

RAFAEL DE MELLO E OLIVEIRA

**RECONSTRUÇÃO ÓSSEA APOSICIONAL COM
ENXERTO XENÓGENO ASSOCIADO À
FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
DA MEDULA ÓSSEA NA CALVÁRIA DE
COELHOS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

São Paulo

2014

RAFAEL DE MELLO E OLIVEIRA

**RECONSTRUÇÃO ÓSSEA APOSICIONAL COM
ENXERTO XENÓGENO ASSOCIADO À
FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES
DA MEDULA ÓSSEA NA CALVÁRIA DE
COELHOS**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal
de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAHO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. ANDRÉ ANTONIO PELEGRINE

Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE

São Paulo

2014

de Mello e Oliveira, Rafael

Reconstrução óssea aposicional com enxerto xenógeno associado à fração de células mononucleares da medula óssea na calvária de coelhos./
Rafael de Mello e Oliveira. – São Paulo, 2014.

xv, 97f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional.

Título em Inglês: Appositional bone reconstruction with xenogenous graft associated with bone marrow mononuclear cell fraction in rabbits calvaria.

1. Medula óssea. 2. Osseointegração. 3. Coelhos. 4. Enxerto xenógeno

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIRURGIA TRANSLACIONAL**

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **HILTON DE MELLO E OLIVEIRA E MARIANGELA AP. ANTONEO DE MELLO E OLIVEIRA**, pela minha educação, carinho e suporte além de todo o amparo e oportunidades oferecidas para que nunca me faltasse nada na vida.

Aos meus avós **IGNÊS FERRAZ DE ABREU DE MELLO E OLIVEIRA E HELION DE MELLO E OLIVEIRA** por sempre estarem presentes na minha formação com muito carinho e amparo.

À minha namorada **GABRIELA VICTORELLI**, que além de mudar o rumo da minha vida, sempre confiou, respeitou e esteve do meu lado nas alegrias e dificuldades passadas, sempre me apoiando e amparando durante todo o curso e outras dificuldades da vida.

À minha irmã **ADRIANA DE MELLO E OLIVEIRA** e a todos os meus familiares que mesmo não mais aqui juntos comigo, me ensinaram tudo o que sei hoje e me fizeram capaz de concluir mais esta etapa da minha vida.

Aos meus amigos verdadeiros que mesmo não estando presentes nesta jornada, me apoiaram mostrando os melhores caminhos e pelos bons momentos oferecidos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **LYDIA MSAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA E ORIENTADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL (UNIFESP-EPM) pela oportunidade, disponibilidade e indubitável conhecimento compartilhado, além da orientação deste trabalho.

Ao Prof. **ANDRÉ ANTONIO PELEGRINE**, PROFESSOR CO-ORIENTADOR amigo e mestre, por toda sua ajuda desde o tempo de graduação, por todas as oportunidades oferecidas para a formação acadêmica, profissional e clínica sempre com muita paciência e respeito, pela amizade e pelo conhecimento e habilidades passadas, além de sua confiança.

Ao Prof. **ANTONIO CARLOS ALOISE**, PROFESSOR CO-ORIENTADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EM CIRURGIA TRANSLACIONAL (UNIFESP) pela amizade criada durante o processo de orientação e confecção deste trabalho, por todos os conselhos e conhecimentos de vida, sempre estando presente na superação dos obstáculos enfrentados durante a realização desde o projeto de pesquisa à finalização do trabalho.

Ao **PROF. DR. MIGUEL SABINO NETO**, COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP-EPM, pelo apoio durante o processo de matrícula e todo o curso.

Ao amigo **ALLAN ZIMMERMANN**, DOUTORANDO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL (UNIFESP-EPM) por toda ajuda, companheirismo e conhecimentos desde o início deste projeto.

Aos estatísticos do Setor de Estatística Aplicada, ESCRITÓRIO DE APOIO À PESQUISA DA UNIFESP-EAP, Prof. **NEIL FERREIRA NOVO** e **Profa. YARA JULIANO**, PROFESSORES DA DISCIPLINA DE BIOESTATÍSTICA DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA (UNIFESP-EPM) pela orientação de estatística do estudo.

À Profa. Dra. **LYDIA MASAKO FERREIRA**, PROFESSORA TITULAR DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA PLÁSTICA E ORIENTADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL (UNIFESP-EPM) por proporcionar uma bolsa de pesquisa **CAPES – CNPq** durante a realização deste trabalho.

Aos colegas, **ANDRÉ LUIZ, ALLAN ZIMMERMANN, MARCELO MELO, MARCELO DE OLIVEIRA, SILVANA GAIBA** do LABORATÓRIO DE CIRURGIA TRANSLACIONAL I (UNIFESP-EPM), pela amizade durante o percurso desde o curso, compartilhando experiências e ajudando sempre que preciso.

Às secretárias, **SANDRA DA SILVA, MARTA REJANE** e **SILVANA APARECIDA DE ASSIS** da DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA (UNIFESP-EPM) pela assistência e atenção prestada desde o ingresso no Programa.

Aos PROFESSORES DE LÍNGUA PORTUGUESA **ARTHUR POMPILO ASTROGILDO DA SILVA** e **JULIANA COETTI** pela disponibilidade e sugestões realizadas na correção da dissertação.

À **TATIANA PINOTTI GUIRÃO**, veterinária responsável pelo CEDEME – UNIFESP pela disponibilidade, assistência e auxílio com o manejo dos animais.

Epígrafe:
“Nunca aprendi nada
com quem só concordou
comigo”
Niels Bohr

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTAS.....	x
RESUMO.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. LITERATURA.....	8
4. MÉTODOS.....	40
5. RESULTADOS.....	60
6. DISCUSSÃO.....	67
7. CONCLUSÃO.....	74
8. REFERÊNCIAS.....	76
ABSTRACT.....	85
APÊNDICES.....	87
ANEXOS.....	89
FONTES CONSULTADAS.....	100
NORMAS ADOTADAS.....	102

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema do Cilindro de Titânio utilizado no estudo.....	42
Figura 2. Fotografia de incisão e rebatimento total de pele e periósteo.....	44
Figura 3. Fotografia da utilização de uma lima para raspagem e alisamento do tecido ósseo.....	45
Figura 4. Fotografia da instalação dos cilindros de titânio.....	45
Figura 5. Fotografia dos pontos de decorticalização óssea.....	46
Figura 6. Fotografia do material de enxertia acondicionado no interior dos cilindros de titânio.....	47
Figura 7. Fotografia dos cilindros fechados.....	48
Figura 8. Fotografia da sutura do campo operatório.....	48
Figura 9. Fotografia dos cilindros de titânio removidos após eutanásia dos animais.....	50
Figura 10. Fotografia da punção para aspiração da medula óssea.....	51
Figura 11. Fotografia do tubo de polipropileno após separação por gradiente de densidade.....	53
Figura 12. Fotografia da fração de células mononucleares da medula óssea associada ao material de enxertia.....	54
Figura 13. Fotografia da mensuração da altura tecidual.....	55

Figura 14. Fotografia da lâmina histológica.....	56
Figura 15. Esquema das secções analisadas nas lâminas histológicas.....	56
Figura 16. Fotografia das secções das lâminas histológicas.....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média do volume tecidual interno aos cilindros	61
Tabela 2. Análises através do teste estatístico de Wilcoxon de medidas de histomorfometria da variável Tecido Mineralizado Não Vital.....	62
Tabela 3. Avaliação estatística através do teste estatístico de Wilcoxon do parâmetro Tecido Mineralizado Vital.....	63
Tabela 4. Avaliação estatística através do teste estatístico de Wilcoxon do parâmetro Tecido Não Mineralizado.....	64
Tabela 5. Avaliação estatística através do teste estatístico de Wilcoxon do parâmetro Contato Tecido Mineralizado Vital - Titânio.....	65
Tabela 6. Avaliação estatística através do teste estatístico de Wilcoxon de medidas de histomorfometria intergrupos.....	66

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ORDEM ALFABÉTICA

®	marca registrada
<i>ad libitum</i>	à vontade
CTMVT	contato tecido mineralizado vital titânio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>et al.</i>	e colaboradores
FMMO	fração de células mononucleares da medula óssea
g	força centrífuga
h	altura
H ₀	hipótese nula
IM	intra muscular
kg	kilograma
mg	miligrama
ml	mililitros
mm	milímetros
n	tamanho da amostra.
Nº	número
°C	graus Célcus

PBS	solução tampão fosfato salina
r	raio
SC	sub cutâneo
TMNV	tecido mineralizado não vital
TMV	tecido mineralizado vital
TNM	tecido não mineralizado
V	volume
μg	micrograma
Π	$\text{pi} = 3,1415926$

RESUMO

Introdução: A manutenção das características estruturais do tecido ósseo é almejada quando substitutos ósseos são utilizados em procedimentos de enxertia aposicional. Dentro deste escopo, a utilização da fração de células mononucleares da medula óssea visa incrementar os resultados da enxertia óssea com o aumento do contato entre osso e titânio. **Objetivo:** Avaliar a associação da fração de células mononucleares da medula óssea com enxerto ósseo xenógeno em reconstrução aposicional na calvária de coelhos. **Métodos:** Doze coelhos da raça Nova Zelândia foram distribuídos, randomicamente, em dois grupos, Grupo Controle (n=6 - substituto ósseo xenógeno) e Grupo Experimental (n=6 - substituto ósseo xenógeno enriquecido com a fração de células mononucleares da medula óssea). Foi criado um modelo de regeneração óssea guiada por meio de dois cilindros instalados na calvária de cada um dos animais. A eutanásia ocorreu após oito semanas sendo analisado: (1) mensuração do volume tecidual formado no interior dos cilindros e (2) Histomorfometria dos parâmetros: Tecido Mineralizado Não Vital (TMNV); Tecido Mineralizado Vital (TMV); Tecido Não Mineralizado (TNM) e Contato Tecido Mineralizado Vital - Titânio (CTMVT). **Resultados:** As mensurações do volume tecidual formado no interior dos cilindros dos grupos Controle e Experimental demonstraram manutenção do volume não havendo diferença entre os grupos. A histomorfometria não demonstrou diferença para os parâmetros TMNV, TMV havendo diferença para o parâmetro CTMVT. **Conclusão:** A associação do enxerto xenógeno com a fração de células mononucleares da medula óssea, em modelo de regeneração óssea guiada, aumenta a área de contato do tecido mineralizado vital com o titânio.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A descoberta da osseointegração pelo professor Per Ingvar Branemark modificou substancialmente a forma de se reabilitar muitos pacientes mutilados, especialmente nas áreas ortopédica e odontológica. Dentro desse escopo, o nível de contato direto entre osso e o titânio, além da quantidade de tecido ósseo presente no sítio a ser implantado são consideradas de grande importância (CHIAPASCO, CASENTINI, ZANIBONI, 2009).

O tratamento padrão para reconstrução óssea é efetuado por meio da enxertia óssea e em grande parte demanda reconstruções aposicionais, que são dificultadas por déficits de vascularização e, conseqüentemente, osseointegração. Os enxertos ósseos utilizados em reconstruções aposicionais demandam qualidade estrutural, potencial osteoindutor, osteocondutor e, se possível, osteogênico (ZIMMERMANN *et al.*, 2001; MARKEL *et al.*, 2012).

O tratamento reconstrutivo por meio da enxertia óssea autógena é considerado “padrão ouro” devido aos seus potenciais osteogênico, osteoindutor e osteocondutor (ZIMMERMANN *et al.*, 2001). Entretanto, os procedimentos para obtenção do tecido de enxertia repercutem em trauma resultante da remoção do tecido de enxertia bem como suas complicações pós operatórias (MOORE *et al.*, 2001; CHIAPASCO, CASENTINI, ZANIBONI, 2009). Por este motivo, alguns autores iniciaram procedimentos para associação da medula óssea aos substitutos do osso autógeno (daCOSTA *et al.*, 2011; SLOTTE *et al.*, 2003; PELEGRINE *et al.*, 2010; PELEGRINE *et al.*, 2011; SAKAI *et al.*, 2008; YOSHIOKA *et al.*, 2011; PELEGRINE *et al.*, 2014).

Atualmente, podemos lançar mão de vários materiais substitutos ósseos para a realização dos tratamentos reconstrutivos. Entre eles enxertos

alógenos, xenógenos e sintéticos, os quais apresentam algumas limitações devido a ausência de propriedades osteogênicas. O campo da engenharia tecidual trabalha com metodologias para reprodução de tecidos perdidos, inclusive o ósseo. Devido ao crescimento da procura científica por novos métodos e protocolos para a substituição minimamente traumática de tecidos perdidos, estudos vêm sendo realizados nesta linha (OHGUSHI *et al.*, 1989; JOHNSTONE *et al.*, 1998).

Conseqüentemente ao aumento do interesse pela engenharia tecidual, estudos com células-tronco apresentam crescente número de relatos na literatura científica, devido suas possibilidades de diferenciação em uma grande quantidade de células, inclusive as osteoprogenitoras. O uso de células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea, associadas a arcabouços mecânicos para a regeneração óssea, reduziriam a necessidade de remoção de enxertos autógenos e, conseqüentemente, a morbidade pós operatória (KAWAGUCHI *et al.*, 2004; HASEGAWA *et al.*, 2006).

A presença das células-tronco dentro da fração das células mononucleares da medula óssea, com potencial de diferenciação em osteoblastos, pode incrementar os resultados da enxertia óssea além de aumentar a área de contato osso – titânio (PIERI *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2013). PELEGRINE *et al.* (2010) demonstraram em humanos que a medula óssea fresca apresenta melhores resultados de regeneração óssea em relação ao coágulo sanguíneo. Porém ainda não existe consenso sobre a melhor forma de processamento das células-tronco da medula óssea para a terapia de enxertia em reconstrução óssea aposicional.

