*[®]) e as terapias celulares para regeneração óssea, em particular as células mesenquimatosas da polpa dentária humana.

O objetivo principal do trabalho foi rever os aspetos teóricos que permitem e/ou condicionam o uso de biomateriais ósseos, numa perspetiva de compreensão da conjugação destes sintéticos ósseos com terapias celulares que promovam uma melhor e mais rápida regeneração óssea em animais de companhia. Foi igualmente pretendido rever, numa análise crítica, baseada em literatura recente, os desafios e oportunidades que a aplicação desta combinação apresenta em Medicina Veterinária.

Palavras-chave: biomaterial, terapias celulares, regeneração óssea, enxerto ósseo sintético, Bonelike[®], células estaminais mesenquimatosas.

Abstract

In the last decades there has been an increase in the need for the use of bone auto-grafts. The use of bone grafts is recommended in numerous surgeries and bone tissue is currently the second most transplanted tissue only surpassed by blood and its derivatives. Synthetic bone substitutes have been the target of research and development, since there is a need to find alternatives to auto- and allografts. The main drawbacks of auto- and allografts are limited quantity and availability, donor-associated morbidity and transmission of infectious diseases as well as immunological reactions. These limitations have led to a systematic and very intense demand for biomaterials to be used as synthetic bone substitutes. As a result, the clinical use of this type of material increases annually.

On the other hand, the use of cell therapies such as stem cells for the regeneration of living tissues has been another target of great interest in research.

The convergence of these two important areas, specifically biomaterials and mesenchymal cells, is considered a promising strategy in the engineering of bone tissues.

This dissertation consists of a literature review, highlighting the most important contents in the field of regenerative medicine, namely, the structure and physiology of bone tissue, synthetic bone substitutes, specifically Bonelike® and cell therapies for bone regeneration, in particular the mesenchymal cells of the human dental pulp.

The main objective of the work was to review the theoretical aspects that allow and/ or condition the use of bone biomaterials, in a perspective of understanding the combination of these bone synthetics with cell therapies that promote better and faster bone regeneration in companion animals. It was also intended to review, in a critical analysis, based on recent literature, the challenges and opportunities that the application of this combination presents in Veterinary Medicine.

Key-words: *biomaterial, cell therapies, bone regeneration, synthetic bone graft, Bonelike®, mesenchymal stem cells.*

1. Introdução

Atualmente, a proporção de idosos na população humana é a maior alguma vez registada estando estes predispostos a doenças ortopédicas crónicas e a fraturas ósseas, na maior parte das vezes de difícil cicatrização e/ou associadas a osteoporose (Almeida & Manolagas, 2020). Algumas situações de trauma bem como algumas doenças ósseas, sejam agudas ou crónicas, requerem tratamentos que envolvem enxertos ósseos. No entanto, devido às desvantagens associadas a estes enxertos recorre-se cada vez mais aos substitutos ósseos sintéticos, como os biomateriais, com propriedades de biocompatibilidade, osteoindução e osteocondução (Aslankoohi, Mondal, Rizkalla, & Mequanint, 2019). Adicionalmente, em traumatologia, é cada vez mais utilizado o uso combinado de células mesenquimatosas e fatores de crescimento, com os biomateriais, uma vez que estas células conferem osteogenecidade ao foco de fratura (laquinta *et al.*, 2019). O desenvolvimento de substitutos ósseos é justificado pelo facto do osso ser o segundo tecido mais transplantado no mundo, somente ultrapassado pelas transfusões de sangue e seus derivados (Armiento, Hatt, Sanchez Rosenberg, Thompson, & Stoddart, 2020; Neto & Ferreira, 2018). As reconstruções de defeitos ósseos são um desafio clínico e a procura do substituto ósseo ideal tem sido o alvo de investigação na área da Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos, não só em Medicina Humana como também em Medicina Veterinária (Brehm, Burk, Delling, Gittel, & Ribitsch, 2012; Gu, Bai, & Zhang, 2018). A Medicina Regenerativa tem como objetivo principal a reparação e substituição terapêutica de tecidos lesionados e degenerados por complexos celulares ou moleculares com estruturas e funções equivalentes. Por outro lado a Engenharia de Tecidos foca-se no estudo de materiais biologicamente compatíveis (naturais ou sintéticos) que podem ser utilizados no organismo sem as desvantagens da utilização de tecido autólogo (Travničková & Bačáková, 2018) em combinação com diferentes tipos de células para substituir partes de tecidos danificados (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2019). Assim, defeitos ósseos mais extensos e complexos, sob o ponto de vista biológico, podem ser reconstruídos e preenchidos com recurso a enxertos ósseos naturais ou por substitutos ósseos sintéticos (Oryan, Kamali, Moshirib, & Eslaminejad, 2017).

A terapia baseada em células foi um coadjuvante importante na procura de novas terapêuticas para doenças degenerativas, pela flexibilidade destas terapias em serem utilizadas isoladamente ou em terapia combinada com veículos de transporte como é o caso dos biomateriais sintéticos (Ocansey *et al.*, 2020). O uso de células estaminais mesenquimatosas (MSCs) humanas em associação com enxertos específicos pode garantir a regeneração do tecido ósseo (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018; laquinta *et al.*, 2019).

Recentemente, as células estaminais retiradas da polpa dentária humana têm vindo a ser isoladas, desenvolvidas e estudadas para posterior uso experimental e clínico (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2018). Estas células podem ser obtidas em segurança, sem morbilidade significativa ou preocupações éticas (Timothy, Samyuktha, & Brundha, 2019). O seu envolvimento no processo de cicatrização óssea é benéfico, principalmente em fraturas e preenchimento de locas, uma vez que o tipo de células diferenciadas após o isolamento de

células da polpa dentária é similar às células do osso (Oryan *et al.*, 2017). Com base em veículos biodegradáveis como os biomateriais sintéticos é possível transportar células estaminais para focos de fratura biologicamente debilitados, criando em conjunto uma estratégia moderna no âmbito da Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos para a reparação e regeneração óssea bem sucedida (Oryan *et al.*, 2017; Toosi, Behravan, & Behravan, 2018).

2. Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo dinâmico (laquinta *et al.*, 2019) que fornece suporte estrutural e mecânico ao organismo, proteção aos órgãos internos vitais, locais de fixação muscular para a locomoção e possui uma função endócrina importante, contribuindo para a homeostase mineral e balanço ácido-base (Hartmann & Yang, 2020; Sims & Martin, 2020a). É um reservatório natural de vários minerais como o cálcio, o fosfato e o magnésio (Ferron & Karsenty, 2020). Pode ser descrito como um composto hierárquico em várias escalas, composto por nanocristais de hidroxiapatite (HA), partes orgânicas (principalmente fibras de colagénio do tipo I) e água (Kosowska, Domalik-Pyzik, Krok-Borkowicz, & Chłopek, 2020).

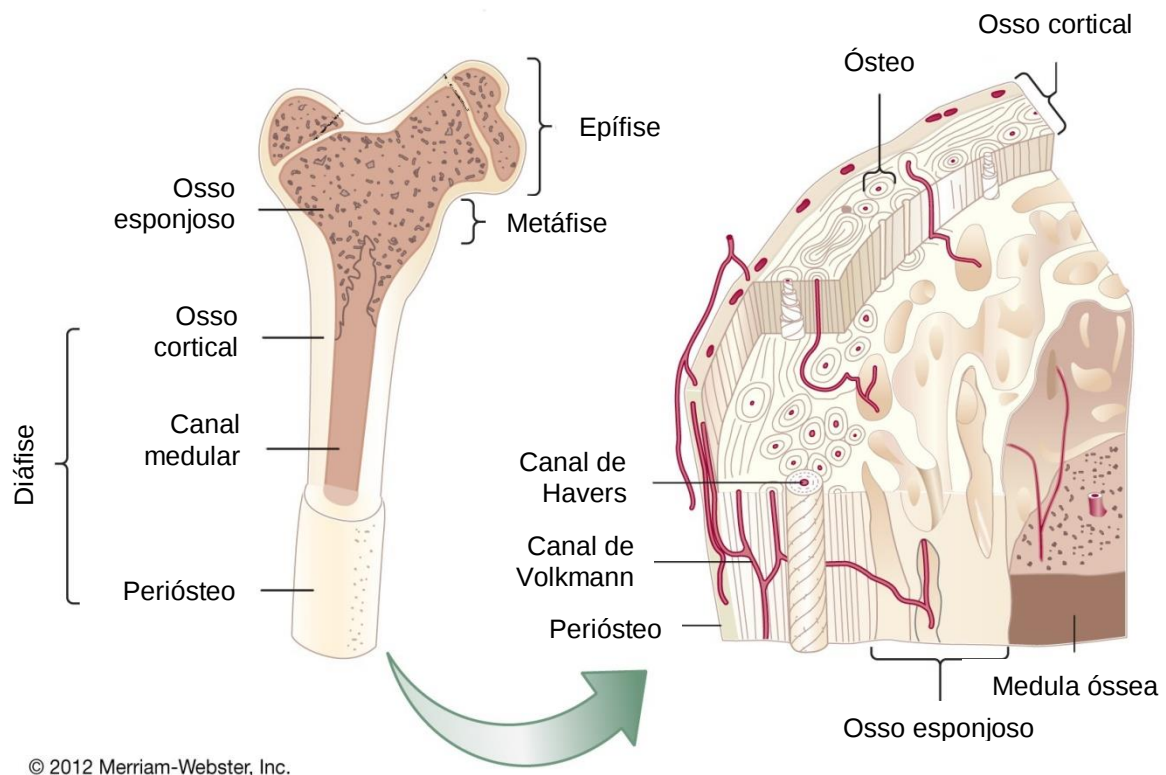
2.1. Morfologia e estrutura óssea

O tecido ósseo possui uma população diversificada de células que interagem entre si formando um tecido complexo, nomeadamente, osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Fornetti, Welm, & Stewart, 2018). Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação óssea, tendo como função a regulação da mineralização óssea, secretando e depositando proteínas da matriz óssea (Bellido, Plotkin, & Bruzzaniti, 2019). Os osteoclastos são responsáveis pela degradação e reabsorção de porções microscópicas de osso (Schlesinger *et al.*, 2020) e são capazes de regular outros processos através da produção de citocinas e pela sinalização celular (Leder & Wein, 2020). Os osteócitos são células que provêm de osteoblastos ancorados à matriz óssea e possuem uma durabilidade elevada, que pode chegar a décadas (Robling & Bonewald, 2020). Em cada ciclo de remodelação óssea existe um conjunto de osteoblastos que fica incorporado na matriz óssea, originando assim uma nova população celular de osteócitos no osso (Almeida & Manolagas, 2020).

O tecido ósseo é formado por duas componentes, uma componente mineral inorgânica, correspondente a cerca de 65% do peso do osso, e uma componente orgânica (Armiento *et al.*, 2020). A matriz orgânica é composta na sua maioria por colagénio e pequenas quantidades de proteínas não colagénicas, lípidos e água (Sims & Martin, 2020b).

A componente inorgânica ocupa dois terços da matriz óssea e contém fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, fosfato de magnésio, fluoreto de magnésio e outros minerais, aderidos à

sua estrutura (Armiento *et al.*, 2020). O componente mais prevalente da fase inorgânica é a HA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Iaquinta *et al.*, 2019) que confere ao osso a sua rigidez característica e resistência a forças compressivas (El Sayed, Nezwak, & Varacallo, 2018). A componente mineral e as fibras de colagénio, em combinação, dão ao osso resistência às forças de compressão, flexibilidade e resiliência (Armiento *et al.*, 2020). A matriz extracelular mineralizada é uma característica única do sistema esquelético (Murshed, 2018). Com base nas diferentes estruturas e organização pode-se distinguir dois tipos de osso: osso esponjoso e osso cortical (Figura 1).