Há algumas décadas, PLENK *et al* (1972) relataram que a utilização da medula óssea autógena fresca associada a um substituto ósseo xenógeno colaborou para melhor neoformação óssea. Por outro lado o cultivo de células permite o emprego de maior número de células osteoprogenitoras, porém apresenta problemas relacionados à seu alto custo, falta de

padronização da técnica, dificuldade clínica e longo tempo de espera entre a aspiração e reimplantação das células (de OLIVEIRA E SILVA *et al.*, 2012; PELEGRINE *et al.*, 2014).

A técnica de concentração da fração de células mononucleares da medula óssea por meio de centrifugação, quando comparada ao uso da medula óssea fresca, além de não demandar a espera de várias semanas após coleta, como no caso da cultura de células, repercute em maior número de células mononucleadas e também de mais unidades formadoras de colônias fibroblásticas (SAUERBIER *et al.*, 2010; YAMADA *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009). Estes aspectos aliados à presença de outros fatores de crescimento, juntamente com as células osteogênicas, fazem com que o processo de concentração da fração de células mononucleares da medula óssea por centrifugação repercute na obtenção de um micro ambiente favorável à proliferação e diferenciação celular (HAMANISHI *et al.*, 1994). PELEGRINE *et al.*, 2014 demonstraram, em enxertia interposicional na calvária de coelhos, que o uso da fração de células mononucleares da medula óssea associada a um biomaterial xenógeno incrementa os resultados reconstrutivos. No entanto, o estudo desta associação em enxertias aposicionais e em osseointegração é escassa na literatura científica. YAMADA *et al.*, 2004 avaliaram o nível de osseointegração em região previamente reconstruída com uso de células-tronco mesenquimais da medula óssea e verificaram que o contato do osso com o titânio era superior quando comparado ao uso do enxerto autógeno. No entanto, a terapia celular não foi utilizada concomitantemente à instalação dos implantes.

Desta forma, este estudo propôs a análise comparativa da reconstrução tecidual e osseointegração entre a utilização ou não de um protocolo de concentração da fração de células mononucleares da medula

óssea, associado ao substituto ósseo xenógeno em enxertia óssea aposicional com cilindros de titânio em coelhos.

OBJETIVO

2. Objetivo

Avaliar a associação do enxerto ósseo xenógeno com a fração de células mononucleares da medula óssea em um modelo de reconstrução óssea aposicional na calvária de coelhos.

LITERATURA

3. Literatura

PLENK *et al.* (1972) avaliaram a cicatrização óssea após defeitos críticos de 5mm de diâmetro criados em ílio e ísquio de ratos terem sido preenchidos com osso xenógeno associado ou não ao aspirado de medula óssea autógena. Os autores analisaram histologicamente os dois grupos e observaram que o grupo onde o aspirado não foi utilizado o osso xenógeno foi encapsulado por tecido conjuntivo fibroso e apresentou mínima formação óssea. No grupo em que o aspirado da medula óssea foi associado, os autores observaram maior presença de tecido ósseo neoformado, relatando um maior nível de formação óssea.

GUPTA *et al.* (1982) avaliaram clinicamente, histologicamente, radiograficamente e por fluorescência com tetraciclina, a regeneração de defeitos ósseos críticos criados em ulna de coelhos preenchidos com enxertos ósseos xenógenos, humanos e suínos, associados ou não ao aspirado de medula óssea autógena. Após um período de 20 semanas, os autores observaram que os enxertos, humanos ou suínos, associados à medula óssea apresentaram uma formação óssea abundante entre 85,7% e 83,3%, respectivamente. Porém apenas 13,3% dos enxertos sem associação à medula apresentaram uma formação de mesmas proporções.

CONNOLLY *et al.* (1989) compararam em coelhos o efeito osteogênico de um concentrado de elementos da medula óssea e da medula óssea fresca na implantação em sítios ectópicos e ortotópicos. Os autores observaram uma maior deposição de cálcio nas áreas enxertadas com o concentrado de medula óssea do que nas áreas somente com o aspirado de medula óssea fresca.

OHGUSHI *et al.* (1989) avaliaram a cicatrização de defeitos ósseos em fêmur de ratos fixados por placas rígidas e implantação de cerâmicas porosas impregnadas ou não à medula óssea. Os autores efetuaram exames histológicos que demonstraram que os sítios enxertados sem a associação com medula óssea apresentaram em sua maioria uma fibrose na junção com o osso, sendo que uma minoria apresentou união após 2 meses da enxertia. No entanto, nos sítios onde a medula óssea foi adicionada, foi verificada uma grande formação óssea nas regiões porosas após o mesmo período de tempo. Os autores concluíram que a associação de medula óssea à cerâmica porosa pode ter aplicabilidade clínica devido a um incremento na osteogênese e na osteocondução.

HAMANISHI *et al.* (1994) transplantaram células medulares autólogas na realização da técnica de distração osteogênica. Foram utilizados coelhos jovens e adultos onde foram realizados aumentos de 1mm por dia em um tempo de 10 dias. Foi realizado exame de absormetria de raio-x de dupla energia para avaliação quantitativa da densidade óssea. Os autores obtiveram como resultados um aumento do calo ósseo nos coelhos, jovens e adultos, com o transplante de medula óssea, porém a cultura e o concentrado de células não apresentaram densidade óssea superior à do grupo controle. Desta maneira foi relatado pelos autores que a ausência do estímulo à formação óssea pelo uso de células granulócitas pode indicar que as células medulares, as quais apresentam potencial osteoprogenitor, estejam localizadas na camada mononuclear.

JENSEN *et al.* (1996) compararam qualitativamente e quantitativamente as reações teciduais ao redor de quatro diferentes

substitutos ósseos, bovinos (Endobon® e Bio-Oss®) e derivados de corais (Pro Osteon 500® e Interpore 500 HA/CC®) enxertados em defeitos criados e tíbias de coelhos. Os autores relataram nenhuma diferença na quantidade de osso neoformado ao redor dos quatro bio materiais. O Interpore 500 HA/CC® reabsorveu completamente enquanto os outros bio materiais não apresentaram degradações detectáveis. O Bio-Oss® apresentou um maior grau de osseointegração em relação aos outros bio materiais.

BERGLUNDH & LINDHE (1997) estudaram a cicatrização óssea após três e sete meses em defeitos ósseos preenchidos com Bio-Oss® em mandíbulas de cachorros, além de comparar a cicatrização óssea e de tecidos moles ao redor de implantes osseointegráveis. Os autores extraíram todos os pré-molares direitos e esquerdos de cinco cães *beagle* e criaram dois defeitos ósseos, no lado esquerdo preenchido com Bio-oss® e no lado direito somente com coágulo sanguíneo. Após três meses, dois animais (grupo 1) foram eutanaziados e foram criados os defeitos ósseos. Neste mesmo tempo, os três animais restantes (grupo 2) receberam dois implantes instalados em cada hemi-mandíbula. Após quatro meses da instalação dos implantes, foram realizados exames clínicos e radiográficos para avaliação de inflamação dos tecidos moles e duros ao redor dos implantes além da remoção de biópsias para avaliação histológica. Os autores relataram que o volume de tecido duro continha partículas remanescentes de Bio-Oss®, o que indica que com o tempo este substituto ósseo se torna integrado e subsequentemente é repostado por osso imaturo neo-formado, em outras palavras, os autores concluíram que este material xenógeno é osteocondutor, além de ser observado que após quatro meses da instalação dos implantes, a interface osso-implante nos grupos teste e controle,

apresentavam de maneira qualitativa e quantitativa um grau similar de osseointegração.

MUSCHLER *et al.* (1997) avaliaram clinicamente trinta e dois pacientes, dezenove homens e treze mulheres, quanto à quantidade de células nucleadas e o número de unidades formadoras de colônias positivas para fosfatase alcalina, provenientes na aspiração de diferentes volumes de medula óssea. Os autores observaram que o aumento de 1 para 4 ml de aspirado, gera uma queda de 50% na concentração final de unidades formadoras de colônias positivas para fosfatase alcalina. Os autores concluíram que o percentual de aspiração indesejada aumenta proporcionalmente ao volume aspirado, portanto este não deve ser superior a 2ml.

JOHNSTONE *et al.* (1998) obtiveram um aspirado de medula óssea de coelhos e a isolaram por cultura em mono camadas em um sistema de cultura que facilita a diferenciação condrogênica de células progenitoras da medula óssea. Os autores adicionaram dexametasona à diferenciação e detectaram colágeno tipo II no exame imuno-histoquímico como evidência da diferenciação condrogênica das células da medula óssea. Os autores acompanharam a indução condrogênica pelo aumento na atividade da fosfatase alcalina das células agregadas e relataram como resultados histológicos e imuno-histoquímicos a evidência molecular para a diferenciação condrogênica *in vitro* de células progenitoras adultas de mamíferos derivadas da medula óssea.

PIATTELLI *et al.*, (1999) realizaram uma análise histológica de longo prazo através de biópsias removidas de regiões enxertadas com o substituto ósseo Bio-Oss® no interior de seios maxilares em humanos. Os espécimes foram removidos de 20 pacientes após períodos que varia de seis meses a quatro anos, estes foram processados para obtenção de cortes histológicos. Os autores observaram nos cortes histológicos a presença de partículas de Bio-Oss® cercadas em sua maior parte por osso maduro e compacto, e em alguns locais foi possível observar pequenos capilares além de canais de Havers, bem como a presença de células mesenquimatosas e osteoblastos em conjunto com o novo osso. Os autores relataram que não estavam presentes lacunas na interface entre as partículas de Bio-Oss e osso neo formado. Nos espécimes recuperadas após 18 meses, também foi possível observar a presença de osteoclastos no processo de reabsorção das partículas de Bio-Oss®. Desta maneira os autores concluíram que o Bio-Oss® parece ser altamente biocompatível e osteocondutor, sendo reabsorvido lentamente em seres humanos, e pode ser utilizado com sucesso como um substituto ósseo em procedimentos de enxertia do seio maxilar.

DUPOIRIEUX *et al.* (2001) compararam a eficácia de membranas não-reabsorvíveis de politetrafluoretileno expandido versus membranas reabsorvíveis poliglactina e membranas colagênicas para regeneração óssea em crânio de ratos. Os autores utilizaram 30 ratos Wistar adultos, onde em cada animal foram realizados dois defeitos simétricos, em região parietal, de espessura total com 6 mm de largura. O defeito direito foi escolhido como experimental e, o esquerdo como controle. Cada local experimental foi coberto por uma membrana. Os 30 ratos foram divididos em três grupos: grupo 1 (n = 10), membrana não-reabsorvível de

politetrafluoretileno expandido. Grupo 2 (n = 10), membrana reabsorvível poliglactina 910. Grupo 3 (n = 10), membrana de colágeno. Em cada grupo, os animais foram sacrificados em 60 dias e, as amostras colhidas foram processadas para radiografia e exame histológico padrão. Os resultados foram avaliados pelo teste exato de Fisher. Como resultados, os autores obtiveram a cicatrização óssea parcial observado em sete dos 10 animais e completa em três dos 10 animais ($P < 0,001$) no grupo 1. No grupo 2, nenhuma ou mínima cicatrização óssea foi observado em sete dos 10 animais e cicatrização óssea parcial foi observada em três dos 10 animais. No grupo 3, nenhuma ou mínima cicatrização óssea foi observada em nove de 10 casos e cicatrização óssea parcial em apenas um animal. Os autores concluíram que, só o grupo da membrana não-reabsorvível exibiu um resultado favorável, mostrando que a estrutura da membrana é pelo menos tão importante quanto a sua composição.

MOORE et al., (2001) revisaram a literatura científica no âmbito de analisar a relevância do substituto ósseo sintético, suas propriedades mecânicas e aplicação clínica. Neste estudo os autores relataram que, atualmente o enxerto ósseo autógeno e alógeno são as principais fontes de procedimentos de enxertia óssea, sendo que o enxerto autógeno tem o maior potencial osteogênico, seguido do enxerto alógeno. Sendo que o osso alógeno pode ser considerado uma fonte importante quando são necessários grandes volumes estruturais de enxertos. Entretanto, os materiais de enxerto ósseo sintéticos, ainda oferecem apenas uma solução parcial para a reposição de perdas ósseas localizadas. Porém, eles possuem algumas qualidades desejadas ao tecido ósseo, pois são osteointegráveis, apresentam propriedades condutoras, mas são dependentes de periósteo viável para o seu sucesso. Desta maneira, os autores concluíram que o substituto ósseo

o sintético ideal deve imitar o osso nativo em ambas as propriedades mecânicas e osteogênicas. E que o advento dos substitutos de enxertos ósseos sintéticos compostos e fatores biologicamente ativos move a ciência cada vez mais perto deste objetivo.

ZIMMERMANN *et al.*, (2001) estudaram os componentes do plasma rico em plaquetas (PRP) obtido de bolsas de sangue de 15 doadores saudáveis, em que cada bolsa de sangue foi utilizada para: Coleta seletiva de plaquetas, preparação de PRP à partir do *buffy coat* e preparação do PRP através do método do tubo. Além disso, as plaquetas foram guardadas por 5 dias para avaliar o efeito do armazenamento sobre os componentes dos fatores de crescimento das plaquetas humanas. Os autores relataram que a concentração de plaquetas foi maior no método do tubo. Para toda a série de medições, houve uma forte correlação entre os níveis de fatores de crescimento e concentração de plaquetas ($p < 0,05$). Os autores concluíram que estes 3 métodos geram uma alta concentração de componentes plaquetários que diferem principalmente em seu conteúdo de componentes sanguíneos totais e na ativação plaquetária, e sugerem que estes resultados são relevantes para o planejamento e avaliação de novos estudos de componentes plaquetários autólogos utilizados localmente.

PALLESEN *et al.* (2002) investigaram a influência do tamanho das partículas do enxerto ósseo autógeno nas fases iniciais da regeneração óssea de coelhos. Os autores selecionaram partículas de tamanhos pequeno e grande ($0,5$ a 2mm^3 ; 10mm^3 , respectivamente) à serem enxertadas em defeitos críticos, com o grupo controle sem preenchimento. Todos os grupos foram cobertos bicorticalmente por membranas de politetrafluoretileno expandido. Após um período de 1, 2 e 4 semanas os autores sacrificaram os animais e realizaram avaliações histológica e

estereológica. Nenhuma diferença significativa na área de superfície foi relatada nos 3 grupos, sendo o grupo enxertado com partículas pequenas apresentou osso mais maduro do que o de partículas grandes após 2 e 4 semanas, além disso, a reabsorção de pequenas partículas foi mais pronunciada após 4 semanas, documentando um maior nível de substituição óssea em comparação às partículas grandes.

SLOTTE *et al.*, (2003) avaliaram um modelo aposicional de aumento ósseo guiado em coelho realizado através de cilindros de titânio preenchidos com enxertos ósseos autógeno G1, um biomaterial de base mineral óssea bovina (Bio-Oss®) G2 ou coágulo sanguíneo GC. Os autores observaram aumento ósseo significativo nos dois grupos teste G1 e G2 em comparação ao grupo controle. Os autores concluíram que a enxertia de osso autógeno ou BioOss® em conjunto com o cilindro de titânio gerou mais tecido do que apenas coágulo no interior do cilindro, e que o Bio-Oss® apresentou volume semelhante ao osso autógeno.

KAWAGUCHI *et al.*, (2004) avaliaram se o auto transplante de células-tronco mesenquimais para o interior de defeitos ósseos periodontais poderia beneficiar a regeneração tecidual periodontal. Os autores isolaram e expandiram *in vitro* células-tronco mesenquimais de cachorros da raça Beagle, associadas com 2% de colágeno tipo II até as seguintes concentrações finais 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , ou 2×10^7 células/ml e então realizaram os auto transplantes no interior de defeitos de furca criados nas mandíbulas dos animais. No grupo controle somente colágeno foi enxertado. A cicatrização do tecido periodontal foi avaliada histomorfometricamente após 1 mês. As avaliações histológicas demonstraram regeneração de cemento, ligamento periodontal e osso

alveolar nos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Os grupos 5×10^6 e 2×10^7 apresentaram um aumento na porcentagem de cemento e o grupo 2×10^7 também apresentou aumento significativo na porcentagem de osso imaturo ($p < 0,01$). Desta maneira os autores sugerem que o auto transplante de células tronco mesenquimais é uma nova opção para a regeneração tecidual periodontal.

YAMADA *et al.*, (2004) estudaram em cães, a correlação entre o contato osso-implante (BIC) e a densidade óssea. Foram utilizados 5 cães nos quais foram extraídos o 1º molar, 1º,2º e 3º pré molares e, após o período de 1 mês de cicatrização, foram realizados defeitos ósseos com auxílio de uma broca trefina e definidos 3 grupos: GC- defeito vazio; G1- PRP; G2- Osso autógeno particulado e associado às células tronco mesenquimais aspiradas da crista ilíaca dos animais, isoladas e cultivadas; G3- Gel de PRP associado à células-tronco mesenquimais. Após 8 semanas de cicatrização dos enxertos, os autores realizaram uma coleta do material de enxertia através de brocas trefinas e no mesmo ato cirúrgico, a instalação de implantes osseointegráveis. Após outro período de 8 semanas, os animais foram sacrificados e removidos blocos ósseos da mandíbula contendo os implantes. Os autores analisaram as lâminas histológicas das coletas do tecido ósseo enxertado para avaliação da qualidade do material de enxertia e verificaram que: GC e G1 não apresentaram fechamento de continuidade óssea com a cavidade invadida por tecido mole; G2: grande quantidade de remanescente do osso particulado; G3: Grande quantidade de osso vital com macro estrutura semelhante ao osso autógeno. A partir das lâminas confeccionadas para avaliação da densidade óssea, os autores obtiveram percentuais de: GC: $63,2 \pm 7,6$; G1 $68,2 \pm 10,3$; G2: $70,3 \pm 8,2$; G3: $79,4 \pm 3,3$ com diferença estatística no G3 em relação ao GC. Já em relação ao BIC os resultados mostraram: GC: $26,4 \pm 9,5$; G1: $44,2 \pm 10,8$; G2:

49,9_{+8,2}; G3: 58,6_{+9,7} sendo que todos os grupos teste apresentaram diferença estatística em relação ao GC. Desta maneira, os autores concluíram que os resultados deste estudo experimental indicam que o uso de um gel de PRP associado à células-tronco mesenquimais apresentam bons resultados, tais como a quantidade de BIC e um aumento da densidade óssea.

KOTOBUKI et al., (2005) avaliaram a viabilidade de células mesenquimais humanas criopreservadas além de compararem o potencial osteogênico entre as células mesenquimais humanas criopreservadas ou não criopreservadas, em relação às características semelhantes à células tronco mesenquimais. Para isto foram utilizadas células derivadas de medula óssea de 28 pacientes. A viabilidade das células mesenquimais criopreservadas foi de aproximadamente 90%, independentemente do tempo de armazenamento (0,3 e 37 meses). Os autores relataram que foi evidente pela análise de separação de células activadas por fluorescência, que os antígenos de superfície celular de células mesenquimais, criopreservadas ou não criopreservados, foram negativos para os marcadores de células hematopoiéticas, tais como CD14 , CD34 , CD45 , e HLA – DR, porém positivo para as características de células mesenquimais, tais como CD29 e CD105. Para monitorizar o potencial osteogênico de uma subcultura de células, tais como fosfatase alcalina (ALP) e mineralização in vitro, foram utilizados dexametasona, ácido ascórbico, glicerofosfato. Os autores não relataram diferenças no potencial osteogênico entre as células com ou sem tratamento de criopreservação. Além disso, foi relatado que as células submetidas a criopreservação de longo prazo (cerca de 3 anos), mantiveram elevado potencial osteogênico. Desta maneira os autores concluíram que, as células mesenquimais

humanas criopreservadas bem como as não criopreservadas podem ser aplicadas para a regeneração óssea em ortopedia.

HASEGAWA *et al.* (2006) isolaram células-tronco mesenquimais da medula óssea de cães, rotulado com proteína fluorescente verde (GFP), e expandidas *in vitro* e transportadas para os defeitos periodontais. Os autores avaliaram os resultados por análise imuno-histoquímica e obtiveram como resultados defeitos quase totalmente regenerados por tecidos periodontais após 4 semanas. Concluiu-se que células-tronco mesenquimais transplantadas podem sobreviver e se diferenciar em células do tecido periodontal, resultando em regeneração dos tecidos.

TAMIMI *et al.*, (2006) compararam a capacidade de regeneração óssea de um substituto ósseo à base de Beta tricálcio fosfato sintetizado em laboratório comparado ao enxerto ósseo xenógeno Bio-Oss. O estudo foi realizado em um grupo de 14 coelhos Nova Zelândia adultos os quais receberam dois cilindros de titânio fixadas em fendas realizadas no osso parietal de cada coelho. Em cada animal, um cilindro foi deixado vazio (controle negativo) e o outro preenchido com Bio-Oss (controle) ou com o substituto ósseo à ser testado. Após quatro semanas da intervenção, os animais foram sacrificados e biópsias foram removidas. Os autores analisaram os seguintes parâmetros: aumento do tecido ósseo, densidade óssea e reabsorção do biomaterial. Os autores apresentaram como resultados semelhante densidade óssea e um aumento na quantidade de tecido mineral no interior dos cilindros, porém superior em relação ao controle negativo. Além de apresentar reabsorção do material e um aumento do tecido ósseo significativamente maior nos defeitos tratados

com o substituto ósseo à base de Beta tricálcio fosfato sintetizado em laboratório. Desta maneira, os autores concluíram que os Grânulos do substituto ósseo testado eram mais reabsorvíveis e, portanto, geraram mais tecido ósseo em relação ao Bio-Oss no interior dos cilindros de titânio na calota craniana de coelhos.

CLARKE *et al.*, (2007) avaliaram o uso de terapia celular autóloga para melhorar a cicatrização de um defeito ósseo assim como os métodos de entrega celular utilizando o substituto ósseo sintético (Beta tricálcio fosfato) JAX como arcabouço. Foi coletada medula óssea de 24 coelhos Nova Zelândia e a fração de células mononucleares foi isolada e expandida em cultura. Foram criados, nas ulnas dos animais, defeitos bilaterais de 1,5 cm³ de diâmetro e preenchidos com: Grupo 1: JAX sozinho, Grupo 2: JAX associado à 1×10^7 células-tronco mesenquimais da medula óssea autóloga injetadas no momento da cirurgia, Grupo 3: JAX associado à 8×10^6 células-tronco mesenquimais da medula óssea autóloga cultivadas durante 14 dias antes da cirurgia, Grupo 4: JAX associado à medula óssea fresca, Grupo 5: enxerto ósseo cortical autógeno, Grupo 6: JAX associado à 2,5 mg de fator de crescimento vascular endotelial humano (VEGF). As radiografias demonstraram osso imaturo nos grupos 4 e 6 em comparação com JAX sozinho. Grupos 2 e 3 foram apenas ligeiramente melhor do que JAX sozinho na quantidade de osso no defeito, porém apresentou melhora na osteotomia. Histomorfometricamente, foi identificado um aumento significativo no volume de osso no grupo de 4 comparação com JAX sozinho. Os grupos 4 e 6 apresentaram melhor cicatrização de defeitos ósseos. Não houve diferença entre os métodos de entrega de células-tronco mesenquimais da medula óssea autóloga. Os autores concluíram que o fornecimento de células osteogênicas por si só é insuficiente para melhorar a cicatrização óssea e que fatores adicionais são necessários para iniciar

este processo *in vivo*.

SAKAI *et al.* (2008) avaliaram a técnica de centrifugação manual de bolsas de sangue, sendo este considerado um método simplificado de concentração de células do aspirado de medula óssea, para extração de *buffy coats* para a obtenção de células progenitoras osteogênicas. Os autores realizaram, após a centrifugação, uma contagem de células nucleadas e a quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblásticas. Os autores relataram uma contagem significativamente maior após o processo de centrifugação em relação às contagens realizadas com o aspirado de medula óssea *in natura*.

TORRES *et al.*, (2008) avaliaram os benefícios do uso de PRP, quando usado isoladamente, e em comparação ao material de enxertia xenógeno Bio-Oss®, na capacidade de aumento de osso vertical. O estudo foi realizado na calvária de oito coelhas da raça Nova Zelândia. Dois cilindros de titânio foram fixados em fendas realizadas nos ossos parietais de cada coelho. Em cada coelho, um cilindro foi enxertado com Bio-Oss, e o contralateral preenchido com PRP. Os animais foram sacrificados 4 semanas após a intervenção e biópsias foram removidas. Foram avaliados parâmetros densitométrico, histológico e histomorfométrico para avaliar a densidade mineral óssea, aumento ósseo vertical, e o volume restante do enxerto. A análise densitométrica e os dados histomorfométricos revelaram que tanto o aumento de volume ósseo quanto a densidade mineral óssea foram significativamente menores nos cilindros tratados com PRP ($p < 0,0001$) 4 semanas após a implantação. Desta maneira os autores concluíram que não existe nenhum efeito benéfico do uso de PRP sozinho na regeneração óssea aposicional. Além disso, foi enfatizado que Bio-Oss

apresenta boas propriedades de osteocondução por atingir valores de volume ósseo adequado.

YAMADA *et al.* (2008) avaliaram clinicamente o uso de um substituto ósseo produzido através de engenharia tecidual e sua associação à células mesenquimais da medula óssea e ao plasma rico em plaquetas. Os autores selecionaram 12 pacientes que necessitavam de levantamento do seio maxilar para posterior instalação de implantes, e obtiveram resultados satisfatórios, com pouca ou nenhuma reabsorção do material de enxertia, após um período de 2 anos. Desta maneira os autores concluíram que o uso da engenharia tecidual na neoformação óssea pode contribuir para o estabelecimento de uma terapia reconstrutiva minimamente invasiva.

EÇA *et al.*, (2009) avaliaram as técnicas de coleta de células tronco adultas da medula óssea de coelhos aspiradas de 30 coelhos divididos em 2 grupos: GRUPO A, n=8, onde realizou-se a coleta de sangue de medula óssea (MO) da crista ilíaca e grupo B, n=22, onde realizou-se a coleta de sangue da medula óssea da epífise femural. Após as coletas, realizou-se a separação das células mononucleadas através do gradiente de densidade com Ficoll-Hystopaque. Através da câmara de Neubauer foi realizada a contagem das células mononucleadas por ml. Testou-se a viabilidade celular através do método azul de tripan para a utilização do mesmo como modelo experimental na medicina regenerativa. Na de medula óssea na crista ilíaca os autores obtiveram a média de 1 ml durante 1 hora de procedimento cirúrgico, obtendo a quantidade de $3,6 \cdot 10^6$ células/ml, enquanto que a punção na epífise do fêmur resultou na média de 3 ml durante 30 minutos de procedimento cirúrgico obtendo a quantidade de $11,79 \cdot 10^6$ cél/ml e diminuindo-se o óbito dos animais. Desta maneira, os

autores concuíram que a análise para a obtenção de maior número de células mononucleadas/ml de medula óssea de coelho foi mais satisfatória na região da epífise do fêmur em comparação com a crista ilíaca.