© 2012 Merriam-Webster, Inc.

Figura 1 - Estrutura interna do osso longo, com secção transversal ampliada do interior (Adaptado de Encyclopaedia Britannica, 2015).

O osso cortical ou compacto, possui lamelas que estão organizadas de forma concêntrica à volta de um canal de Havers, formando uma estrutura denominada de ósteo. Os ósteos estão interligados, perpendicularmente, por canais de Volkmann (Poundarik, Boskey, Gundberg, & Vashishth, 2018). O osso cortical representa 80% da massa óssea e encontra-se na diáfise de ossos longos, em torno do osso esponjoso do corpo vertebral, na crista ilíaca e no crânio, com a intenção de providenciar suporte e protecção (Burr, 2019). A superfície externa deste tipo de osso é coberta por uma membrana fibrosa denominada de perióstio enquanto a superfície interna, que está em contacto com a medula óssea, é coberta pelo endóstio (Armiento *et al.*, 2020).

O osso esponjoso ou trabecular possui trabéculas que formam uma rede de colunas multidireccionais onde somente existe 20 a 25% de calcificação, sendo que o restante espaço é

ocupado por medula óssea (Armiento *et al.*, 2020; Neto & Ferreira, 2018). Encontra-se nas metáfises de ossos longos, nas vertebrae, costelas e crista ilíaca (Burr, 2019).

2.2. Formação e remodelação óssea

O desenvolvimento esquelético inicia-se na embriogénese e continua depois do nascimento. Ocorre através de dois processos que se distinguem pelo ambiente em que a ossificação é iniciada e pelo tipo de células que produz a matriz, sendo eles: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral (Allen & Burr, 2019).

A ossificação intramembranosa inicia-se quando células mesenquimatosas, derivadas da crista neural, se diferenciam em osteoblastos. Estes agrupam-se formando um centro de ossificação e começam a secretar matriz óssea não mineralizada que se liga ao cálcio (Breeland & Menezes, 2020). Esta matriz aprisiona alguns osteoblastos que passam a osteócitos e envolve os capilares, formando assim as trabéculas do osso esponjoso (Hartmann & Yang, 2020). As células da superfície interna do perióstio diferenciam-se em osteoblastos que formam o osso cortical (Allen & Burr, 2019).

A ossificação endocondral inicia-se quando as células mesenquimatosas da mesoderme se diferenciam em condrócitos. Estes proliferam e formam um modelo de cartilagem óssea, que inclui cartilagem hialina e passam a secretar matriz extracelular (Watanabe-Takano *et al.*, 2019). Esta matriz calcifica e impede a chegada de nutrientes aos condrócitos, que consequentemente sofrem apoptose. O espaço criado por esta apoptose permite o desenvolvimento de vasos sanguíneos que promove a chegada de células osteogénicas (Breeland & Menezes, 2020). Estas substituem, na diáfise, a cartilagem por osso e, simultaneamente, a cartilagem prolifera para as extremidades do osso, permitindo assim o aumento do osso em comprimento (Hartmann & Yang, 2020).

O osso humano, sendo um tecido dinâmico, tem a capacidade de todos os anos substituir uma parte do seu tecido, através de um processo conhecido como remodelação óssea (Armiento *et al.*, 2020), devido à sua alta capacidade de regeneração inata (Aslankoohi *et al.*, 2019). A remodelação óssea ocorre para providenciar ao esqueleto uma adaptação às alterações na carga e substituir tecido ósseo danificado e envelhecido (Sims & Martin, 2020a).

2.3. Cicatrização de fraturas ósseas

A fratura óssea ou uma osteotomia causam uma rutura no tecido ósseo que consequentemente leva à perda da continuidade anatômica e à instabilidade mecânica do osso (Li, Kacena, & Stocum, 2019). Fatores como a menor densidade óssea que ocorre em idosos (osteoporose), tumores, obesidade, diabetes, corticoterapia ou quimioterapia aumentam a incidência de fraturas e dificultam a sua cicatrização (Meinberg, Clark, Miclau, Marcucio, & Miclau, 2019).

A cicatrização de fraturas é um processo complexo que recapitula os fenômenos de desenvolvimento ósseo endocondral durante a embriogênese, e que exige a participação de vários tipos de células, incluindo osteoblastos, osteoclastos, células osteoprogenitoras, células inflamatórias e células endoteliais (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018).

Divide-se em três fases, inicialmente a fase inflamatória, a fase proliferativa e por fim a fase de remodelação (Armiento *et al.*, 2020) (Figura 2).

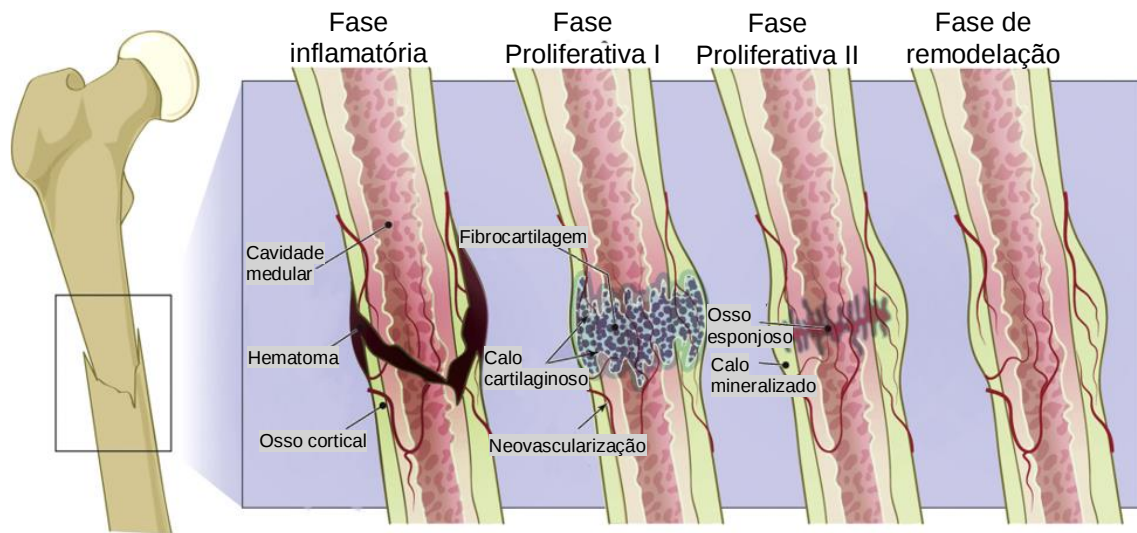


Figura 2 - Etapas da reparação da fratura (Adaptado de Li *et al.*, 2019).

Na fase inflamatória existe a formação de um hematoma e a liberação de mediadores e citocinas pró-inflamatórias por parte de células mortas, que recrutam e ativam células do sistema imunológico que, por sua vez, promovem o recrutamento e diferenciação de células osteoprogenitoras e MSCs (Rather, Jhala, & Vasita, 2019). A ação de células endoteliais, fibroblastos e osteoblastos diferenciados promove a formação de tecido de granulação, que substitui o hematoma, e a formação de calo ósseo primitivo em redor da fratura (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Na fase proliferativa ocorre neovascularização e formação de um calo cartilaginoso, no qual as células estaminais proliferam. Este calo mole posteriormente é mineralizado. Dá-se assim origem a um calo duro, por via de ossificação endocondral (Jones & Waterson, 2020). A fase de remodelação consiste na substituição gradual do calo duro por osso lamelar maduro (Armiento *et al.*, 2020).

A cicatrização de fraturas pode ocorrer através de dois processos biológicos distintos: cicatrização primária ou cicatrização secundária (Li *et al.*, 2019). A cicatrização primária ocorre num ambiente em que as extremidades ósseas são anatomicamente opostas e a tensão existente é inferior a 2%, existindo estabilidade absoluta. Ocorre através da remodelação direta de osso lamelar, dos canais de Havers e dos vasos sanguíneos, sem a formação de calo perióstio (Jones & Waterson, 2020). A cicatrização secundária ocorre quando há menor estabilidade no local da fratura e existe uma tensão entre 2% e 10%. É semelhante ao

processo de desenvolvimento ósseo embriogénico e está associado à formação de calos ósseos (Jones & Waterson, 2020).

Uma fratura pode ser considerada como curada quando a estabilidade óssea é restaurada pela formação de novo osso que preenche a área da fratura, mesmo que ainda não tenha adquirido a forma natural do osso (Li *et al.*, 2019).

Um defeito ósseo crítico é qualquer defeito ósseo que não cicatrize espontaneamente, durante a vida. Nestes casos devem ser utilizados enxertos ósseos ou biomateriais para preencher a não união ou o espaço sem osso (Bracey *et al.*, 2020). Os defeitos ósseos são comuns em clínica e a sua reconstrução é uma das maiores dificuldades em ortopedia (Yu *et al.*, 2020) por criarem um espaço vazio no osso que não se cura naturalmente sem reconstrução planeada e cirurgia secundária (Ercal & Pekozler, 2020). A localização anatómica, a percentagem de osso perdido e a integridade do tecido mole envolvente são fatores que determinam a sua definição (Aslankoochi *et al.*, 2019). Atualmente, para a reparação de defeitos ósseos utilizam-se vários métodos, entre eles, transplante de autoenxertos e aloenxertos ósseos, células estaminais e enxertos ósseos sintéticos (Yu *et al.*, 2020).

Para uma regeneração de fraturas ósseas sem união bem sucedida é necessário uma interação entre células estaminais, fatores de crescimento e citocinas para induzir a diferenciação de células estaminais, um enxerto bioactivo e biodegradável para apoiar a ligação, proliferação e crescimento celular, como também um suprimento vascular competente para fornecer necessidades essenciais (Toosi *et al.*, 2018).

3. Biomateriais

Acompanhando o progresso do desenvolvimento e das respetivas aplicações, a definição de biomaterial está em constante evolução (Bianchera, Catanzano, Boateng, & Elviri, 2020). Atualmente, considera-se que biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, exceto fármacos, de origem natural ou sintética, que é utilizado para reparar partes danificadas do corpo, substituindo componentes do organismo com o objetivo de apoiar a sua função fisiológica. Para isso, o biomaterial interage com células, tecidos ou órgãos e pode até realizar as suas funções (Bose, Ke, Sahasrabudhe, & Bandyopadhyay, 2018; Im, 2020).

Por existir uma interação dinâmica recíproca entre o biomaterial ósseo e o ambiente biológico, é necessário que exista biocompatibilidade, não sendo tóxico para o tecido hospedeiro. É necessário existir também suporte da atividade celular normal, osteocondução, osteoindução, osteointegração, angiogénese, porosidade adequada, capacidade de lidar com o *stress* mecânico e carga, boa capacidade mecânica e mimetizar o máximo possível os componentes naturais do corpo (Bianchera *et al.*, 2020; Prakasam *et al.*, 2017). Osteocondutividade significa que o biomaterial permite ao osso que este cresça na sua superfície e no seu interior, através de poros, canais ou tubos. A osteoindução é a capacidade de recrutar células pluripotentes e

as diferenciar em células osteogénicas. A osteointegração está relacionada com o contato direto entre o osso e o biomaterial (Chocholata, Kulda, & Babuska, 2019).

Além das características apresentadas, os biomateriais não devem representar riscos para o organismo, não devem ser mutagénicos, nem carcinogénicos, nem desencadear alergias e não devem afetar os órgãos circundantes (Biswal, BadJena, & Pradhan, 2020).

Têm sido realizados estudos científicos com o objectivo de identificar novos biomateriais que promovam o crescimento ósseo, em tempo limitado e de maneira personalizada (Jaquinta *et al.*, 2019). Nas últimas décadas têm sido desenvolvidos biomateriais como substitutos ósseos que necessitam de ser estudados e avaliados antes de serem utilizados em ensaios clínicos. É necessário utilizar modelos animais uma vez que a resposta em modelos *in vitro* nem sempre se replica no tecido de um animal vivo (Atayde *et al.*, 2014).

No caso de perda óssea, utilizam-se enxertos ósseos e a escolha do tipo é feita com base nas propriedades biomecânicas e composição química necessárias, no tamanho e no local do defeito ósseo (Prakasam *et al.*, 2017). Os enxertos funcionam como molde durante a deposição de tecido, facilitando a proliferação, migração e organização celular, ao simularem um ambiente em três dimensões semelhante ao nicho quem as células vivem (Borciani *et al.*, 2020).

3.1. Classificação

Os biomateriais ósseos podem ser categorizados, segundo a sua composição e segundo o seu comportamento biológico, baseado na interacção com o tecido hospedeiro (Figura 3).

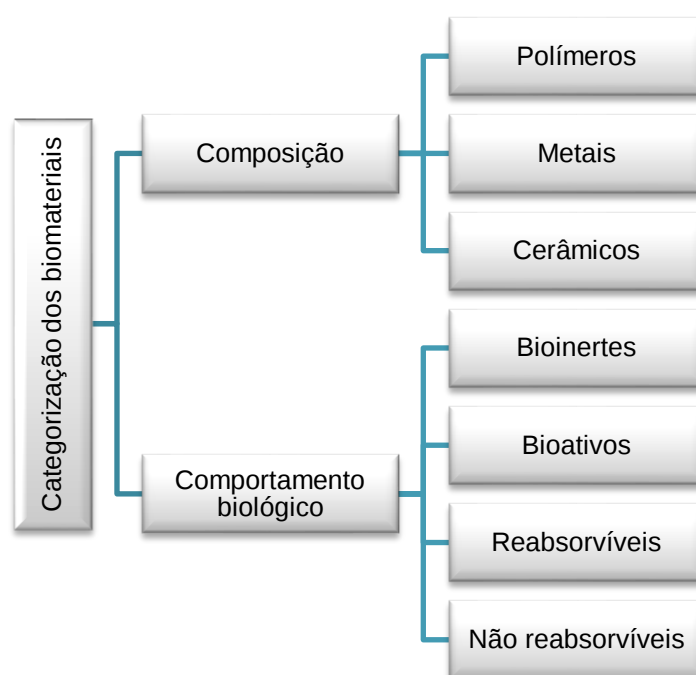


Figura 3 - Categorização dos biomateriais ósseos (Adaptado de Biswal *et al.*, 2020).

Com base na categorização representada na figura 3, o grupo dos metais é bioinerte, o grupo das cerâmicas é bioinerte, bioactivo e reabsorvível, enquanto que os polímeros são bioinertes e reabsorvíveis (Biswal *et al.*, 2020).

Os biomateriais estão divididos em três gerações. Na primeira geração têm a propriedade de biocompatibilidade, na segunda geração o objetivo é a biointeratividade, e na terceira geração os biomateriais são biorresponsivos (Chocholata *et al.*, 2019).

3.2. Substitutos ósseos sintéticos

Os enxertos ósseos, segundo a sua origem, podem ser naturais ou sintéticos. Incluem-se no grupo dos naturais os autoenxertos, os aloenxertos e os xenoenxertos (Markel, 2019). Um autoenxerto define-se como um enxerto ósseo colhido de um local e transplantado para outro local anatómico no mesmo indivíduo, enquanto um aloenxerto se refere a um enxerto ósseo colhido de um indivíduo e transplantado para outro indivíduo diferente (Wang & Yeung, 2017). Um xenoenxerto é um enxerto colhido e transplantado entre indivíduos de espécies diferentes (Kowalczewski & Saul, 2018). Enxertos ósseos naturais, como autoenxertos ou aloenxertos, continuam a ser considerados como *gold standard* para tratamentos de pacientes com cicatrização óssea lenta ou incompleta, devido às suas propriedades osteocondutoras, osteoindutoras e osteorregenerativas.

No entanto, os autoenxertos e os aloenxertos possuem algumas desvantagens (Armiento *et al.*, 2020; Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018). Os autoenxertos apresentam limitação de volume ósseo a ser recolhido, riscos cirúrgicos como hemorragias, inflamação, infeção e dor crónica, deformação do local de recolha, reações de hipersensibilidade e cicatrizes. As desvantagens dos aloenxertos são devidas à falta de dadores, custo elevado, risco de transmissão de agentes infecciosos ou rejeição do tecido. Para contrariar estas limitações são necessárias estratégias terapêuticas alternativas à base de biomateriais sintéticos e direccionadas à cicatrização óssea (Armiento *et al.*, 2020; Iaquina *et al.*, 2019). Assim, o uso de enxertos ósseos sintéticos como método de Engenharia de Tecidos tornou-se uma ferramenta em consideração para o tratamento de defeitos ósseos e para outras aplicações ortopédicas (Kowalczewski & Saul, 2018).

O substituto ósseo sintético deve mimetizar a estrutura, a mecânica e a biologia da matriz extracelular natural do osso. Deve agir como um suporte de três dimensões para possibilitar a adesão e a proliferação celular, orientando a formação de novo tecido ósseo (Aslankoohi *et al.*, 2019). Assim, deve ser osteocondutor, para possibilitar a migração e a adesão de células à sua superfície e, eventualmente, no seu interior, para estabelecer uma nova matriz (Weber, 2019). Para que haja migração celular, remoção de metabolitos, angiogénese e passagem de nutrientes e oxigénio deve possuir uma adequada porosidade e interconectividade (Aslankoohi *et al.*, 2019). Deve ser osteoindutor para que seja possível recrutar MSCs através de sinais biomoleculares com o objetivo destas se diferenciarem em células osteoprogenitoras e induzirem a formação de novo tecido ósseo (Markel, 2019). Adicionalmente, o substituto ósseo

sintético deve ser biodegradável e a taxa de degradação deve ser compatível com a taxa de formação óssea para prevenir a formação de grandes lacunas e instabilidade mecânica, caso a taxa de degradação seja mais rápida, ou para prevenir a dificuldade de infiltração de células e nutrientes, caso a taxa de degradação seja mais lenta (Aslankoohi *et al.*, 2019). Deve ser de fácil utilização e de baixo custo (Markel, 2019).

Dentro dos materiais sintéticos, os materiais cerâmicos são os que possuem propriedades materiais e mecânicas mais idênticas à composição mineral do osso (Kowalczewski & Saul, 2018). Possuem a vantagem de ser biocompatíveis com o organismo e resistentes à compressão (laquinta *et al.*, 2019). Recentemente têm sido utilizados como compósito com polímeros naturais, com o objetivo de obter as propriedades benéficas de cada material (Kowalczewski & Saul, 2018). As cerâmicas destinadas a entrar em contacto com o tecido vivo denominam-se de biocerâmicas e tiveram um enorme desenvolvimento nas últimas décadas (Vallet-Regí & Salinas, 2019). Relativamente à sua reatividade com o organismo vivo, podem ser classificadas como quase bioinertes, bioactivas e reabsorvíveis (Vallet-Regí & Salinas, 2019). No mercado, encontram-se disponíveis nas formas de implantes porosos, implantes densos não-porosos e partículas granulares com poros (Wang & Yeung, 2017). Os materiais biocerâmicos mais comuns utilizados na Engenharia de Tecidos são à base de fosfato de cálcio, incluindo o FTC, a HA e os seus compósitos (Gu *et al.*, 2018). Estes, quando aplicados à regeneração óssea, são caracterizados por uma alta rigidez mecânica, baixa elasticidade e fragilidade, o que pode causar problemas na carga mecânica e na taxa de degradação (Chocholata *et al.*, 2019). A HA possui excelente bioactividade, biocompatibilidade e osteocondutividade. Não apresenta características tóxicas e é benéfica para a reconstrução óssea porque estimula fatores de crescimento e MSCs endógenas, tal como serve de guia para o crescimento de novo osso (Chocholata *et al.*, 2019).

3.3. Bonelike®

Santos e col. (1996) desenvolveram um substituto ósseo sintético composto por fosfato de cálcio modificado com porções controladas de HA, FTC na fase alfa (α) e beta (β), incorporados homogeneamente na sua matriz e uma adição de base vítrea (Santos, Jha, & Monteiro, 1996). Esta mistura resulta numa microestrutura com propriedades mecânicas e bioactividade mais aprimoradas em comparação com a HA comercial (Atayde *et al.*, 2015). Foi patenteado pela Biosskin Molecular and Cell Therapies S.A. e está disponível comercialmente como Bonelike® (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018). É um material cerâmico de origem sintética que não apresenta qualquer risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas ("Biosskin, Molecular and Cell Therapies, S.A.," 2020).

O principal benefício é o controlo da sua força compressiva e taxa de reabsorção, considerando que o FTC é mecanicamente mais fraco que a HA e que a reabsorção da cerâmica aumenta com o rácio FTC/HA. Apresenta melhor adesão óssea, proliferação e

diferenciação celular e é reabsorvido gradualmente num ambiente controlado, como acontece na remodelação óssea natural (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018).

Acresce que, com a inclusão do vidro é possível incorporar iões diferentes na matriz de HA, como magnésio, sódio e fluoreto, resultando numa composição química mais parecida com o osso. Durante a dissolução do material, a libertação desses iões pode atuar como catalisador para a formação óssea e precipitação da camada de apatite adjacente à superfície do material (Atayde *et al.*, 2015).

Este substituto ósseo sintético, está indicado para ser aplicado em não-uniões, atrasos de união, mal uniões, defeitos ósseos, tumores e artrodeses (Campos, Sousa, Pinto, *et al.*, 2018). Já ultrapassou a fase de ensaios pré-clínicos e pode ser utilizado para aplicações veterinárias (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018).

Para ter uma aplicação minimamente invasiva, o Bonelike[®] possui apresentações de grânulos esféricos, que permitem e facilitam a extrusão através de uma seringa e uma melhor adaptação ao defeito ósseo. Os grânulos poligonais e esféricos do Bonelike[®] apresentam propriedades osteocondutoras, melhor osteointegração, osteocondução e degradação devido à presença de poros maiores e um formato de partículas adequado que se pode adaptar ao crescimento ósseo (Campos, Sousa, Pinto, *et al.*, 2018).

3.3.1. Composição

A estrutura do Bonelike[®] apresenta uma arquitetura tridimensional e uma composição complexa que mimetiza a composição mineral natural do osso (Campos, Sousa, Pinto, *et al.*, 2018).