KIM *et al.* (2009), em um estudo em coelhos, analisaram a eficácia do uso de camada única ou dupla de membrana de colágeno (Bio-Gide®) sobre blocos ósseos autógenos aposicionais em termos de aumento e reabsorção óssea. Após um período de 2, 4 e 6 meses os autores sacrificaram os coelhos e colheram amostras para análise histológica e histomorfométrica. Os autores obtiveram resultados apresentados uma diminuição da reabsorção óssea nos grupos cobertos pela membrana, relatando uma menor reabsorção e maior densidade óssea no grupo coberto por duas camadas. Os autores concluíram que a membrana de colágeno pode reduzir a reabsorção óssea do enxerto e além disso a técnica de dupla camada pode melhorar a eficácia da técnica de enxertia óssea aposicional.

KIM *et al.*, (2009) avaliaram o potencial das células-tronco do tecido periodontal e das células-tronco da medula óssea na regeneração óssea alveolar em um modelo de defeito peri-implantar em cães. Neste estudo foram utilizados quatro cães beagle machos adultos. As células-tronco mesenquimais adultas autólogas foram retiradas de crista ilíaca e as células-tronco do ligamento periodontal removidas de dentes extraídos. Todas as células foram cultivadas. Três meses após a extração, as células cultivadas foram associadas a materiais de enxertia óssea com hidroxiapatita e b-tricálcio fosfato (grupos de teste) e grupo controle somente com os materiais de enxertia. Os materiais de enxertia associados ou não às células foram implantados em três defeitos peri-implantares, do lado esquerdo da mandíbula e outros três do lado direito. O lado esquerdo

da mandíbula foi inicialmente preparado com a instalação dos implantes e criação dos defeitos ósseos, e após oito semanas, o lado direito foi também preparado. Os animais foram sacrificados depois de um período de cicatrização de 8 semanas. Após confecção de lâminas histológicas, os autores avaliaram histomorfometricamente a nova formação óssea através de contato osso-implante (BIC). Os autores também coraram e rastrearam as células através de marcadores fluorescentes. O grupo células tronco mesenquimais adultas autólogas teve maior formação de novo osso (34,99% e 40,17% após 8 e 16 semanas de cicatrização, respectivamente), seguido pelo grupo células tronco do ligamento periodontal (31,90% e 36,51%) e grupo controle (23,13% e 28,36 %), respectivamente. Os grupos teste exibiram uma nova formação óssea significativamente maior do que o grupo de controle em oito semanas, mas o mesmo foi verdade para apenas o grupo células tronco mesenquimais adultas autólogas em 16 semanas ($P < 0,05$). Células marcadas com fluorescência foram identificados junto aos portadores de HA / TCP e, em parte, perto de tecidos conjuntivos e osteóides. Desta maneira, este estudo demonstrou a viabilidade do uso de células tronco, tanto mesenquimais quanto periodontais na regeneração óssea em defeitos peri-implantares.

RETZEPI *et al.* (2009) realizaram uma revisão da literatura em relação à evolução biológica e ao conceito terapêutico da técnica de regeneração óssea guiada ao longo das duas últimas décadas. Além disso, apresentaram uma uma visão geral da técnica com foco específico nas evidências disponíveis sobre a sua eficácia e previsibilidade na promoção da regeneração de defeitos crânio-maxilo-facial críticos em tamanho, o potencial de neo-osteogênese e a reconstrução de rebordos alveolares

atróficos antes ou em conjunto com a colocação de implantes dentários. Os autores concluíram que pesquisas futuras devem se concentrar em (a) a investigação dos mecanismos moleculares subjacentes ao processo de cicatrização após a aplicação da técnica de regeneração óssea guiada; (b) a identificação do local cirúrgico e do tipo de paciente são fatores que impactam sobre a eficácia e previsibilidade da terapia de regeneração óssea guiada e (c) a avaliação da fisiopatologia do processo de cura de regeneração óssea guiada na presença de doenças sistêmicas que afetam potencialmente o sistema esquelético relacionados.

CHIAPASCO, CASENTINI, ZANIBONI (2010) realizaram uma revisão da literatura para avaliar o sucesso de diferentes técnicas cirúrgicas para a reconstrução de rebordos alveolares desdentados e as taxas de sobrevivência e sucesso de implantes colocados nestas áreas. Os autores selecionaram somente trabalhos publicados na MEDLINE e destes selecionaram 16 revistas entre 1975 a Janeiro de 2008 em que as investigações clínicas envolveram mais de 10 pacientes tratados consecutivamente com *Follow-up* médio de pelo menos 12 meses após o início do carregamento protético. Os seguintes procedimentos foram considerados: enxertos ósseos onlay, elevação do seio maxilar através de uma abordagem lateral, osteotomia Le Fort I com enxertos de interposição, técnicas de expansão óssea e distração osteogênica. Os autores relataram que poucos artigos afirmam superioridade de um procedimento cirúrgico, pois todos demonstram vantagens e desvantagens de cada técnica. Desta maneira, os autores concluíram que as conclusões cautelosas dos trabalhos, podem refletir a qualidade incerta dos estudos incluídos com potencial para estudos perdidos e viés de linguagem o que significa que as conclusões devem ser interpretadas com cautela.

CLUNE *et al.* (2010) avaliaram a neoformação óssea em defeitos críticos na calvária de coelhos após a utilização de partículas ósseas de diferentes tamanhos com exames tomográficos e histomorfométricos. Os autores compararam osso autógeno particulado e em pó com o grupo controle onde somente cola de fibrina foi utilizada no defeito. A mensuração das partículas foi realizada através de microscópio de dissecação com uso de micrômetro. Após um período de 4, 8 e 16 semanas foi realizada cranioplastia e as peças foram submetidas a exames tomográficos classificando a ossificação pela densidade óssea da região enxertada. Exames histológicos também foram realizados apresentando pequena formação óssea, com formação de tecido fibrosado, nos casos onde foi utilizado o osso em pó. Os autores relatam que o osso em pó não foi eficaz na cicatrização óssea devido a fatores relacionados ao tamanho das partículas e a um possível aquecimento das partículas no momento da coleta.

KIM *et al.* (2010) avaliaram a eficácia de aumento ósseo vertical em calvária de coelhos, utilizando bloco ósseo bovino desproteinado associado a colágeno 10% e bloco ósseo humano cortico-medular adicionado à proteína morfogenética BMP-2 em comparação à técnica de regeneração óssea guiada. Após 12 semanas os autores obtiveram maiores valores de aumento vertical nos grupos enxertados com osso humano cortico-medular. No grupo onde foi adicionada BMP-2, os autores observaram resultados similares à regeneração óssea guiada. Os autores concluíram com este estudo animal que os enxertos ósseos cortico-medulares humanos associados à BMP-2 podem ser uma alternativa de tratamento para ganho ósseo em altura.

PELEGRINE *et al.* (2010) avaliaram histomorfometricamente em humanos, a utilização de aspirado de medula óssea autógena com o objetivo de preservar do osso alveolar após exodontias. Os autores separaram dois grupos, no grupo teste, os alvéolos dentários frescos foram preenchidos com o aspirado e no grupo controle nada foi injetado. Foram realizadas mensurações clínicas imediatamente após as exodontias e após um período de seis meses quando também foram retiradas amostras teciduais para realização de histologia. Os autores relataram que houve menor perda óssea no grupo teste em relação ao controle. Do ponto de vista histológico/histomorfométrico não foram observadas diferenças entre os grupos. Os autores concluíram que os achados sugerem que o enxerto de medula óssea autógena pode contribuir para o reparo do osso alveolar após exodontias.

PETERBAUER-SCHERB *et al.* (2010) realizaram coleta de células estromais da medula óssea autógena de mini porcos e sua implantação em um procedimento de uma única etapa para regeneração condrogênica. Para isto, a fração de células estromais da medula óssea foi enriquecida com lise de células vermelhas, sedimentada ou centrifugada. Os autores analisaram o rendimento das células isoladas quanto a sua capacidade de proliferação, fenótipo e capacidade de diferenciação condrogênica. Foi observado pelos autores rendimentos mais altos de células obtidas por meio de lise, em comparação, a sedimentação foi menos eficiente, mas superior à centrifugação, que rendeu o número de células significativamente inferior ao da lise. Os autores avaliaram a diferenciação condrogênica pela quantificação de glicosaminoglicanos, coloração histológica e análise imuno-histoquímica para colágeno tipo II. Estas avaliações mostraram que os três métodos de isolamento *in vitro* produziram células capazes de gerar

tecido cartilaginoso. De acordo com os autores, a lise de células vermelhas pode ser usada para isolar de forma eficiente células mesenquimais da medula óssea suína em um curto espaço de tempo, o que permitiria uma etapa intra-operatória de procedimento em estudos pré-clínicos da regeneração da cartilagem.

PIERI *et al.*, (2010) avaliaram se a associação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (CT) com osso bovino inorgânico (OBI) pode melhorar a formação óssea e osseointegração de implantes em um modelo de regeneração óssea guiada aposicional em coelhos. Dois cilindros de titânio pré-fabricadas foram instaladas na calvária de 12 coelhos . Quatro grupos foram distribuídos entre as 24 cúpulas: GC: OBI sozinho e Grupos teste contendo 3×10^5 , 3×10^6 , ou 3×10^7 células associadas ao enxerto OBI. Após um mês, os cilindros foram removidas e um implante de titânio foi colocado em cada região enxertada aposicionalmete. Após um mês da segunda operação, os animais foram sacrificados e as amostras de biópsia foram analisadas histomorfometricamente e por microtomografias . Os resultados indicaram que em todas as concentrações, os grupos carregados com CT obtiveram diferenças significativas em relação à nova formação óssea e valores médios mais elevados de contato e densidade óssea em relação ao grupo controle. Além disso , as CT demonstraram ter uma relação dose - dependente, pois com a dose mais elevada foi observada uma regeneração óssea mais densa. Desta maneira os autores concluíram que este estudo sugere que a associação das CT ao OBI pode efetivamente aumentar os níveis de contato osso-implante e possibilitar regenerações ósseas aposicionais.

SAUERBIER *et al.*, (2010) avaliaram a formação óssea em procedimentos de enxertia de seio maxilar utilizando biomaterial xenógeno (Bio-Oss®) associado com células-tronco mesenquimais (MSCs), separados por dois métodos de isolamento diferentes (Ficoll e BMAC®), distribuídos em dois grupos 6 seios no grupo ficoll e 12 seios no grupo BMAC. Após 4,1 meses as biópsias ósseas foram obtidos e analisados. A formação de osso novo no grupo BMAC® foi 19,9% e no grupo FICOLL foi 15,5%. A diferença de 4,4% não foi significativa sugerindo que as células-tronco mesenquimais poderiam ter se diferenciado em osteogênicas, condrogênicas e linhagens adipogênicas. As células-tronco mesenquimais do aspirado de medula óssea em combinação com partículas de osso xenógeno podem formar osso lamelar e fornecer uma base confiável para implantes dentários. Os autores concluíram que o sistema fechado (BMAC®) é adequado para substituir o sistema aberto (FICOLL) em procedimentos de regeneração óssea.

SOLLAZZO *et al.*, (2010) estudaram células tronco humanas isoladas do sangue periférico quando associadas ao Bio-Oss ® podem induzir a diferenciação de osteoblastos em células-tronco mesenquimais, verificando por meio de RT-PCR os níveis de genes relacionados com osso e células-tronco mesenquimais. Os autores relataram uma indução de osteoblastos e de genes relacionados com osso. Em contraste, a expressão dos marcadores de células-tronco mesenquimais foi significativamente diminuída quando as células foram associadas ao Bio-Oss®. Assim concluíram que os resultados obtidos podem ser relevantes para melhorar a compreensão do mecanismo molecular da regeneração óssea e podem atuar como um modelo para a comparação de outros materiais com efeitos clínicos semelhantes.

daCOSTA *et al.* (2011) avaliaram em um estudo clínico em humanos, a eficácia de blocos ósseos alógenos impregnados com aspirado de medula óssea autóloga em defeitos ósseos aposicionais na maxila. Os autores selecionaram 10 pacientes com severas perdas ósseas horizontais em maxila anterior, divididos randomizadamente em 2 grupos. No grupo teste foram utilizados dois blocos ósseos homogêneos impregnados com aspirado medula óssea retirada da crista ilíaca do paciente imediatamente antes da cirurgia e no controle dois blocos homogêneos sem acréscimo do aspirado. Os autores utilizaram parafusos de titânio para fixação e como ponto de referência para mensuração do volume ósseo por meio de tomografia computadorizada. Após 6 meses da enxertia foram removidas amostras do tecido ósseo imediatamente antes da instalação dos implantes e enviadas para exames histológicos e histomorfométricos. Os autores mostraram melhores resultados tomográficos e histológicos no grupo onde foi utilizado o aspirado de medula óssea quando comparado ao grupo controle. Os autores sugerem que a adição de aspirado de medula óssea melhora o potencial regenerativo dos enxertos ósseos homogêneos.