A HA sintética é considerada um biomaterial adequado para regeneração óssea por ser biocompatível, osteocondutor, bioactivo, ter elevada afinidade por proteínas e fatores de crescimento, possuir resistência ao desgaste e ser leve. Apesar de ser mais rígida e forte, é mais quebradiça, o que limita o uso da HA sintética em situações onde não há suporte físico para a HA. Possui uma forma termodinamicamente mais estável e consequentemente uma solubilidade muito menor comparada com a HA natural e portanto, uma taxa de reabsorção mais lenta que a taxa de regeneração óssea (Owen, Dard, & Larjava, 2018). Estas limitações justificam o desenvolvimento de fórmulas para melhorar a HA, nomeadamente a combinação com substâncias mais solúveis que aumentem a sua taxa de reabsorção (Atayde *et al.*, 2015), como o FTC, sintetizando uma formulação bifásica de fosfato de cálcio (Owen *et al.*, 2018). Esta combinação permite melhor controlo da atividade biológica, demonstrando vantagens em comparação com outros tipos de biocerâmicas de fosfato de cálcio e estabilidade dos biomateriais na promoção do crescimento ósseo (Gu *et al.*, 2018). A incorporação de HA de reabsorção lenta com FTC de reabsorção rápida promove uma matriz osteocondutora que possui espaço para o novo tecido ósseo com uma taxa de reabsorção que varia com a taxa de reabsorção do FTC. Quando se utiliza um maior conteúdo de HA, a taxa de degradação é menor e a segurança da manutenção do volume é maior, enquanto o FTC é gradualmente

reabsorvido e substituído por formação de novo tecido ósseo (Pripatnanont, Praserttham, Suttapreyasri, Leepong, & Monmaturapoj, 2016).

Os substitutos ósseos sintéticos à base de FTC são compostos por 39% cálcio e 20% de fósforo. Existem duas fases de FTC, o α -FTC e o β -FTC (Rey *et al.*, 2017). O α -FTC é menos denso, mais frágil e requer uma temperatura de formação mais alta, enquanto que o β -FTC é o mais popular e necessita de uma temperatura de formação menor. Acresce que possui características estruturais e propriedades mecânicas e biológicas mais favoráveis, nomeadamente osteocondução, osteointegração, osteoindução e promovendo o desenvolvimento de tecido vascular (Ribas *et al.*, 2019).

O Bonelike[®] é um material trifásico composto por HA, α - e β -FTC que compreende as propriedades físico-químicas de cada composto. A sua produção garante uma distribuição homogênea das fases FTC na malha de HA, o que permite um controlo da reabsorção e substituição óssea, dependendo da proporção dos componentes ("Biosskin, Molecular and Cell Therapies, S.A.," 2020).

3.3.2. Estrutura e propriedades

As propriedades ósseas naturais são utilizadas como modelo no desenvolvimento de substitutos ósseos ideais, especialmente no que se refere às propriedades osteocondutoras, osteogénicas e osteoindutoras (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018).

Embora apresente uma resistência mecânica à flexão duas vezes superior à fase pura de HA, o Bonelike[®] não deve ser utilizado para exercer a função de suporte de carga. A presença de α - e β -FTC proporciona uma melhor estabilização mecânica inicial do defeito ósseo e à medida que o biomaterial é dissolvido, inicia-se o processo de formação de cristais biológicos no interior dos microporos, o que aumenta a resistência mecânica devido à substituição por novo tecido ósseo ("Biosskin, Molecular and Cell Therapies, S.A.," 2020).

Tem como vantagem a possibilidade de ser produzido à medida, com diferentes quantidades de HA ou FTC, dependendo da sinterização, temperatura, quantidade de vidro e composição utilizada (Atayde *et al.*, 2015).

3.3.3. Porosidade

A porosidade permite a ligação celular, o que facilita a regeneração do tecido, o crescimento, a proliferação e a diferenciação celular, tal como a difusão de resíduos e produtos da degradação do substituto ósseo. O tamanho dos poros deve ser suficientemente grande para permitir a migração celular e suficientemente pequeno para que possa existir ligação das células ao substituto ósseo (Chocholata *et al.*, 2019).

Existem vários métodos para produzir poros com diferentes diâmetros, sendo que o método selecionado tem uma grande influência na estrutura porosa e no desempenho final do biomaterial ósseo (Gao, Peng, Feng, & Shuai, 2017).

A otimização da arquitetura dos biomateriais inclui a otimização da micro- e macroporosidade, tamanho e interconetividade dos poros para replicar a porosidade do osso esponjoso ou cortical natural (Ho-Shui-Ling *et al.*, 2018).

O Bonelike[®] possui uma microporosidade que melhora a adesão celular. Possui também uma macroporosidade que permite o crescimento ósseo e a vascularização, imprescindível para o aumento da taxa de formação de novo osso. Atua como uma ponte estrutural para a regeneração do osso enquanto que as células crescem no interior dos canais porosos. É necessário um diâmetro dos poros igual ou superior a 100 µm para que ocorram crescimento de capilares e interações entre as células osteoprecursoras e o biomaterial, fundamental para o crescimento e reorganização celular dentro da esfera. A microporosidade, macroporosidade e o grau de interconectividade das esferas de Bonelike[®] afetam diretamente a difusão dos gases e nutrientes presentes nos fluidos fisiológicos, bem como a remoção de resíduos metabólicos ("Biosskin, Molecular and Cell Therapies, S.A.," 2020)

4. Células estaminais

As células estaminais podem servir como reservatório de novas células que produzem, mantêm, reparam ou regeneram tecidos (Laplane & Solary, 2019). Desempenham um papel essencial na homeostase, reparação e regeneração de tecidos devido à sua capacidade de proliferar, auto-renovar e diferenciar em diferentes linhagens celulares. Residem em microambientes especializados que condicionam as suas performances de desenvolvimento e mantêm as suas principais potencialidades (Monterubbianesi *et al.*, 2019).

As células estaminais podem ser classificadas tendo em conta o seu potencial para se diferenciarem e a sua origem, como representado na figura 4 (Oliva, Florentino, Bardag-Gorce, & Niihara, 2019).

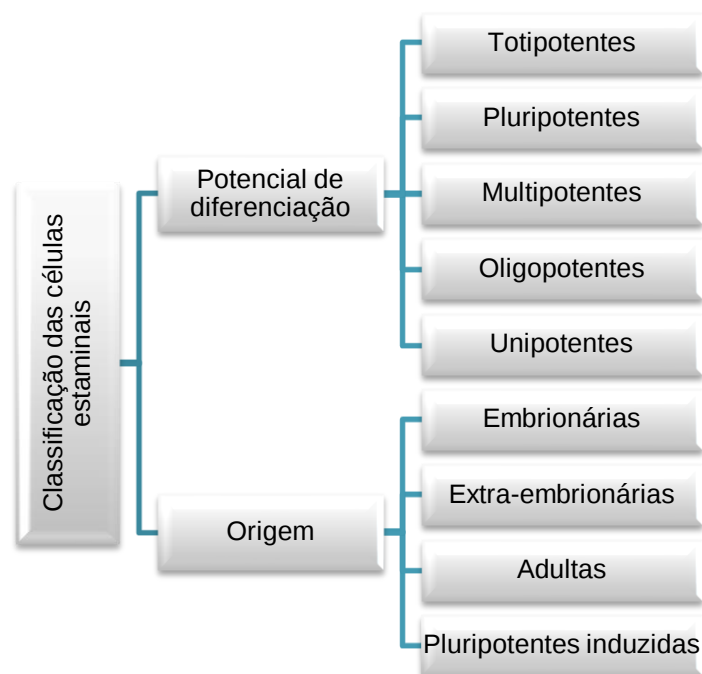


Figura 4 - Classificação das células estaminais (Adaptado de Hussein *et al.*, 2020).

As células estaminais totipotentes têm a capacidade máxima de diferenciação e originam estruturas embrionárias e extra-embrionárias. As células estaminais pluripotentes têm a capacidade de originar estruturas embrionárias, como as três camadas germinativas, mas não têm a capacidade de originar estruturas extra-embrionárias. As células estaminais multipotentes podem-se diferenciar em linhagens celulares específicas, enquanto as células estaminais oligopotentes têm a capacidade de se diferenciarem numa única linhagem específica. Por fim, as células unipotentes possuem a capacidade de diferenciação num tipo específico de célula e de divisão repetida (Hussein *et al.*, 2020; Zakrzewski, Dobrzyński, Szymonowicz, & Rybak, 2019).

As células estaminais embrionárias estão presentes no desenvolvimento do embrião e são conhecidas pelo seu potencial de diferenciação toti- e pluripotente. Contudo possuem uma série de inconvenientes no âmbito da terapia celular, como a obtenção complicada, potencial oncogénico e as limitações morais e legislativas para o seu uso. As células estaminais extra-embrionárias estão localizadas nos anexos extra-embrionários, como o âmnio, a placenta e o cordão umbilical e são fontes não invasivas de vários tipos de células estaminais com potencial de diferenciação multipotente e imunogenicidade nula, com a vantagem de potencial uso alogénico. As células estaminais adultas são células que estão presentes em vários tecidos no indivíduo adulto e podem ser hematopoiéticas, neurais, cardíacas, hepáticas, pancreáticas, límbicas, da crista neural, mesenquimatosas, entre outras (Jiménez & Guerrero, 2017). Com tecnologia recente, como técnicas transgénicas, é possível originar células estaminais pluripotentes a partir de células de tecido adulto, conhecidas como células estaminais pluripotentes induzidas (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2019).

O uso de células estaminais como terapia celular é baseado na ideia de que células estaminais administradas num local de lesão se podem diferenciar em células específicas do ambiente local, apoiando a regeneração do tecido danificado (Monterubbianesi *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de enxertos visa promover a viabilidade e diferenciação de células estaminais implementadas no seu interior, dependendo de propriedades intrínsecas do biomaterial e também da incorporação de substâncias específicas, químicas e físicas, no biomaterial (Willerth & Sakiyama-Elbert, 2019).

4.1. Células estaminais mesenquimatosas

As MSCs são alternativas promissoras às células estaminais embrionárias, na Medicina Regenerativa e terapia clínica (Feng *et al.*, 2020). São células estaminais multipotentes com potencial para se diferenciarem em diferentes linhagens mesodérmicas, como adipócitos, condrócitos, osteoblastos, hepatócitos, mioblastos, células endoteliais e células de músculo liso (Monterubbianesi *et al.*, 2019; Oliva, 2019).

Existem três requisitos mínimos, segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, na definição de células como MSCs: devem possuir aderência ao plástico em condições normais de cultura; devem expressar marcadores de superfície como CD73, CD90 e CD105 e não expressar marcadores específicos como CD11b, CD14, CD19, CD79α, CD45, CD34 e HLA classe II; devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos *in vitro* (Dias *et al.*, 2019; Regmi, Pathak, Kim, Yong, & Jeong, 2019). Podem ser isoladas da gengiva, polpa dentária, tecido periodontal, cordão umbilical, líquido amniótico, geleia de Wharton, tecido adiposo, medula óssea, músculo esquelético e tecido hepático (Missoum, 2020).

As MSCs são capazes de migrar e residir em tecidos distantes, contribuir para a imunomodulação, diminuir a inflamação e estimular a angiogénese. Possuem ainda propriedades antioxidantes (Gugjoo *et al.*, 2019). A combinação do potencial de diferenciação com a facilidade de isolamento, manipulação e expansão *in vitro*, favorece o sucesso nos ensaios clínicos (Monterubbianesi *et al.*, 2019). Possuem propriedades imunorreguladoras que resultam da expansão de linfócitos T para um fenótipo regulado e alteração do fenótipo de macrófagos para anti-inflamatório e imunossupressor. Têm ainda a capacidade de inibir células apresentadoras de antígenos, inibir a maturação de células dendríticas e suprimir a função de células *Natural Killer*, linfócitos B e linfócitos T-memória. Desta forma, é menor a probabilidade das MSCs serem rejeitadas pelo sistema imunológico do paciente recetor (Missoum, 2020).

As células estaminais mesenquimatosas da medula óssea (BM-MSCs; do Inglês *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) são muito utilizadas na Engenharia de Tecidos devido à sua capacidade de proliferação, elevado poder de diferenciação e boa capacidade osteogénica. Mas possuem as desvantagens de serem difíceis de adquirir, levando a maior trauma e outras complicações, o que dificulta a obtenção de resultados nas aplicações clínicas (Gu *et al.*, 2018). As hDPSCs permitem contornar estas desvantagens uma vez que são mais fáceis de

obter, com um processo de recuperação do trauma mais curto e menos dispendioso (Gu *et al.*, 2018).

O tipo de células estaminais e os compostos utilizados na sua diferenciação são fatores importantes e para além disso, a Engenharia de Tecidos requer o desenvolvimento de enxertos para o transplante. Diferentes biomateriais foram desenvolvidos e as suas propriedades químicas e físicas devem ser levadas em consideração tendo em conta o tipo de órgão, as propriedades de suporte e rigidez, bem como a diferenciação das células estaminais (Oliva *et al.*, 2019).

O uso de biomateriais osteocondutivos com MSCs permite a sinergia das propriedades do biomaterial com a capacidade proliferativa e diferenciação das células (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018).

4.2. Células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária humana

A polpa dentária está localizada no epicentro do dente, envolvida por dentina e possui componentes celulares como fibroblastos, precursores de odontoblastos, células endoteliais, neurónios, hDPSCs e células imunológicas, que fornecem nutrição e controlam reações biológicas (Gopinath, Soumya, & Jayakumar, 2019; Okamoto *et al.*, 2020).

As hDPSCs apresentam uma morfologia semelhante a fibroblastos e representam uma população altamente heterogénea com elevada capacidade de proliferação, de diferenciação e de imunossupressão (Martellucci *et al.*, 2019; Moonesi Rad *et al.*, 2019).

O núcleo polposo de dentes decíduos, pré-molares e molares saudáveis extraídos em tratamentos ortodônticos são boas fontes de células mesenquimatosas da polpa dentária humana e adequadas para utilização em Engenharia de Tecidos (Gu *et al.*, 2018; Hussein *et al.*, 2020).

Expressam marcadores específicos para MSCs, como CD29, CD44, CD90, CD73, CD105, CD106, CD146 e STRO-1, e não expressam marcadores hematopoiéticos, como CD14, CD19, CD34, CD40, CD45, CD80 e CD86. São capazes de diferenciação *in vitro* (Martellucci *et al.*, 2019; Moonesi Rad *et al.*, 2019). Podem-se diferenciar em linhagens celulares como odontogénicas, osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas, vasculares, neurogénicas, endoteliais, epiteliais, pancreáticas, miofibroblásticas e hepatócitos (Shi, Mao, & Liu, 2020).

São candidatas para a terapia celular regenerativa pela conveniência da recolha a partir de dentes sem a preocupação ética, pela atividade imunossupressora e pela possibilidade de criopreservação sem afetar as suas propriedades de diferenciação. Podem também ser recolhidas de um paciente, armazenadas e posteriormente ser transplantadas como enxerto autólogo (Monterubbiansi *et al.*, 2019). Têm potencial para ser utilizadas como apoio em reconstruções ortopédicas e preenchimento ósseo da cavidade oral e fora da cavidade oral (Zakrzewski *et al.*, 2019). Possuem elevada interatividade com biomateriais utilizados em Engenharia de Tecidos (Missoum, 2020), não esquecendo que o ambiente onde são inseridas

tem um papel fundamental, não só no suporte da sobrevivência celular, mas também porque fornece condições ideais para a síntese de matriz (Bu *et al.*, 2020).

A quantidade de células estaminais existentes na polpa dentária e o seu potencial de regeneração dependem da idade do indivíduo. As células de indivíduos mais jovens ou tecidos imaturos têm maior potencial de proliferação e exibem diferentes capacidades de diferenciação, quando comparadas com indivíduos adultos ou tecidos totalmente desenvolvidos. Contudo, apresentam menor capacidade de mineralização (Caseiro *et al.*, 2017).

5. Aplicações clínicas em Veterinária

A Engenharia de Tecidos é uma abordagem promissora atual para a regeneração óssea e o seu sucesso depende de enxertos tridimensionais, que devem hospedar e orientar a formação óssea através de percursos de células ósseas (Borciani *et al.*, 2020).

Com o aumento do número de animais de companhia, as fraturas em cães, gatos e cavalos de desporto, derivadas maioritariamente de traumas como atropelamentos, quedas altas e competições, respetivamente, constituem um problema frequente (Ali, 2013). Os distúrbios músculo-esqueléticos representam grande parte dos casos clínicos na prática veterinária, pelo que as terapias regenerativas na ortopedia recebem particular atenção. O foco actualmente são as MSCs e o seu potencial na Medicina Regenerativa, que já é utilizado, por exemplo, para terapias em tendinopatias equinas ou para a degeneração da cartilagem em cães (Brehm *et al.*, 2012). Desde os primórdios do estudo das células estaminais, têm sido desenvolvidas novas e melhoradas técnicas de extração, cultura e expansão de MSCs, permitindo que estas células, mesmo derivadas de vários tecidos, sejam actualmente capazes de se diferenciar em osteócitos (Han *et al.*, 2019). As MSCs têm sido amplamente propostas como fonte viável e fácil de células progenitoras de osteoblastos durante a formação de osso com a utilização de engenharia de implantes (Perez *et al.*, 2018). Para uma abordagem clínica baseada em terapia celular o foco é colocado na tríade da Engenharia de Tecidos (células estaminais, moléculas bioactivas e enxertos) para caracterizar as células estaminais mesenquimatosas da polpa dentária (DPSCs; do Inglês *Dental Pulp Stem Cells*) (Tsutsui, 2020).

A odontologia está na vanguarda da investigação no que diz respeito à terapia regenerativa, uma vez que é na região craniofacial que estas terapias clínicas foram primeiro aplicadas. Os biomateriais, tradicionalmente, são testados na zona craniofacial e em dentes antes de serem utilizados noutras partes do corpo, devido ao fácil acesso e por serem relativamente mais pequenos e possuírem menos suporte de carga (Yamada, Nakamura-Yamada, Konoki, & Baba, 2020). As DPSCs têm tido um grande avanço na Engenharia de Tecidos e na Medicina Regenerativa. São utilizadas não só para regeneração odontológica como também para extensas aplicações extra-orais (Shi *et al.*, 2020).

As DPSCs são fontes acessíveis de células estaminais derivadas da crista neural com capacidade de se diferenciarem em múltiplas linhagens (Coates, Alansary, Friedlander, Zanicotti, & Duncan, 2019). Recentemente, Monterubbianesi e col. (2019) compararam o potencial de diferenciação, *in vitro*, de hDPSCs, com duas populações de fibroblastos humanos, provenientes da gengiva e do prepúcio. Observaram que as hDPSCs formaram um plexo denso de mineralização, destacando-se assim da formação de aglomerados pouco mineralizados por parte dos fibroblastos do prepúcio e da não formação de mineralização dos fibroblastos gengivais. Observaram igualmente que, quando cultivados num meio adipogénico, os dois tipos de fibroblastos têm a capacidade de formar gotas lipídicas enquanto as células da polpa dentária não possuem essa capacidade. Relativamente ao padrão de expressão de marcadores, foi sugerido que os fibroblastos são incapazes de diferenciação osteogénica. Sugeriram assim que os fibroblastos são mais propensos a diferenciação adipogénica enquanto as células da polpa dentária possuem um maior potencial osteogénico sendo a população celular mais apropriada para fins regenerativos que envolvam tecidos ósseos e dentários (Monterubbianesi *et al.*, 2019).

Luke e col. (2020) realizaram um estudo com o objetivo de isolar células estaminais a partir de hDPSCs, *in vitro*, e estudar a sua proliferação e diferenciação em linhagens neurogénicas, osteogénicas e adipogénicas. Verificaram que as hDPSCs se diferenciam em células osteogénicas quando cultivadas em meio específico, *in vitro*, e identificaram a presença de osteócitos e depósitos de cálcio e fosfato. Sugeriram que as células estaminais cultivadas *in vitro* a partir da polpa dentária possuem alta capacidade proliferativa e capacidade de se diferenciar em células neurais, adipócitos e osteócitos, fornecendo uma nova abordagem de terapias celulares em doenças neurodegenerativas e na regeneração óssea (Luke *et al.*, 2020). Foram realizados vários estudos com o intuito de avaliar a ação das MSCs na regeneração de tecidos e os resultados foram promissores e indicativos da eficácia destas células (Han *et al.*, 2019). Soares e col. (2018) elaboraram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito inflamatório e a capacidade de formação óssea de uma esponja de colagénio com hDPSCs e *Aloe vera*, implementada em falhas cirúrgicas estéreis de ratos. Sugerem as hDPSCs, num ambiente biológico favorável, têm a capacidade de proliferar e se diferenciar em osteoblastos, resultando num menor tempo de cura do defeito ósseo (Soares *et al.*, 2019).

As MSCs de origem dentária possuem um fenótipo, *in vitro*, semelhante às BM-MSCs, aumentando o seu interesse como fonte de MSCs alternativa para aplicações em Medicina Regenerativa (Ayoub, Berbéri, & Fayyad-kazan, 2020). De facto, um ensaio pré-clínico (Timothy *et al.*, 2019) demonstrou que as hDPSCs expressavam uma capacidade de proliferação superior às BM-MSCs. Lee e col. (2019) realizaram um estudo que consistiu, primeiro na comparação de BM-MSCs com DPSCs e, em seguida, na avaliação da combinação de cada uma destas com enxertos ósseos como promotores de melhorias na regeneração óssea, em defeitos ósseos de calvários de coelhos. Os resultados, *in vitro*, mostraram que as BM-MSCs possuem um potencial de diferenciação osteogénica superior. Ainda assim, as DPSCs possuem morfologia, capacidade proliferativa, expressão de marcadores de superfície,

diferenciação e, *in vivo*, capacidade regenerativa semelhante às BMCs. A comparação revelou também que as DPSCs conseguem sobreviver mais tempo *in vitro*, exibem uma taxa de crescimento maior e produzem matriz extracelular com menor atividade imunossupressora. Relativamente à utilização conjunta do enxerto ósseo com os dois tipos de células, os resultados demonstraram que as características osteoindutoras do enxerto foram promovidas tanto pela adição de BM-MSCs como de DPSCs, revelando capacidades similares de regeneração para reparar os defeitos ósseos craniofaciais. Sugeriram que as BM-MSCs e as DPSCs fornecem igualmente um bom suporte na promoção da regeneração óssea de defeitos em ossos calvários, sendo indicativo de que as DPSCs podem ser uma excelente fonte de MSCs para regeneração de defeitos craniofaciais (Lee, Chan, Hsieh, Lew, & Feng, 2019).

A capacidade de formação óssea das hDPSCs tem vindo a ser estudada em modelos animais e tanto os enxertos como os fatores de crescimento suplementares parecem ser pré-requisitos necessários para que estas células participem na regeneração óssea (Bartold, Gronthos, Haynes, & Ivanovski, 2019). A maioria dos estudos realizados na área da Engenharia de Tecidos, em defeitos ósseos de modelos animais, são dirigidos à aplicação em humanos. Ainda assim existem estudos que suportam a aplicabilidade das MSCs como terapia de Engenharia de Tecidos na Medicina Veterinária (Nantavisai, Egusa, Osathanon, & Sawangmake, 2019). Há evidências da viabilidade da utilização de MSCs para aumentar a reparação de defeitos ósseos em animais de laboratório, cães, ovelhas e cabras (Gade *et al.*, 2012). Em cães, foram abordados com sucesso defeitos ósseos críticos quando se recorreu à utilização de MSCs em combinação com substitutos ósseos de HA melhorada e FTC ou plasma rico em plaquetas (Brehm *et al.*, 2012).