PELEGRINE *et al.* (2011) avaliaram o potencial do osso homogêneo fresco congelado e do enxerto autógeno, associados ou não à medula óssea autógena, na formação óssea em coelhos. Os autores utilizaram cilindros de titânio para simularem reconstruções aposicionais que foram preenchidos com osso autógeno ou homogêneo associados ou não a medula óssea e controles somente com coágulo sanguíneo ou somente com medula óssea. Após avaliação clínica, os autores realizaram análise sob microscopia óptica e histomorfométrica. Os grupos experimentais apresentaram melhores resultados de formação óssea, em relação aos grupos controles ($P < 0,05$). No entanto, no grupo onde utilizou-se medula óssea os níveis de

formação óssea foram superiores ao do coágulo sanguíneo ($P < 0,05$). Os autores sugerem que enxerto homólogo fresco congelado produziu quantidades similares de novo osso, quando comparado com o enxerto autógeno. No entanto, a quantidade de partículas de osso desvitalizado residual foi maior nos grupos de osso homogêneo, o que pode indicar um processo mais lento de remodelação. Os autores concluíram que o osso homólogo fresco congelado parece ser um bom material osteocondutor e que a utilização de medula óssea autógena mostrou melhores resultados quando comparado com o coágulo sanguíneo. Esta pesquisa também indicou que, em reconstruções aposicionais, a utilização de materiais mineralizados faz-se necessária.

ROKN *et al.* (2011) compararam em um modelo animal as propriedades osteogênicas de um material sintético a base de fosfato de cálcio (Straumann Bone Ceramic®) com um material ósseo bovino inorgânico (Geistlich Bio-Oss®). Os autores avaliaram 13 coelhos com defeitos de 6,5 mm de diâmetro em calvária, sendo os sítios (G1) preenchido com Bio-Oss, (G2) com Bone Ceramic partícula pequena, (G3) com Bone Ceramic partícula grande, mantendo o sítio (G4) controle sem preenchimento. Após 4 e 8 semanas, os animais foram sacrificados, e os exames histológicos e histomorfométricos foram realizados. Os autores não relataram diferença estatística na quantidade de osso encontrada nos 3 grupos, porém, o grupo 3 apresentou uma maior reação inflamatória e de corpo estranho do que o grupo 2 e grupo 1, respectivamente.

YOSHIOKA *et al.*, (2011), avaliaram um transplante do aspirado do concentrado autólogo de medula óssea no tratamento para osteo-necrose da cabeça do fêmur induzida por corticosteróide em casos de lúpus

eritematoso sistêmico. A medula óssea foi aspirada da crista ilíaca, e concentrada por uma técnica de centrifugação convencional manual na bolsa de sangue e, em seguida, injetada nos quadris de 9 pacientes receptores. O número médio de células nucleadas para transplante foi $5,32 \times 10^7$ células / ml. Esta concentração de células foi significativamente maior após a concentração e a relação de concentração média foi de 5,5. Foi realizado follow-up mínimo de três anos, onde foi observada melhora significativa na dor. Para oito dos nove quadris, a cabeça do fêmur foi preservada com sucesso. No entanto, em um dos quadris, foi necessário artroplastia total 45 meses após a operação. Desta maneira, os autores concluíram que o transplante do aspirado do concentrado autólogo de medula óssea usando a técnica de centrifugação é um procedimento eficaz, seguro e de baixo custo, na terapia de tratamento para osteo-necrose da cabeça do fêmur induzida por corticosteróide induzida por corticosteróide em casos de lúpus eritematoso sistêmico.

ZHAO *et al.* (2011) avaliaram os resultados de defeitos em rádio de coelhos com a implantação de células-tronco mesenquimais e feixes vasculares em um arcabouço de osso esponjoso xenógeno desproteinado. 64 coelhos foram utilizados sendo quatro doadores de células-tronco mesenquimais. Os outros 57 coelhos foram distribuídos em cinco grupos com defeitos ósseos de 1,5 cm preenchidos com osso vascularizado e/ ou com células tronco mesenquimais adicionadas, sendo que os outros três coelhos foram utilizados como controle dos testes biomecânicos. Os autores compararam os resultados utilizando exames radiográficos e histológicos em quatro, oito e doze semanas com exames biomecânicos na

12^a semana, concluindo que a união das células-tronco mesenquimais com implementação de feixes vasculares resultaram em uma vascularização e osteogênese nos enxertos esponjosos xenógenos desproteínados melhorando a formação óssea e as propriedades mecânicas do enxerto.

ZHOU *et al.* (2011) avaliaram o efeito de dois tamanhos diferentes de partículas de osso inorgânico (300-500 e 850-1000 μ m) sobre a formação de novo osso em um modelo de regeneração óssea guiada no osso frontal de ratos. Em ambos os grupos, o osso recém formado foi visto histologicamente adjacente à superfície original do crânio, e houve proliferações para o centro do enxerto após quatro semanas. Dez semanas após a implantação da área criada por enxertia com pequenas partículas os autores observaram uma estrutura mais densa do que o criado com partículas maiores. A análise histomorfométrica mostrou uma maior densidade de osso neoformado no grupo de partículas pequenas do que no grupo de partículas grande ambos, tanto em quatro quanto em dez semanas após o implante. Os autores concluíram que o tamanho das partículas de osso enxertado e os espaços entre as partículas são determinantes importantes da osteogênese durante a regeneração óssea guiada.

De OLIVEIRA E SILVA *et al.* (2012) avaliaram a cicatrização óssea em calvária de coelhos Nova Zelândia após enxertia óssea xenógena utilizando como arcabouço mecânico Bio-Oss® enriquecido com células da medula óssea autógena, *in natura*. Os animais foram divididos em dois grupos de cinco cada, foram criados defeitos ósseos de 12 milímetros de diâmetro, bilateralmente à linha média. Nos animais do grupo controle, os defeitos foram preenchidos com Bio-Oss® sozinho e no grupo controle foi associado a medula óssea *in natura*. Todos os animais tiveram um dos

defeitos recobertos por membrana colágena reabsorvível Bio-Gide®. Após oito semanas os animais foram sacrificados e as calvárias foram avaliadas tomograficamente e histomorfometricamente. Os autores observaram diminuição do diâmetro do defeito no grupo teste em relação ao controle quanto comparado tomograficamente. A análise histomorfométrica não apresentou diferença na quantidade de tecido não mineralizado entre os grupos, porém para tecido mineralizado vital o grupo teste coberto pela Bio-Gide apresentou maior quantidade em relação ao grupo controle, já a quantidade de tecido mineralizado não vital no grupo experimental quando coberto pela membrana colágena, apresentou menor porcentagem de área quando comparado ao grupo controle. Os autores concluíram que o uso de medula óssea autógena e recobrimento com membrana colágena podem contribuir para uma melhor formação óssea.

MARKEL *et al.*, (2012) caracterizaram e quantificaram *in vivo* a reação inflamatória de quatro substitutos ósseos disponíveis no mercado. A hidroxiapatita coralina foi escolhida como exemplo de material puramente osteocondutor. Outros três materiais de matriz óssea desmineralizada foram escolhidos para representar os produtos que são tanto osteocondutores quanto osteoindutores. As amostras foram implantadas e colhidas após 14 dias. RNAm foi isolado para detectar a interleucina -1. Além disso, várias das características histológicas foram examinadas para quantificar as respostas celulares aos materiais implantados. Todos os substitutos ósseos induziram uma resposta inflamatória significativa em comparação com os controles negativos, indicaram nível de reação inflamatória elevada em materiais com maior proporção de matriz óssea desmineralizada. A hidroxiapatita gerou uma reação inflamatória baixa. Em conclusão, este estudo utilizou um modelo *in vivo* de biocompatibilidade para demonstrar

que uma importante reação inflamatória ocorre quando se usa substitutos de enxertos ósseos implantados. Os autores concluíram que mais estudos são necessários para determinar o material de enxerto ósseo ideal para maximizar a eficácia e minimizar a morbidade .

ANTUNES *et al.*, (2013) compararam a instalação imediata e tardia de implantes em defeitos circunferenciais associados com enxerto ósseo bovino mineralizado desproteinado (DBBM); hidroxiapatita / fosfato tricálcico (HA / TP); osso autógeno (Ab); e coágulo (GC); em relação à estabilidade do implante, osseointegração e manutenção de crista alveolar. Foram utilizados 6 cães submetidos a extrações de pré-molares inferiores, bilateralmente. Doze semanas após, quatro defeitos ósseos (6 mm de largura / 4 mm de comprimento) foram realizados, de um lado e preenchidos com aleatoriamente com: DBBM; HA / TP; ab; e Cg, respectivamente, e esperou a cicatrização do defeito ósseo. Após oito semanas, um implante foi instalado. Na mesma sessão quatro defeitos semelhantes foram realizados no lado oposto e foi realizada a enxertia com instalação imediata dos implantes. Os animais foram sacrificados após 8 semanas. A estabilidade dos implantes foi medida por meio de análise de frequência de ressonância na instalação e após o sacrifício. Foram preparados lâminas histológicas para análise de contato osso-implante (BIC); área óssea (BA); distância entre superfície do implante com a crista óssea (IS-C); distância entre superfície do implante com o primeiro contato osso-implante (IS-B); e as áreas ocupadas por tecido mole. Os resultados apresentaram BA e BIC superiores na abordagem realizada. O Cg exibiu maior BIC e BA, em comparação com outros materiais no corpo do implante total ($p = 0,004$ e $0,012$, respectivamente). O DBBM, grupos HA / TP e Ab prestados BA semelhante e BIC. A abordagem imediata resultou em menor reabsorção da crista comparado a abordagem por etapas. Os

biomateriais não afetaram o IS-C e medições IS-B. Área de partículas tendem a ser mais elevadas do que no grupo DBBM HA / TP ($P = 0,15$), enquanto que o infiltrado de tecidos moles foi maior no grupo DBBM quando utilizada na abordagem imediata ($P = 0,04$). A RFA indicou ganho de estabilidade na abordagem realizada ($P = 0,002$). O teste de correlação entre a RFA vs BIC e BA demonstrou estabilidade inferior para o grupo DBBM na abordagem imediata ($P = 0,01$).

CONSOLARO *et al.*, (2013) avaliaram as propriedades biológicas dos biomateriais substitutos ósseos particulados na aplicação em cavidades ósseas cirúrgicas, em relação às propriedades ideais deste biomaterial para que não seja antigênico e também em relação às características biomecânicas das partículas. Os autores concluíram que as partículas podem ou não serem reabsorvidas em sua totalidade resultando em uma neoformação óssea e então deve-se avaliar se as partículas dos biomateriais se osseointegraram e osseoremodelaram e então prosseguir com a instalação de implantes ou com a movimentação dentária.

DUTTENHOEFER *et al.* (2014) apresentaram um seguimento do trabalho do mesmo grupo no qual células mononucleares, incluindo as mesenquimais, foram concentradas ou por Ficoll (grupo de controle, $n=6$) ou BMAC® (grupo de teste, $n = 12$) e transplantado em associação com biomaterial mineral ósseo bovino. Um total de 50 implantes foram instalados em uma segunda intervenção cirúrgica (17 Ficoll/33 BMAC®) e carregados depois de 4 meses. Os autores relataram que a sobrevivência dos implantes no grupo Ficoll foi de 100% em comparação com o grupo BMAC, que teve 93,4% sobrevivência, sem diferença significativa entre os

dois grupos. Concluíram que o sistema BMAC® é um método eficaz e adequado para aplicação clínica na regeneração de tecido ósseo.

PELEGRINE *et al.*, (2014) compararam a cicatrização óssea após o uso de um biomaterial xenógeno osteocondutor (Bio-Oss®) enriquecido com medula óssea fresca (Grupo 1), com o mesmo arcabouço enriquecido com fração mononuclear da medula óssea (Grupo 2), ou com o biomaterial sozinho (Grupo Controle). Os autores utilizaram 21 coelhos divididos aleatoriamente em três grupos de seis animais e 1 grupo de 3 animais. Foram criados defeitos bilaterais de 12 mm diâmetro nos ossos parietais dos animais. No grupo controle, os defeitos foram preenchidos com o xenoenxerto sozinho (n = 6); no Grupo 1 (controle negativo), com o xenoenxerto enriquecido com medula óssea fresca (n = 6); no Grupo 2, com o xenoenxerto enriquecido com fração mononuclear da medula óssea (n = 6) e no grupo não preenchido, nada foi enxertado (n = 3). Nos Grupos 1, 2, e de controle, um dos defeitos foi coberto de forma aleatória, com uma membrana colágena servindo de barreira tecidual. Os coelhos foram sacrificados 8 semanas após a cirurgia, e os ossos parietais foram colhidos e analisados histomorfometricamente. Os autores relataram que a análise histomorfométrica não mostrou nenhuma diferença entre o Grupo 1 e o Grupo Controle em relação à área de tecido mineralizado não vital, mas o Grupo 2 apresentou percentual significativamente maior do que o grupo controle para ambas as situações, onde a membrana colágena foi utilizada ($21,24 \pm 3,78$ % e $13,52 \pm 3,00$ %, respectivamente) e sem membrana ($20,91 \pm 2,01$ % e $13,08 \pm 1,72$ %, respectivamente). O Grupo 2 apresentou o maior percentual de área de tecido mineralizado vital, seguido pelo grupo 1 e pelo grupo controle ($P < 0,05$) para ambas as situações, com a membrana ($28,17 \pm 3,19$ %; $21,14 \pm 7,38$ % e $13,06 \pm 5,24$ %, respectivamente) e sem

membrana ($21,13 \pm 0,55$ %; $12,45 \pm 6,34$ % e $6,56 \pm 1,20$ %, respectivamente). O Grupo 2 apresentou o menor percentual de área de tecido não mineralizado, seguido pelo Grupo 1 e Grupo Controle ($P < 0,05$) para ambas as situações, com a membrana ($50,59 \pm 6,64$ %; $58,75 \pm 7,14$ % e $73,41 \pm 6,87$ %, respectivamente) e sem membrana ($57,97 \pm 1,91$ %; $71,74 \pm 6,63$ % e $80,37 \pm 2,67$ %, respectivamente). Os lados, em que os defeitos foram cobertos com a membrana barreira mostraram melhor cicatrização óssea em comparação com os lados descobertos, em todos os grupos (comparação entre grupos, $p < 0,05$). As amostras do grupo não preenchido (controle negativo) não mostraram formação óssea. Desta maneira os autores concluíram que ambos os métodos que utilizam as células estromais da medula óssea contribuem para melhorar a cicatrização óssea, especialmente quando da utilização da fração de células mononucleares da medula óssea. Além de que a utilização de uma membrana como barreira tecidual parece ter um efeito sinérgico.

ZIGDON *et al.* (2014) compararam o potencial de vários biomateriais osteocondutores para a realização de regeneração óssea vertical com cilindros de ouro. Os cilindros foram instalados na calvária de ratos Lewis machos distribuídos em 4 grupos: (1) Bio-Oss Collagen; (2) Beta tricálcio fosfato; (3) esponja de colágeno; (4) cilindro vazio. Após 4 semanas de cicatrização os autores relataram o aparecimento de um novo osso maduro, altamente vascularizado, e sem sinais de inflamação. A altura óssea vertical no grupo 2 foi maior do que todos os outros grupos, mas significativamente apenas para o grupo 1 ($p = 0,0145$). A altura total de tecidos foi significativamente maior ($p < 0,0001$) em ambos os grupos 1 e 2 em comparação com os grupos 3 e 4. Desta maneira os autores concluíram que o uso de beta tricálcio fosfato em conjunto com uma barreira resultou em maior aumento de osso vertical na calvária de ratos

MÉTODOS

4. Métodos

Desenho de Pesquisa:

Desenho de estudo adotado: Primário; intervencional; experimental; longitudinal; prospectivo; aleatorizado; duplo cego; centro único realizado nas dependências do Hospital São Paulo e da Universidade Federal de São Paulo.

A pesquisa foi realizada no período entre 2011-2013, aprovado pelo comitê de ética em pesquisas da Unifesp, CEP-UNIFESP 1812/11 (ANEXO 1).

4.1 AMOSTRA

No presente estudo foram utilizados doze coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com peso entre 3,5 a 4,0 kg e idade variando entre dez e doze meses, provenientes do biotério central da Unifesp (Cedeme).

Os animais passaram por um período de adaptação às condições ambientais, de acordo com o comitê de ética em pesquisa em animais e com a lei n ° 11.794 de 8 de outubro de 2008, nas dependências do CEDEME/UNIFESP, previamente ao estudo, em salas com temperatura controlada entre 18 a 20° C e separados em gaiolas individuais específicas para coelhos, recebendo alimentação baseada em ração comercial peletizada e água *ad libitum*.

O substituto ósseo xenógeno de origem bovina descalcificado e desproteinado, constituído principalmente por hidroxiapatita, utilizado neste estudo foi o Bio-Oss ® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça).

Para padronizar o volume de material a ser utilizado na enxertia óssea aposicional foram utilizados cilindros de titânio tipo IV

comercialmente puro com 6mm de diâmetro por 5mm de altura, passível de ser fechado por tampa rosqueável obliterativa, com fundo aberto e com dois pontos de fixação ao osso parietal através de parafusos com 3mm de comprimento por 1,5mm de diâmetro. Todos os vinte e quatro cilindros foram confeccionados em torno de precisão pela mesma empresa (Microplant, São Paulo, SP, Brasil).

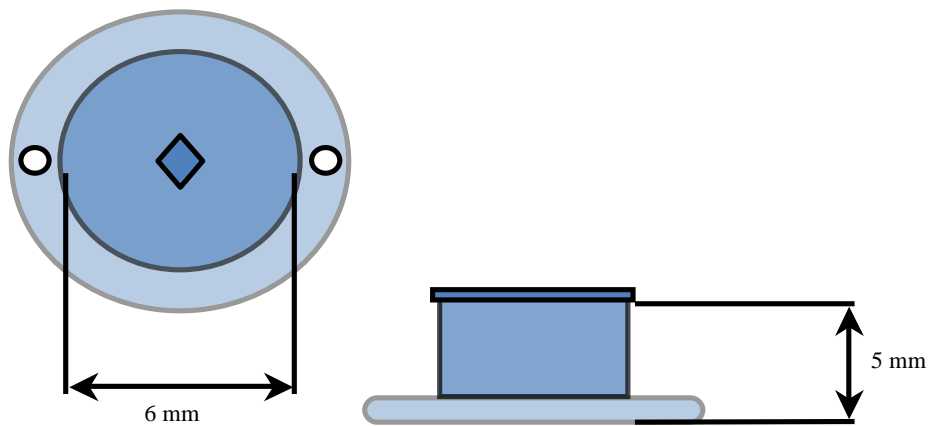


FIGURA 1: Esquema do Cilindro de Titânio utilizado no estudo.

4.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizada uma distribuição dos animais em dois grupos com seis animais em cada grupo de forma randomizada por meio de um programa de randomização, disponível no site www.randomization.com, sendo utilizado por um estatístico que não tinha conhecimento do estudo. O sistema gerou uma sequência de alocação para os grupos controle e experimental, na proporção de 1:1. A alocação dos animais nos grupos foi mantida sigilosamente em envelopes opacos fechados. Os envelopes foram abertos apenas no momento da intervenção cirúrgica.

Em cada animal foram criadas situações de reconstruções ósseas aposicionais, com auxílio dos cilindros de titânio. Os cilindros foram fixados por dois parafusos de 3mm e preenchidos com material de enxertia,

bilateralmente, nos ossos parietais. Nos animais do grupo controle, os dispositivos foram preenchidos com um enxerto ósseo xenógeno de hidroxiapatita bovina e, nos do grupo experimental preenchidos com o enxerto ósseo xenógeno enriquecido com concentrado de células da medula óssea. As análises histomorfométricas e de volume foram realizadas por dois examinadores cegos calibrados previamente e, em caso de discórdia o espécime era reavaliado e um consenso foi obtido.

Foi realizado mascaramento do investigador que realizou as intervenções cirúrgicas. O investigador foi treinado para realização da técnica cirúrgica e, no momento da aplicação dos materiais de enxertia nos grupos controle e experimental, ele recebeu o material sem ter conhecimento de que se tratava de um ou de outro grupo.

4.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO

Os animais foram submetidos à anestesia geral induzida via endovenosa com quetamina (40mg/kg), midazolam (2mg/kg) e citrato de fentanila (0.8microg/kg) e manutenção por mistura de isoflurano/N₂O[1:1.5%]: oxigênio [2/3 : 1/3] com o uso de máscara facial pediátrica.

Posteriormente à execução de tricotomia na cabeça dos animais com o auxílio de tricótomo elétrico com pente nº1, foi realizada assepsia do meio com solução de iodo-povidona e administrada anestesia local com lidocaina 2% com epinefrina 1:100.000 com auxílio de seringa tipo carpule com agulha 30G curta 0,30x22mm, com intuito de promover uma isquemia local. A linha de incisão, em linha média, foi demarcada e padronizada iniciando-se posteriormente no ponto imediatamente anterior a inserção das orelhas e finalizando anteriormente no ponto mais anterior dos arcos

supraciliares. A incisão sagital foi efetuada por meio de lâmina nº 15c acoplada a cabo de bisturi nº2. Após confirmação da incisão realizou-se o rebatimento total da pele e do periósteo (Figura 2).

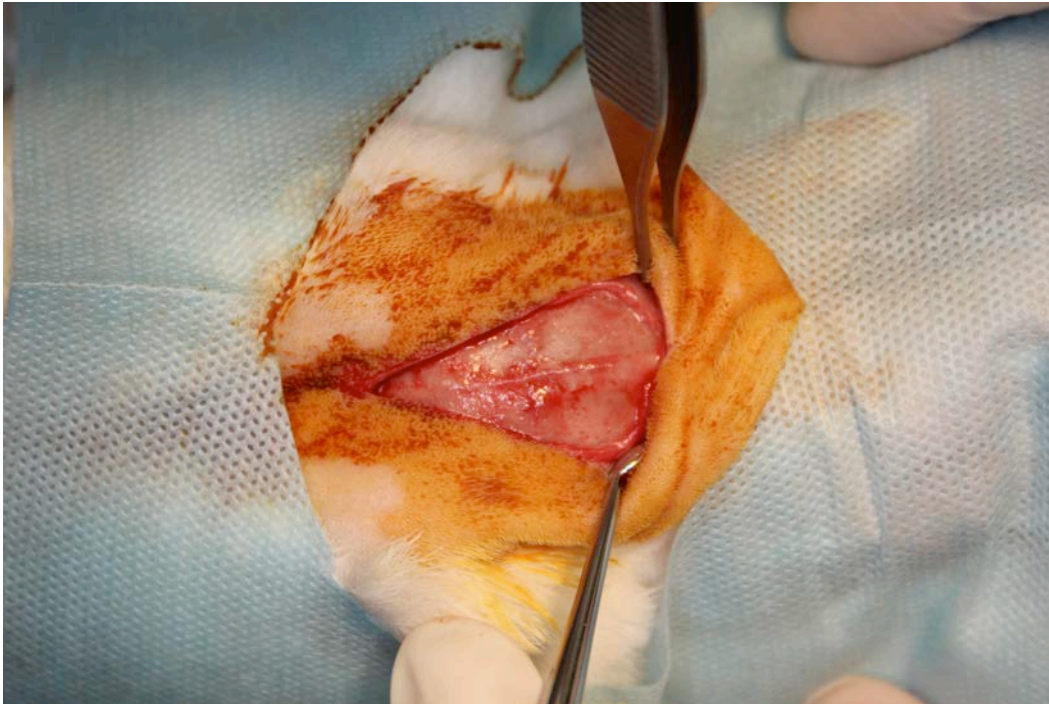


FIGURA 2: Incisão e rebatimento total da pele e do periósteo.

Neste momento os cilindros foram posicionados sobre os ossos parietais para testar a área de contato entre toda a margem inferior interna do cilindro com a cortical óssea, sem a presença de espaços. Nos casos onde haviam irregularidades ósseas gerando espaços nesta interface uma lima para osso foi utilizada para se remover qualquer interferência e anular os espaços, possibilitando um íntimo contato osso-cilindro (Figura 3). Após conformação da superfície óssea os dois cilindros foram instalados sobre os ossos parietais, à esquerda e à direita da sutura sagital. Foi mantida uma distância de 2mm da margem da base do cilindro tanto em relação à sutura sagital quanto à sutura medial. Os dispositivos cilíndricos de titânio foram fixados à calvária dos animais por dois parafusos auto rosqueantes com 3mm de comprimento (Figura 4).



FIGURA 3: Utilização de uma lima para raspagem e alisamento do tecido ósseo.

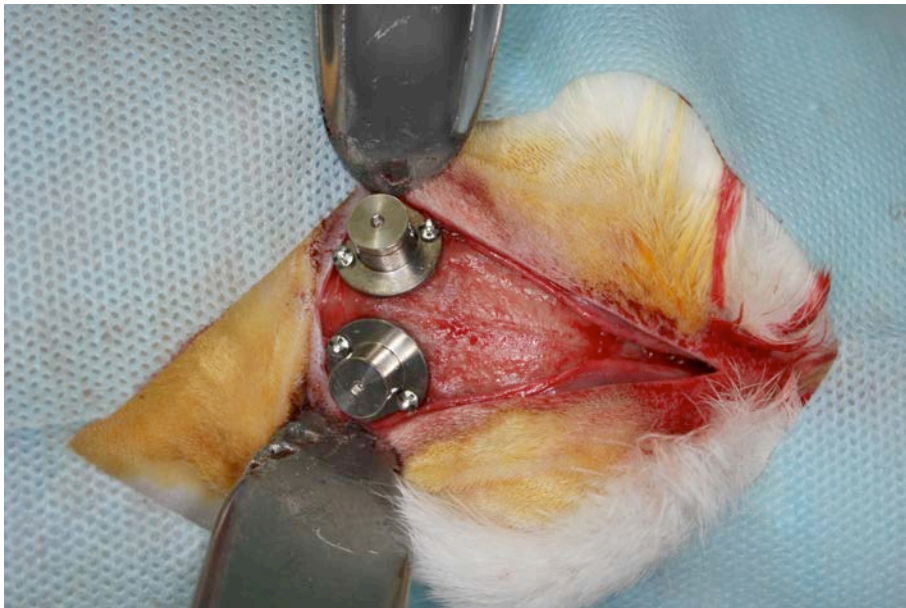


FIGURA 4: Instalação dos cilindros fixados posteriormente à sutura medial, ao lado direito e esquerdo sutura sagital.

Com os dispositivos instalados foi realizada, na área interna dos cilindros, cinco perfurações (caudal, coronal, medial, lateral e central) com auxílio de fresas diamantadas esféricas nº2 (Komet Brazil, Santo André-SP-Brasil) para realização de osteotomia, acoplada a uma contra ângulo cirúrgico redutor 20:1 (NSK- Nakanishi International, Japão) ligada à um motor elétrico (NSK- Nakanishi International, Japão), com irrigação constante, para decorticalização da cortical externa do osso parietal, expondo a camada medular do osso parietal, no intuito de levar nutrição e vascularização sanguínea ao enxerto ósseo (Figura 5). Neste momento foram depositados no interior dos cilindros, de forma randomizada, 0,150g do material de enxertia, pesado com balança de precisão, carregado ou não com concentrado de células mononucleares da medula óssea (FMMO). O material de enxertia foi levado ao interior dos cilindros com o auxílio de espátulas de inserção e acomodado com leve pressão conforme preconizado pelo fabricante, evitando a quebra das partículas (Figura 6).