O valor terapêutico das MSCs na Engenharia de Tecidos e na Medicina Regenerativa é atribuído, também, a vias parácrinas desencadeadas por fatores secretados nos meios de cultura. Estes fatores secretados têm o nome de secretoma (Rhatomy, Sumarwoto, Prijosedjati, Romaniyanto, & Prasetyo, 2020). Castellanos e col. (2020) desenvolveram um estudo com o objetivo de avaliar a eficácia do meio condicionado das MSCs na regeneração óssea em modelos animais e modelos humanos. Relataram que, nos modelos animais, o meio condicionado das MSCs aumentou significativamente a regeneração de defeitos ósseos comparativamente aos grupos de controlo. No que diz respeito aos modelos humanos, foi descrito que ocorreu mineralização precoce em ossos regenerados e não ocorreu reabsorção óssea, inflamação nem alterações locais ou sistémicas. Desta forma, os autores sugeriram que a aplicação do meio condicionado das MSCs em defeitos ósseos tem um efeito positivo e favorável, principalmente em modelos animais (Benavides-Castellanos, Garzón-Orjuela, & Linero, 2020).

A identificação de fontes alternativas de MSCs é altamente benéfica para o desenvolvimento de futuras terapias celulares (Feng *et al.*, 2020). Por exemplo, o tecido adiposo é rico em MSCs e, por tanto, tem também grande potencial para a Engenharia de Tecidos, uma vez que se pode diferenciar em várias linhagens, como osteoblastos, condrócitos, fibroblastos e adipócitos. Pode ser colhida facilmente uma quantidade considerável de células com abordagens

minimamente invasivas (Toosi *et al.*, 2018). Num outro exemplo de alternativa às hDPSCs, Tan e col. (2017) compararam a capacidade de crescimento, de proliferação e diferenciação osteogénica e odontogénica de DPSCs com células estaminais da papila apical, *in vitro*, concluindo que ambas possuem características de MSCs, tal como capacidade de se diferenciar em células tipo odontoblastos. Assim, ambas são uma fonte de células estaminais acessíveis para Engenharia de Tecidos (Tan, Guo, Liu, Xu, & Dai, 2017).

Gopinath e col. (2019) sugerem que tanto o método de isolamento como as condições de cultura afetam a capacidade de diferenciação das células isoladas (Gopinath *et al.*, 2019). A qualidade e quantidade destas células são também fatores importantes para a obtenção de resultados positivos na regeneração tecidual (Okajcekova *et al.*, 2020). A quantidade ideal de células necessárias para a utilização em Engenharia de Tecidos continua a ser um desafio, uma vez que a maioria das fontes de células estaminais disponíveis produz menos células que o pretendido. Ao realizar passagens extensas para obter um número de células suficientes pode levar a alterações epigenéticas e alterar o destino das células transplantadas no hospedeiro. Assim é necessário que os protocolos de expansão celular sejam revistos de modo a definir a fase em que as células devem ser transplantadas bem como o número ideal de células a utilizar (Ercal & Pekozler, 2020). Vários estudos demonstram que as células apresentam mais semelhanças ao seu fenótipo *in vivo* quando são cultivadas em meios e enxertos semelhantes aos seus nichos fisiológicos. Assim as MSCs são direcionadas a diferenciar-se numa linhagem osteogénica quando cultivadas num substrato com características de osso (Abdeen & Saha, 2017). Trivedi e col. (2019) realizaram um estudo com o objetivo de isolar e cultivar DPSCs e investigar a sua capacidade de proliferação e diferenciação osteogénica quando utilizadas em conjunto com um enxerto ósseo sintético de hidroxiapatite-colagénio, comercialmente disponível. Os resultados mostraram biocompatibilidade das células no enxerto de hidroxiapatite-colagénio, sendo que as células aderiram totalmente à superfície do enxerto e observou-se ligação celular. Observaram que a capacidade de diferenciação osteogénica das DPSCs é superior com o aumento da concentração do enxerto, sugerindo que o enxerto de hidroxiapatite-colagénio promove um microambiente propício à diferenciação osteogénica das DPSCs (Trivedi *et al.*, 2019). As hDPSCs, quando cultivadas em veículos cerâmicos, como a HA ou FTC, são capazes de formar tecido ósseo (Hussein *et al.*, 2020).

A nova área relativa à Engenharia de Tecidos com biomateriais só pode ser adequadamente estudada em organismos vivos, dependendo assim do uso de animais para ensaios pré-clínicos (Liebschner, 2004). Para avaliar as características dos biomateriais são necessários testes rigorosos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Antes de serem aplicados em situações clínicas em humanos, são testados em animais. A seleção do modelo animal é efectuada com base na analogia com humanos, no conhecimento das suas propriedades biológicas, no custo de aquisição e manutenção dos animais, na disponibilidade, na facilidade de maneo, nas implicações éticas, no bem estar animal e nas consequências ecológicas (Pinto *et al.*, 2016). Nos últimos anos verificou-se uma melhoria nos modelos pré-clínicos de animais de companhia

e de interesse pecuário, no que diz respeito à perda e regeneração óssea, devido à rápida expansão da Engenharia de Tecidos. No futuro é essencial a padronização de todos os procedimentos, desde da escolha da espécie animal, até à prática cirúrgica, para garantir reprodutibilidade e comparabilidade dos resultados (McGovern, Griffin, & Hutmacher, 2018)

Atayde e col. (2015) compararam as propriedades físico-químicas e o desempenho, *in vivo* em fêmures de ovelhas, de diferentes apresentações de grânulos esféricos de Bonelike[®], 500-100 µm e 250-500 µm. Concluíram que ambos os grânulos apresentam propriedades osteocondutivas e várias vantagens, como a fácil aplicação medica através de seringa e uma melhor osteointegração, osteocondução e degradação devido à presença de poros maiores, microestruturas e macroestruturas controladas e partículas de formato adequado que se adaptam ao crescimento ósseo. O Bonelike[®] de 500-100 µm mostra uma invasão da estrutura do material por novo tecido ósseo melhorada enquanto o Bonelike[®] de 250-500 µm aparenta induzir uma regeneração óssea mais rápida apresentando menos áreas por preencher e menos lacunas na análise histológica (Atayde *et al.*, 2015).

Recentemente, Campos e col. (2018) realizaram um estudo onde relataram 14 casos clínicos de defeitos ósseos apendiculares, mandibulares e maxilares nos quais a abordagem clínica incluiu a utilização de Bonelike[®] como substituto ósseo. Os resultados demonstraram que é um biomaterial adequado para aplicações em cirurgia ortopédica e oral, tanto em Medicina Humana como em Medicina Veterinária. Observaram um aumento da cicatrização óssea, aumento da estabilidade óssea e recuperação funcional total, promovendo recuperações aceleradas, diminuição de períodos pós-operatórios e diminuição da dor, o que resulta na melhoria da qualidade de vida do animal. Desta forma, os resultados sugeriram o Bonelike[®] como alternativa à utilização de enxertos ósseos naturais, em animais de companhia (Campos, Sousa, Pinto, *et al.*, 2018).

Em casos de defeitos ósseos, manter a células estaminais na área do defeito é crítico para uma terapia de sucesso, especialmente em defeitos ósseos críticos. Sendo assim necessário um enxerto ósseo sintético, estável e com propriedades osteocondutoras, que crie um ambiente viável para o desenvolvimento osteogénico das células estaminais, direcionando-as para a formação de novo tecido ósseo (Ercal & Pekozer, 2020).

Campos e col. (2018) realizaram adicionalmente a monitorização e avaliação da regeneração e remodelação óssea utilizando Bonelike[®] conjuntamente com hDPSCs em defeitos ósseos não críticos, em modelos ovinos. Os resultados demonstraram que os defeitos ósseos preenchidos com Bonelike[®] e hDPSCs tiveram uma formação de novo osso superior aos defeitos preenchidos somente com Bonelike[®] ou sem preenchimento de células ou biomaterial. Foi possível observar a rápida formação de preenchimento nos defeitos que possuíam o biomaterial, sendo que as características observadas neste estudo confirmam os resultados obtidos por Atayde e col. Os defeitos tratados com Bonelike[®] apresentaram uma maturação óssea mais rápida que os defeitos de controlo, com formação de osso lamelar e surgimento de sistemas de Harvers. Este resultado decorre das características do biomaterial que favorecem a osteopromoção, facilitam a adesão de hDPSCs e a absorção de proteínas, melhorando

consequentemente a osteocondução. Promovem também a osteodiferenciação e a formação de tecido mineralizado denso pelas células estaminais, devido às semelhanças com o tecido ósseo. Os resultados devem-se adicionalmente ao facto das hDPSCs possuírem um grande potencial para osteodiferenciação e produzem localmente fatores de crescimento, citocinas e outras moléculas que promovem a regeneração, a inflamação e fazem o recrutamento de outro tipo de células. A adição de hDPSCs resultou num crescimento de osso maior, numa formação de pontes entre o defeito mais rápida e numa angiogénese melhorada. Os autores concluíram ainda que a associação dos dois componentes é uma terapia promissora e confiável para regeneração óssea (Campos, Sousa, Caseiro, *et al.*, 2018).

As hDPSCs podem ser associadas a vários biomateriais e promovem a deposição mineral, tanto *in vitro* com *in vivo*. Podem ser utilizadas para a reconstrução de defeitos ósseos, em situações experimentais ou clínicas (Safari, Mahdian, & Motamedian, 2018). Têm potencial para serem implementadas não só na Medicina Humana como também na Medicina Veterinária e em estratégias regenerativas para outros tecidos e órgãos (Coates *et al.*, 2019). Apesar do potencial terapêutico das MSCs ser grande, o seu uso clínico requer investigação adicional e uma padronização de protocolos de utilização para terapias. Requer igualmente regulamentos para o uso controlado em animais de companhia, visando o bem estar animal, sendo para isso fundamental a presença de médicos veterinários nas equipas de investigação (Gade *et al.*, 2012).

É perspectivada como importante a avaliação, no futuro, da dinâmica entre as hDPSCs, uma boa fonte de células estaminais, e Bonelike[®], um substituo ósseo sintético com propriedades melhoradas comparativamente com HA comercial usada isoladamente. Será igualmente importante a sua aplicação clínica no tratamento de fraturas não críticas com o objetivo de melhorar a regeneração óssea, considerando a evidência de que o Bonelike[®] ajuda a preencher o defeito ósseo e que as hDPSCs aceleram a regeneração óssea. Tendo em conta que são necessários modelos animais para ensaios pré-clínicos e a necessidade de apresentar alternativas na recuperação de fraturas não só em humanos, como também em animais de companhia, é esperado um desenvolvimento desta área na medicina veterinária.

6. Conclusões

A formação e regeneração óssea são processos compostos por uma complexa regulação celular. Ao estudar esses processos, novas oportunidades clínicas poderão ser utilizadas em terapias regenerativas. Estudos realizados anteriormente demonstram a capacidade das hDPSCs na diferenciação em várias linhagens celulares e de auxílio na formação e regeneração óssea, tornando-as uma fonte de células com particular interesse para a Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa. Devido ao aumento de doenças ósseas, tanto crónicas como agudas em humanos e em animais de companhia, são necessárias novas soluções para auxiliar a regeneração óssea em diversas situações clínicas. O Bonelike[®] é um biomaterial sintético promissor no uso destas terapias celulares. São necessários estudos e

ensaios clínicos adicionais que envolvam a combinação de Bonelike® e MSCs enquanto alternativa promissora aos autoenxertos na regeneração óssea.