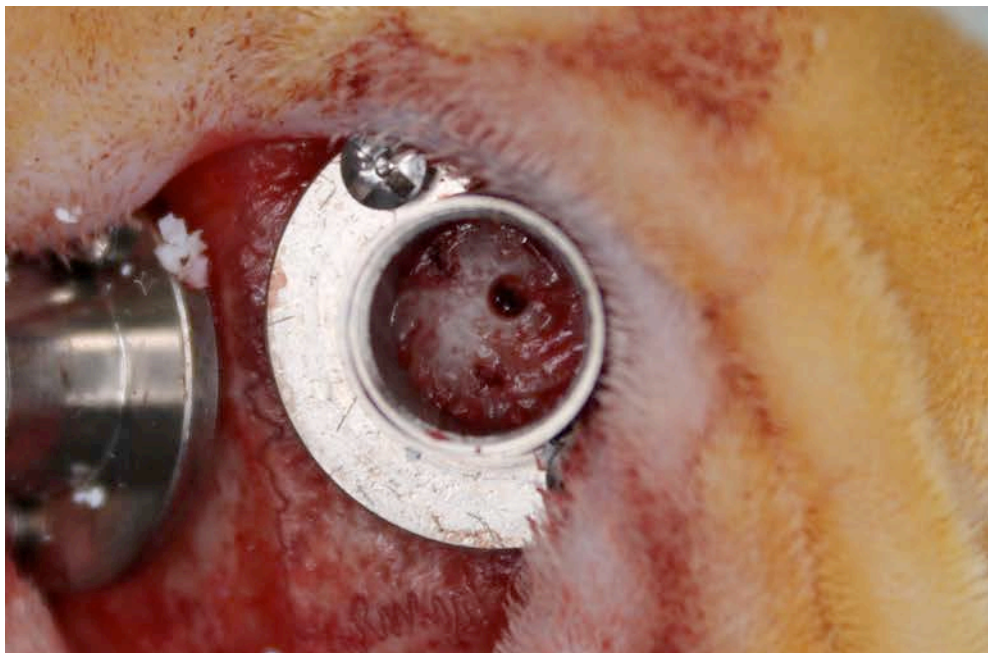


FIGURA 5: Pontos de decorticalização óssea.



FIGURA 6: Material de enxertia acondicionado no interior dos cilindros de titânio. Animal do Grupo Controle somente o material de enxertia e Animal do Grupo Experimental, material de enxertia associado à Fração de Células Mononucleares da Medula Óssea (FMMO).

Após o preenchimento total dos cilindros e de seu fechamento pelas tampas rosqueáveis obliterativas (Figura 7), para que o material de enxertia acondicionado em seu interior não tivesse contato com o tecido mole, foi realizado fechamento do campo cirúrgico com realização de sutura por pontos interrompidos com fio Nylon 4-0, para fechamento total do campo operatório (Figura 8).

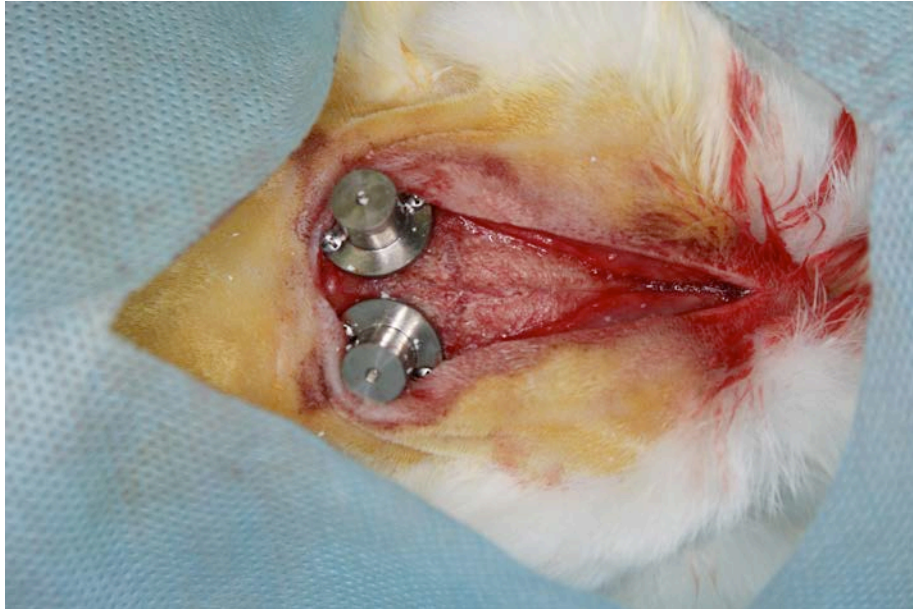


FIGURA 7: Fechamento dos cilindros com tampas rosqueáveis obliterativas.



FIGURA 8: Sutura do campo operatório por pontos interrompidos com fio Nylon 4-0.

Nenhum animal apresentou deiscência de sutura ou quaisquer intercorrências no período pós operatório. Todos os cilindros permaneceram estáveis e fechados após o período pós operatório.

Durante as oito semanas do período pós operatório, os animais foram medicados com antibiótico e anti-inflamatório (cefazolina sódica 30mg/kg IM de 12 em 12 horas e fluxina meglumina 1,0mg/kg IM a cada 24 horas por 3 dias, respectivamente). Para obtenção da analgesia foi utilizado cloridrato de tramadol (2mg/kg/SC de 8 em 8 horas por 3 dias). A higienização das feridas cirúrgicas foi realizada com gazes umedecidas em solução fisiológica 0,9% com posterior aplicação de iodo-povidona e ataduras três vezes ao dia por um período de quinze dias, com os animais recebendo água e ração *ad libitum* pelo restante do período experimental.

Oito semanas após o experimento os animais tiveram óbito indolor induzido através da aplicação de quetamina (40mg.kg⁻¹ IM) e sobre dose de tiopental sódico via catéter na veia auricular marginal. Após eutanásia a região da calvária foi reaberta, os cilindros tiveram suas tampas removidas e foram realizadas as medições de volume.

Posteriormente todos os cilindros foram removidos com auxílio de uma broca metálica carbide tronco cônica nº702 (Komet Brazil, Santo André-SP-Brasil) acoplada a uma peça reta cirúrgica 1:1 (NSK- Nakanishi International, Japão) ligada à um motor elétrico (NSK- Nakanishi International, Japão) de maneira cuidadosa mantendo o osso da calota craniana fixado inferiormente ao cilindro e uma margem de 1,5mm a 2,0mm ao redor dos cilindros (Figura 9). Estes conjuntos de cilindro com osso subjacente foram fixados e descalcificados para processamento histológico.

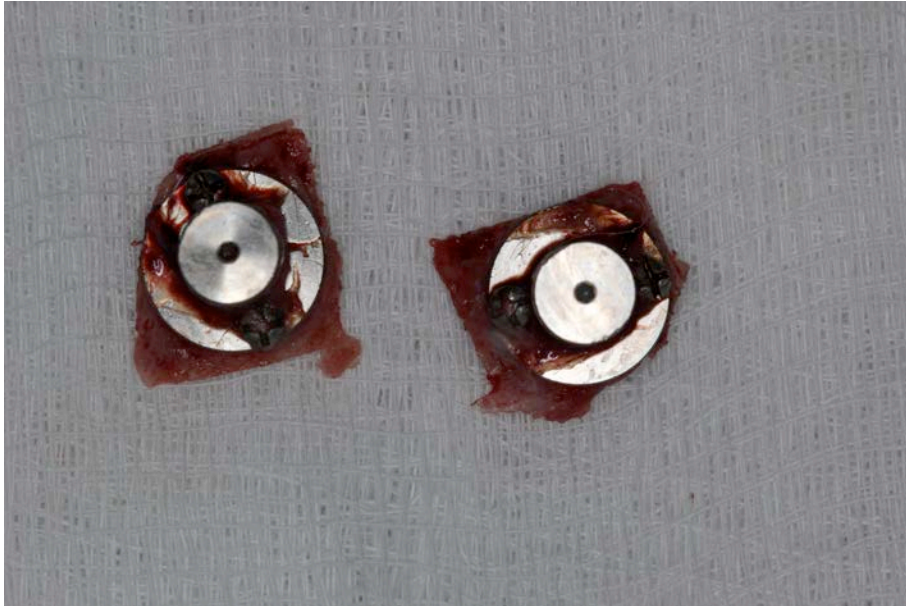


FIGURA 9: Conjunto de cilindros de titânio removidos após eutanásia dos animais com osso parietal.

4.4 CONCENTRAÇÃO DA FRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DA MEDULA ÓSSEA (FMMO).

A aspiração da medula óssea foi realizada imediatamente antes do início da cirurgia, por meio do ponto ântero-superior das tíbias direita e esquerda de cada animal (Figura 10) já sob anestesia geral. Dois mililitros de medula óssea foram aspiradas de cada tíbia utilizando agulha 40x10 (1.10mm x 38mm) em seringas de 20 ml previamente heparinizadas para prevenção da coagulação sanguínea.



FIGURA 10: Punção para aspiração da medula óssea.

Para padronizar o estresse sofrido, a medula óssea foi aspirada de todos os animais, descartada no grupo Controle e utilizada no grupo Experimental e processada da seguinte maneira:

- Aspiração de 4ml de medula óssea;
- Transferência da medula óssea para tubos cônicos de 15ml contendo heparina [1000 unidades/ml];
- Homogeneização da medula óssea no interior dos tubos;

- Separação da medula óssea por meio da técnica de gradiente de densidade por centrifugação com Ficoll-Histopaque 1077® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a qual foi adicionado à FMMO de acordo com a recomendação do fabricante, ou seja, cada 3,5 ml de medula óssea foi diluído em uma proporção 1:1 com PBS em um tubo Falcon contendo a mesma quantidade de Ficoll-Histopaque 1077®;
- Centrifugação por 30 minutos a 400g em 22°C;
- Pipetagem da camada de células mononucleares (Figura 11);
- Lavagem das células com PBS;
- Preenchimento de outro tubo com a camada de células mononucleares e adição de PBS até o volume total de 4ml;
- Centrifugação a 200g por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Descarte do sobrenadante;
- Ressuspensão do *pellet* em 1ml de PBS.

Esta suspensão final contendo a FMMO foi então associada ao substituto ósseo xenógeno no grupo experimental (FIGURA 12).

Uma amostra de 1ml foi extraída de cada animal para quantificação de células viáveis pelo método de azul de Trypan.

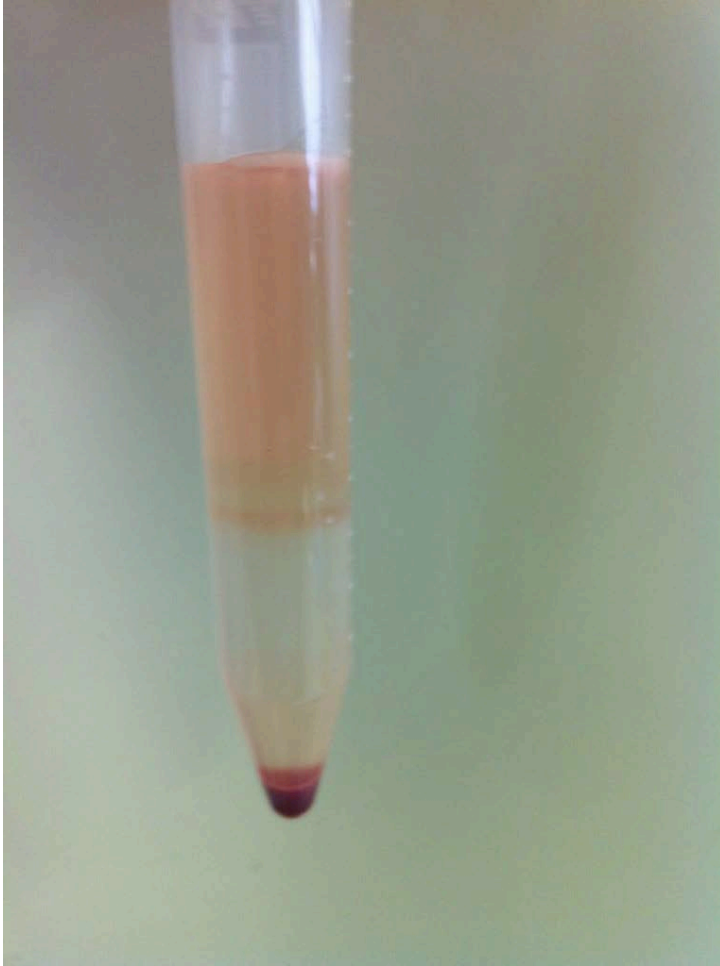


FIGURA 11: Tubo cônico de 15ml após separação por gradiente de densidade. A FMMO está delimitada entre a solução de Ficoll (translúcida) e o plasma sobrenadante.



FIGURA 12: Fração de células mononucleares da medula óssea associada ao material de enxertia.

4.5. MENSURAÇÃO DO VOLUME TECIDUAL

Após eutanásia a região da calvária foi reaberta e as tampas oclusivas rosqueáveis removidas, o que permitiu a verificação da altura óssea remanescente. Isso possibilitou o cálculo do volume tecidual conquistado, por meio da fórmula matemática do volume de cilindro, $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$, onde “V” é volume, “ π ” é 3,1416, “r” é raio e “h” é altura.