7. Referências Bibliográficas

- Abdeen, A. A., & Saha, K. (2017). Manufacturing Cell Therapies Using Engineered Biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 35(10), 971–982. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.008>
- Ali, B. L. M. (2013). Incidence, Occurrence, Classification and Outcome of Small Animal Fractures: A Retrospective Study (2005-2010). *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*, 7(3), 191–196. Retrieved from <https://waset.org/publications/14106/incidence-occurrence-classification-and-outcome-of-small-animal-fractures-a-retrospective-study-2005-2010->
- Allen, M. R., & Burr, D. B. (2019). Bone Growth, Modeling, and Remodeling. In *Basic and Applied Bone Biology* (Second Edi, pp. 85–100). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813259-3.00005-1>
- Almeida, M., & Manolagas, S. (2020). Aging and bone. In *Principles of Bone Biology* (pp. 275–292). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00012-9>
- Armiento, A. R., Hatt, L. P., Sanchez Rosenberg, G., Thompson, K., & Stoddart, M. J. (2020). Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. *Advanced Functional Materials*, 1909874, 1–41. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909874>
- Aslankoochi, N., Mondal, D., Rizkalla, A. S., & Mequanint, K. (2019). Bone Repair and Regenerative Biomaterials: Towards Recapitulating the Microenvironment. *Polymers*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/polym11091437>
- Atayde, L. M., Cortez, P. P., Afonso, A., Santos, M., Maurício, A. C., & Santos, J. D. (2015). Morphology effect of bioglass-reinforced hydroxyapatite (Bonelike ®) on osteoregeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 103(2), 292–304. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33195>
- Atayde, L. M., Cortez, P. P., Pereira, T., Armada-Da-Silva, P. A. S., Afonso, A., Lopes, M. A., ... Maurício, A. C. (2014). A new sheep model with automatized analysis of biomaterial-induced bone tissue regeneration. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(8), 1885–1901. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5216-2>
- Ayoub, S., Berbéri, A., & Fayyad-kazan, M. (2020). An update on human periapical cyst-mesenchymal stem cells and their potential applications in regenerative medicine. *Molecular Biology Reports*, 47(3), 2381–2389. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05298-6>
- Bartold, M., Gronthos, S., Haynes, D., & Ivanovski, S. (2019). Mesenchymal stem cells and biologic factors leading to bone formation. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(S21), 12–32. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13053>
- Bellido, T., Plotkin, L. I., & Bruzzaniti, A. (2019). Bone Cells. In *Basic and Applied Bone Biology* (Second Edi, pp. 37–55). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00003-8>
- Benavides-Castellanos, M. P., Garzón-Orjuela, N., & Linero, I. (2020). Effectiveness of mesenchymal stem cell-conditioned medium in bone regeneration in animal and human

- models: a systematic review and meta-analysis. *Cell Regeneration*, 9(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13619-020-00047-3>
- Bianchera, A., Catanzano, O., Boateng, J., & Elviri, L. (2020). The Place of Biomaterials in Wound Healing. In *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications* (pp. 337–366). <https://doi.org/10.1002/9781119433316.ch15>
- Biosckin, Molecular and Cell Therapies, S.A. (2020). Retrieved April 11, 2020, from <http://biosckin.pt/>
- Biswal, T., BadJena, S. K., & Pradhan, D. (2020). Sustainable biomaterials and their applications: A short review. *Materials Today: Proceedings*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.01.437>
- Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., & Ciapetti, G. (2020). Co-culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta Biomaterialia*, pp. 0–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.03.043>
- Bose, S., Ke, D., Sahasrabudhe, H., & Bandyopadhyay, A. (2018). Additive manufacturing of biomaterials. *Progress in Materials Science*, Vol. 93, pp. 45–111. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.08.003>
- Bracey, D. N., Cignetti, N. E., Jinnah, A. H., Stone, A. V., Gyr, B. M., Whitlock, P. W., & Scott, A. T. (2020). *Bone xenotransplantation : A review of the history , orthopedic clinical literature , and a single-center case series*. (February), 1–12. <https://doi.org/10.1111/xen.12600>
- Breeland, G., & Menezes, R. G. (2020). *Embryology, Bone Ossification*. StatPearls Publishing.
- Brehm, W., Burk, J., Delling, U., Gittel, C., & Ribitsch, I. (2012). Stem cell-based tissue engineering in veterinary orthopaedics. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 677–688. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1316-1>
- Bu, N.-U., Lee, H.-S., Lee, B.-N., Hwang, Y.-C., Kim, S.-Y., Chang, S. W., ... Jang, J.-H. (2020). In Vitro Characterization of Dental Pulp Stem Cells Cultured in Two Microsphere-Forming Culture Plates. *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 242. <https://doi.org/10.3390/jcm9010242>
- Burr, D. B. (2019). Bone Morphology and Organization. In *Basic and Applied Bone Biology* (Second Edi, pp. 1–26). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00001-4>
- Campos, J., Sousa, A. C., Caseiro, A. R., Pedrosa, S. S., Pinto, P. O., Branquinho, M. V, ... Maurício, A. C. (2018). Dental pulp stem cells and Bonelike® for bone regeneration in ovine model. *Regenerative Biomaterials*, 6(1), 49–59. <https://doi.org/10.1093/rb/rby025>
- Campos, J., Sousa, A. C., Pinto, P., Ribeiro, J., França, M. L., Caseiro, A. R., ... Maurício, A. C. (2018). Application of Bonelike® as synthetic bone graft in orthopaedic and oral surgery in veterinary clinical cases. *Biomaterials Research*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0150-x>
- Caseiro, A. R., Alvites, R., Pedrosa, S. S., Miguel, J., Reis, I. L., Santos, J. D., ... Maurício, A. C. (2017). The Potential Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells from the Dental Pulp (DPSCs) for Bone Regeneration. *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research*, 6, 21–70. <https://doi.org/10.2174/9781681084770117060004>

- Chocholata, P., Kulda, V., & Babuska, V. (2019). Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration. *Materials*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/ma12040568>
- Coates, D. E., Alansary, M., Friedlander, L., Zaniccotti, D. G., & Duncan, W. J. (2019). Dental pulp stem cells in serum-free medium for regenerative medicine. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 50(1), 80–90. <https://doi.org/10.1080/03036758.2019.1673447>
- Dias, I. E., Pinto, P. O., Barros, L. C., Viegas, C. A., Dias, I. R., & Carvalho, P. P. (2019). Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? *BMC Veterinary Research*, 15(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2087-2>
- El Sayed, S. A., Nezwiek, T. A., & Varacallo, M. (2018). Physiology, Bone. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722997>
- Ercal, P., & Pekozer, G. G. (2020). A Current Overview of Scaffold-Based Bone Regeneration Strategies with Dental Stem Cells. In *Cell Biology and Translational Medicine*. https://doi.org/10.1007/5584_2020_505
- Feng, X., Feng, B., Liu, J., Xu, Y., Zhu, J., & Chen, W. (2020). *Molecular mechanism underlying the difference in proliferation between placenta - derived and umbilical cord - derived mesenchymal stem cells*. (January), 1–15. <https://doi.org/10.1002/jcp.29572>
- Ferron, M., & Karsenty, G. (2020). Regulation of energy metabolism by bone-derived hormones. In *Principles of Bone Biology* (pp. 1931–1942). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814841-9.00084-1>
- Fornetti, J., Welm, A. L., & Stewart, S. A. (2018). Understanding the Bone in Cancer Metastasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 33(12), 2099–2113. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3618>
- Gade, N. E., Pratheesh, M. D., Nath, A., Dubey, P. K., Amarpal, & Sharma, T. T. (2012). Therapeutic potential of stem cells in veterinary practice. *Veterinary World*, 5(8), 499–507. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2012.499-507>
- Gao, C., Peng, S., Feng, P., & Shuai, C. (2017). Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research*, 5(October), 1–33. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.59>
- Gopinath, V. K., Soumya, S., & Jayakumar, M. N. (2019). Osteogenic and odontogenic differentiation potential of dental pulp stem cells isolated from inflamed dental pulp tissues (I-DPSCs) by two different methods. *Acta Odontologica Scandinavica*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/00016357.2019.1702716>
- Gu, Y., Bai, Y., & Zhang, D. (2018). Osteogenic stimulation of human dental pulp stem cells with a novel gelatin-hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(7), 1851–1861. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36388>
- Gugjoo, M. B., Amarpal, A., & Sharma, G. T. (2019). Mesenchymal stem cell basic research and applications in dog medicine. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 234, pp. 16779–16811. <https://doi.org/10.1002/jcp.28348>
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(8), 886. <https://doi.org/10.3390/cells8080886>

- Hartmann, C., & Yang, Y. (2020). Molecular and cellular regulation of intramembranous and endochondral bone formation during embryogenesis. In *Principles of Bone Biology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814841-9.00001-4>
- Ho-Shui-Ling, A., Bolander, J., Rustom, L. E., Johnson, A. W., Luyten, F. P., & Picart, C. (2018). Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*, 180, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>
- Hussein, A., Darwish, Z., Raslan, H., Attia, M., & Abdel-Hamid, H. (2020). DENTAL STEM CELLS (CONCEPTS AND APPLICATIONS). *Alexandria Dental Journal*, XX(X). <https://doi.org/10.21608/adjalexu.2020.88450>
- Iaquinta, M. R., Mazzoni, E., Manfrini, M., D'Agostino, A., Trevisiol, L., Nocini, R., ... Tognon, M. (2019). Innovative biomaterials for bone regrowth. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms20030618>
- Im, G.-I. (2020). Biomaterials in orthopaedics: the past and future with immune modulation. *Biomaterials Research*, 24(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40824-020-0185-7>
- Jiménez, A. J. V., & Guerrero, F. F. (2017). Células madre mesenquimales como nueva terapia en dermatología: conceptos básicos. *Revista Clínica de Oncología Veterinaria*, 9, 8–18. Retrieved from http://immunestem.com/wp-content/uploads/2017/03/eBP3WQ-MM_CLINDERVET_9.pdf
- Jones, M. S., & Waterson, B. (2020). Principles of management of long bone fractures and fracture healing. *Surgery (United Kingdom)*, 38(2), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2019.12.010>
- Kosowska, K., Domalik-Pyzik, P., Krok-Borkowicz, M., & Chłopek, J. (2020). Polylactide/hydroxyapatite nonwovens incorporated into chitosan/graphene materials hydrogels to form novel hierarchical scaffolds. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2330. <https://doi.org/10.3390/ijms21072330>
- Kowalczewski, C. J., & Saul, J. M. (2018). Biomaterials for the delivery of growth factors and other therapeutic agents in tissue engineering approaches to bone regeneration. *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 9, pp. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00513>
- Laplane, L., & Solary, E. (2019). Towards a classification of stem cells. *ELife*, 8, 2010. <https://doi.org/10.7554/eLife.46563>
- Leder, B. Z., & Wein, M. N. (2020). *Osteoporosis: Pathophysiology and Clinical Management* (Third Edit). <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-69287-6>
- Lee, Y. C., Chan, Y. H., Hsieh, S. C., Lew, W. Z., & Feng, S. W. (2019). Comparing the osteogenic potentials and bone regeneration capacities of bone marrow and dental pulp mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial bone defect model. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). <https://doi.org/10.3390/ijms20205015>
- Li, J., Kacena, M. A., & Stocum, D. L. (2019). Fracture Healing. In *Basic and Applied Bone Biology* (Second Edi, pp. 235–253). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813259-3.00012-9>
- Liebschner, M. A. K. (2004). Biomechanical considerations of animal models used in tissue

- engineering of bone. *Biomaterials*, 25(9), 1697–1714. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00515-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00515-5)
- Luke, A. M., Patnaik, R., Kuriadom, S., Abu-Fanas, S., Mathew, S., & Shetty, K. P. (2020). Human dental pulp stem cells differentiation to neural cells, osteocytes and adipocytes-An in vitro study. *Heliyon*, 6(1), e03054. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03054>
- Markel, M. D. (2019). Bone Grafts and Bone Substitutes. In *Equine Fracture Repair* (Vol. 7, pp. 163–172). <https://doi.org/10.1002/9781119108757.ch11>
- Martellucci, S., Santacroce, C., Manganelli, V., Santilli, F., Piccoli, L., Cassetta, M., ... Mattei, V. (2019). Isolation, propagation, and prion protein expression during neuronal differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(145), 1–7. <https://doi.org/10.3791/59282>
- McGovern, J. A., Griffin, M., & Hutmacher, D. W. (2018). *Animal models for bone tissue engineering and modelling disease*. <https://doi.org/10.1242/dmm.033084>
- Meinberg, E. G., Clark, D., Miclau, K. R., Marcucio, R., & Miclau, T. (2019). Fracture repair in the elderly: Clinical and experimental considerations. *Injury*, 50, S62–S65. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2019.05.005>
- Missoum, A. (2020). *Recent Updates on Mesenchymal Stem Cell Based Therapy for Acute Renal Failure*. 189–199. <https://doi.org/10.1159/000499272>
- Monterubbianesi, R., Bencun, M., Pagella, P., Woloszyk, A., Orsini, G., & Mitsiadis, T. A. (2019). A comparative in vitro study of the osteogenic and adipogenic potential of human dental pulp stem cells, gingival fibroblasts and foreskin fibroblasts. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37981-x>
- Moonesi Rad, R., Atila, D., Akgün, E. E., Evis, Z., Keskin, D., & Tezcaner, A. (2019). Evaluation of human dental pulp stem cells behavior on a novel nanobiocomposite scaffold prepared for regenerative endodontics. *Materials Science and Engineering C*, 100(February), 928–948. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.022>
- Murshed, M. (2018). Mechanism of Bone Mineralization. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), 1–12. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031229>
- Nantavisai, S., Egusa, H., Osathanon, T., & Sawangmake, C. (2019). Mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering for veterinary practice. *Heliyon*, 5(11), e02808. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02808>
- Neto, A. S., & Ferreira, J. M. F. (2018). Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*, 11(9), 1–40. <https://doi.org/10.3390/ma11091702>
- Ocansey, D. K. W., Pei, B., Yan, Y., Qian, H., Zhang, X., Xu, W., & Mao, F. (2020). Improved therapeutics of modified mesenchymal stem cells: an update. *Journal of Translational Medicine*, Vol. 18, p. 42. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02234-x>
- Okajcekova, T., Strnadel, J., Pokusa, M., Zahumenska, R., Janickova, M., Halasova, E., & Skovierova, H. (2020). A comparative in vitro analysis of the osteogenic potential of human dental pulp stem cells using various differentiation conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7). <https://doi.org/10.3390/ijms21072280>

- Okamoto, M., Matsumoto, S., Sugiyama, A., Kanie, K., Watanabe, M., Huang, H., ... Hayashi, M. (2020). Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair. *Polymers*, 12(4), 937. <https://doi.org/10.3390/polym12040937>
- Oliva, J. (2019). Therapeutic properties of mesenchymal stem cell on organ ischemia-reperfusion injury. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21). <https://doi.org/10.3390/ijms20215511>
- Oliva, J., Florentino, A., Bardag-Gorce, F., & Niihara, Y. (2019). Engineering, differentiation and harvesting of human adipose-derived stem cell multilayer cell sheets. *Regenerative Medicine*, 14(3), 151–163. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0053>
- Oryan, A., Kamali, A., Moshirib, A., & Eslaminejad, M. B. (2017). Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs*, Vol. 204, pp. 59–83. <https://doi.org/10.1159/000469704>
- Owen, G., Dard, M., & Larjava, H. (2018). Hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate biphasic ceramics as regenerative material for the repair of complex bone defects. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 106(6), 2493–2512. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34049>
- Perez, J. R., Kouroupis, D., Li, D. J., Best, T. M., Kaplan, L., & Correa, D. (2018). Tissue Engineering and Cell-Based Therapies for Fractures and Bone Defects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00105>
- Pinto, P. O., Atayde, L. M., Campos, J. M., Caseiro, A. R., Pereira, T., Mendonça, C., ... Maurxhtício, A. C. (2016). Therapeutic Strategies for Bone Regeneration: The Importance of Biomaterials Testing in Adequate Animal Models. In *Advanced Composite Materials* (pp. 275–319). <https://doi.org/10.1002/9781119242666.ch6>
- Poundarik, A. A., Boskey, A., Gundberg, C., & Vashishth, D. (2018). Biomolecular regulation, composition and nanoarchitecture of bone mineral. *Scientific Reports*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19253-w>
- Prakasam, M., Locs, J., Salma-Ancane, K., Loca, D., Largeteau, A., & Berzina-Cimdina, L. (2017). Biodegradable materials and metallic implants-A review. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/jfb8040044>
- Pripatnanont, P., Praserttham, P., Suttapreyasri, S., Leepong, N., & Monmaturapoj, N. (2016). Bone Regeneration Potential of Biphasic Nanocalcium Phosphate with High Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphate Ratios in Rabbit Calvarial Defects. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 31(2), 294–303. <https://doi.org/10.11607/jomi.4531>
- Rather, H. A., Jhala, D., & Vasita, R. (2019). Dual functional approaches for osteogenesis coupled angiogenesis in bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 103(May), 109761. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109761>
- Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S., & Jeong, J. (2019). European Journal of Cell Biology Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges , opportunities , and future perspectives. *European Journal of Cell Biology*,

- (April), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2019.04.002>
- Rey, C., Combes, C., Drouet, C., Grossin, D., Bertrand, G., & Soulié, J. (2017). Bioactive calcium phosphate compounds: Physical chemistry. In *Comprehensive Biomaterials II* (Vol. 1, pp. 244–290). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.10171-7>
- Rhatomy, S., Sumarwoto, T., Prijosedjati, A., Romaniyanto, & Prasetyo, T. E. (2020). Role of Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium (MSC-CM) in ligament or tendon healing: A Systematic Review from 1998-2018. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, 8(5_suppl5), 2325967120S0010. <https://doi.org/10.1177/2325967120S00109>
- Ribas, R. G., Schatkoski, V. M., Montanheiro, T. L. do A., de Menezes, B. R. C., Stegemann, C., Leite, D. M. G., & Thim, G. P. (2019). Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceramics International*, 45(17), 21051–21061. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>
- Robling, A. G., & Bonewald, L. F. (2020). The Osteocyte: New Insights. *Annual Review of Physiology*, 82(1), 485–506. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034332>
- Safari, S., Mahdian, A., & Motamedian, S. R. (2018). Applications of stem cells in orthodontics and dentofacial orthopedics: Current trends and future perspectives. *World Journal of Stem Cells*, 10(6), 66–77. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i6.66>
- Santos, J. D., Jha, L. J., & Monteiro, F. J. (1996). In vitro calcium phosphate formation on SiO₂-Na₂O-CaO-P₂O₅ glass reinforced hydroxyapatite composite: A study by XPS analysis. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 7(3), 181–185. <https://doi.org/10.1007/BF00121258>
- Schlesinger, P. H., Blair, H. C., Stolz, D. B., Riazanski, V., Ray, E. C., Tourkova, I. L., & Nelson, D. J. (2020). Cellular and extracellular matrix of bone, with principles of synthesis and dependency of mineral deposition on cell membrane transport. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 318(1), C111–C124. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2019>
- Shi, X., Mao, J., & Liu, Y. (2020). Concise review: Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Translational Medicine*, (November 2019), 1–21. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0398>
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2020a). Coupling of bone formation and resorption. In *Principles of Bone Biology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814841-9.00010-5>
- Sims, N. A., & Martin, T. J. (2020b). The osteoblast lineage. In *Principles of Bone Biology* (Vol. 23). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814841-9.00004-x>
- Soares, I. M. V., Fernandes, G. V. de O., Cavalcante, L. C., Leite, Y. K. P. de C., Bezerra, D. de O., Carvalho, M. A. M. de, & Carvalho, C. M. R. S. (2019). The influence of Aloe vera with mesenchymal stem cells from dental pulp on bone regeneration: Characterization and treatment of non-critical defects of the tibia in rats. *Journal of Applied Oral Science*, 27, 1–11. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0103>
- Tan, X., Guo, Y., Liu, J., Xu, J., & Dai, Q. (2017). Comparative characterization of

- osteo/odontogenic differentiation capability of human dental pulp stem cells and stem cells from apical papilla in vitro. *Chongqing Medicine*, 46(05), 586–589. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1671-8348.2017.05.004>
- The Editors of Encyclopaedia Britannica. (2015). Encyclopædia Britannica. Retrieved June 4, 2020, from Cancellous bone website: <https://www.britannica.com/science/cancellous-bone>
- Timothy, C. N., Samyuktha, P. S., & Brundha, M. P. (2019). Dental pulp stem cells in regenerative medicine – A literature review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(8), 4052–4056. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00698.X>
- Toosi, S., Behravan, N., & Behravan, J. (2018). Nonunion fractures, mesenchymal stem cells and bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, Vol. 106, pp. 2552–2562. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36433>
- Travničková, M., & Bačáková, L. (2018). Application of adult mesenchymal stem cells in bone and vascular tissue engineering. *Physiological Research*, Vol. 67, pp. 831–850. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933820>
- Trivedi, S., Srivastava, K., Saluja, T. S., Shyam, H., Kumar, S., Singh, A., ... Singh, S. K. (2019). Hydroxyapatite–collagen augments osteogenic differentiation of dental pulp stem cells. *Odontology*, 108(2), 251–259. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00464-0>
- Tsutsui, T. (2020). Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications, Volume 13*, 33–42. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S166759>
- Vallet-Regí, M., & Salinas, A. J. (2019). Ceramics as bone repair materials. In *Bone Repair Biomaterials* (Second Edi). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-102451-5.00006-8>
- Wang, W., & Yeung, K. W. K. (2017). Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*, Vol. 2, pp. 224–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>
- Watanabe-Takano, H., Ochi, H., Chiba, A., Matsuo, A., Kanai, Y., Fukuhara, S., ... Mochizuki, N. (2019). Periosteum-derived Osteocrin regulates bone growth through both endochondral ossification and intramembranous ossification. 1–43. <https://doi.org/10.1101/697094>
- Weber, F. E. (2019). Reconsidering Osteoconduction in the Era of Additive Manufacturing. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, 25(5), 375–386. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0047>
- Willerth, S. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2019). Combining Stem Cells and Biomaterial Scaffolds for Constructing Tissues and Cell Delivery. *StemJournal*, 1(1), 1–25. <https://doi.org/10.3233/stj-180001>
- Yamada, Y., Nakamura-Yamada, S., Konoki, R., & Baba, S. (2020). Promising advances in clinical trials of dental tissue-derived cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01683-x>
- Yu, L., Cai, Y., Wang, H., Pan, L., Li, J., Chen, S., ... Li, B. (2020). Biomimetic bone regeneration using angle-ply collagen membrane-supported cell sheets subjected to mechanical conditioning. *Acta Biomaterialia*. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.05.041>

Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>