O volume tecidual contido no interior de cada cilindro foi mensurado, no momento de reabertura, com o auxílio de sonda milimetrada de teflon com um *stop* de borracha. Após mensuração, a exata distância entre o *stop* de borracha e a ponta da sonda foi aferida por meio de um paquímetro digital (Mitutoyo Latino americana, Santo André-SP-Brasil). A sonda foi introduzida até a obtenção de resistência tecidual, não permitindo o aprofundamento adicional da mesma. Foram mensurados quatro pontos internos pré-determinados (coronal, caudal, medial, lateral) em relação ao

topo da região reconstruída com a borda externa do cilindro (Figura 13). As medidas levaram em conta a espessura da tampa do cilindro (1mm), a qual foi descontada do valor total da altura do cilindro (5mm). Portanto, a medida máxima em altura foi de 4mm sendo quantificadas as medidas perdidas em cada defeito.

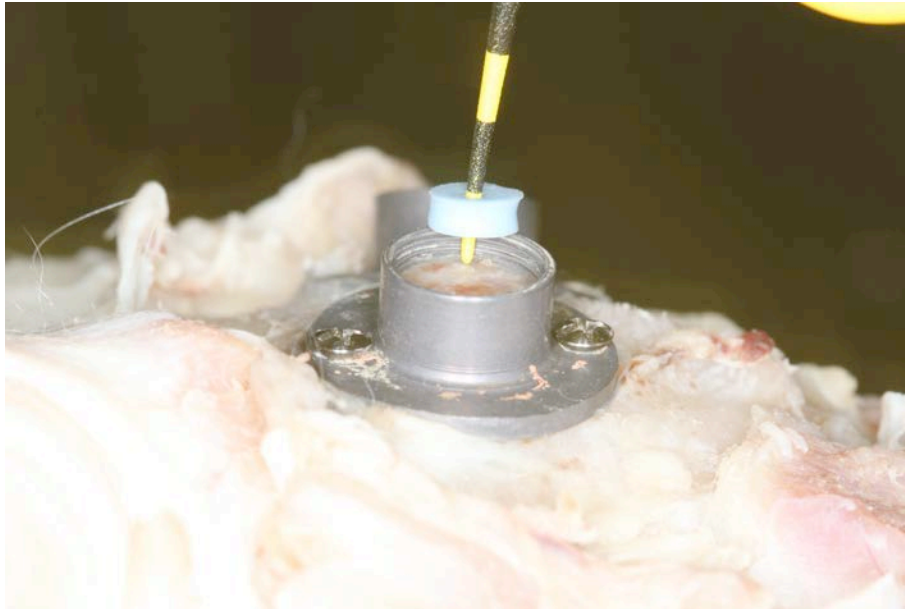


FIGURA 13: Mensuração da altura tecidual.

4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Após remoção do fragmento ósseo com o cilindro ainda fixado, o conjunto foi submergido em formol 10% e, posteriormente, em EDTA 10% por 36 horas para serem descalcificadas. Posteriormente os espécimes foram levados ao laboratório de histologia da UNIFESP onde foram processados para inclusão em blocos de resina Technovit 9100 NEU®. As lâminas histológicas foram confeccionadas com auxílio de micrótomo Isomet 2000® que promoveu corte do conjunto contendo o cilindro de titânio e o material de enxertia em seu interior. O corte foi realizado no

segundo milímetro à partir do centro dos cilindros com espessura final de 7 micrômetros. Posteriormente, as lâminas foram coradas pela técnica de *Stevenel's Blue* e fixadas com cianocrilato em lâminas de vidro (Figura 14).



FIGURA 14: Lâmina histológica.

Todas as lâminas foram analisadas em seis áreas (superior esquerda; inferior esquerda; superior central; inferior central; superior direita; inferior direita) e foi realizada a média por lâmina.

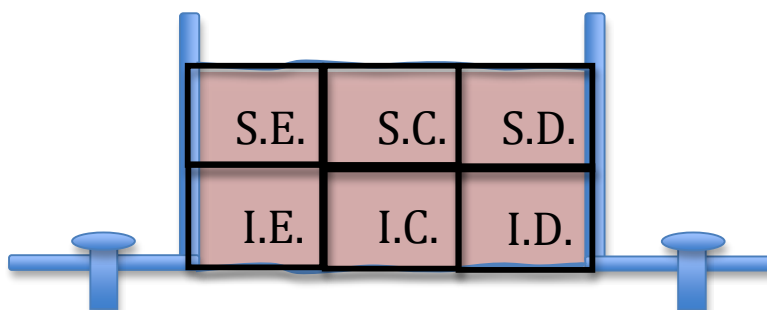


FIGURA 15: Divisão das áreas fotografadas nas lâminas histológicas. S.E. – Superior esquerda; I.E. - inferior esquerda; S.C. - superior central; I.C. - inferior central; S.D. - superior direita; I.D. - inferior direita.

De cada uma das seis áreas de cada lâmina foram obtidas imagens digitais capturadas através de câmera digital CCD® (Rt Color; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) acoplada a um microscópio de luz Nikon Eclipse Ti-U com uma objetiva de 10x com escala de 100 micrômetros.

Dois examinadores cegos foram calibrados previamente e, em caso de discórdia o espécime era reavaliado e um consenso obtido. Os examinadores traçaram todas as imagens utilizando o programa infinity analyse® (Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) (Figura 16) para mensuração dos parâmetros: [1] Tecido Mineralizado Não Vital (TMNV); [2] Tecido Mineralizado Vital (TMV); [3] Tecido Não Mineralizado (TNM); [4] Contato Tecido Mineralizado Vital com Titânio (CTMVT). Todos os resultados foram obtidos em micrômetros quadrados e expressados em porcentagem da área total.

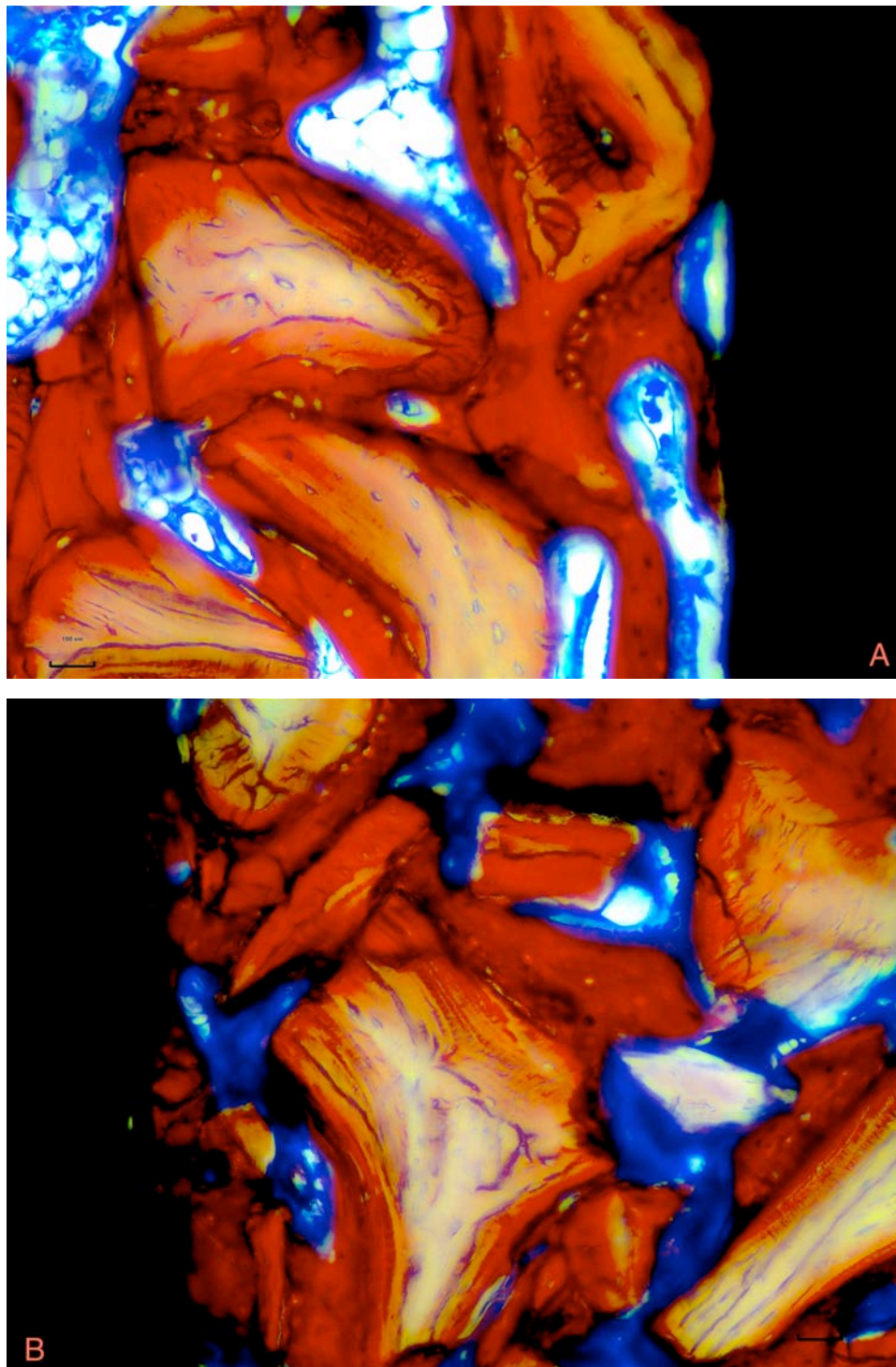


FIGURA 16: Secção histológica de lâmina G1 (Controle) (A). Lâmina G2 (Experimental) (B) – magnificação de 100x. Tecidos Mineralizado Vital em vermelho; Tecido Mineralizado Não Vital em ocre; Tecido Não Mineralizado em azul e branco; Parede interna do cilindro de titânio em preto.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado baseado no desfecho primário, que foi determinado como a mensuração da influência da FMMO no enxerto xenógeno na geração de TMV, CTMVT e volume de tecido mineralizado. O tamanho da amostra foi definido pelo método "Mead's Resource Equation".

Todos os dados quantitativos foram analisados pelo software SPSS-V17 ® (SSPS Inc. 233, Chicago, IL, USA). O teste Wilcoxon foi utilizado para comparar os resultados obtidos em relação as variáveis TMNV, TMV, TNM, CTMVT quantificadas em micrômetros quadrados e transformadas em percentual. Para a análise de volume de ganho tecidual a medida do ganho em altura foi efetuada em milímetros e, após determinação do volume em milímetros cúbicos, foi também transformada em percentual. Para todos os grupos, a hipótese nula (H_0) testada foi de igualdade entre a média dos grupos ($média_1=média_2$). O nível de confiança assumido foi de 5%, ou seja, de 95% de confiança. Foi utilizado o coeficiente de correlação Spearman para avaliar a concordância entre avaliadores.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1. TESTE INTER EXAMINADORES

O coeficiente de correlação de Spearman apresentou grande concordância entre examinadores (Apêndice 1).

5.2. ANÁLISE DAS VARIÁVEIS

A análise dos valores de volume tecidual não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 1).

Coelho	GC				GE				Valor de p
	CD	CE	Média	DP	CD	CE	Média	DP	
1	40,17	30,63	35,34	6,75	98,96	98,96	98,96	0,00	
2	98,96	98,96	98,96	0,00	98,96	98,96	98,96	0,00	
3	98,96	98,96	98,96	0,00	98,96	98,96	98,96	0,00	
4	98,96	98,96	98,96	0,00	98,96	98,96	98,96	0,00	
5	98,96	98,96	98,96	0,00	98,96	98,96	98,96	0,00	
6	98,96	98,96	98,96	0,00	98,96	98,96	98,96	0,00	
Média Volume			88,36				98,96		
Mediana			98,96				98,96		0,4047
DP			25,97				0,00		

Tabela 1: Valores do volume tecidual interno nos cilindros esquerdo (CE) e direito (CD) expressa em porcentagem (%) dos grupos controle (GC) e experimental (GE)..

Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de $p (< 0,05)$ foram assinalados por (*).

A análise dos valores de tecido mineralizado não vital (TMNV) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 2).

Coelho	GC				GE				Valor de p
	CD	CE	Média	DP	CD	CE	Média	DP	
1	28,32	24,86	26,59	12,57	32,68	20,21	26,45	13,05	
2	28,12	21,21	24,66	8,85	24,60	22,76	23,68	12,18	
3	28,73	28,93	28,83	11,09	30,13	28,94	29,53	10,53	
4	28,88	32,70	30,79	11,61	23,94	23,20	23,57	11,42	
5	32,61	29,25	30,93	11,24	26,19	21,71	23,95	11,83	
6	27,46	30,10	28,78	5,09	25,09	27,37	26,23	7,96	
Média			28,43				25,57		
Mediana			28,80				25,09		0,1179
DP			2,44				2,33		

Tabela 2: Valores de tecido mineralizado não vital TMNV nos cilindros esquerdo (CE) e direito (CD) expressa em porcentagem (%) dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de $p (< 0,05)$ foram assinalados por (*).

A análise dos valores de tecido mineralizado vital (TMV) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 3).

Coelho	GC				GE				Valor de p
	CD	CE	Média	DP	CD	CE	Média	DP	
1	8,81	3,51	6,16	7,56	18,43	18,68	18,55	12,64	
2	10,80	10,67	10,74	11,12	17,77	16,61	17,19	14,98	
3	34,64	27,41	31,02	7,35	35,12	40,92	38,02	13,58	
4	26,89	18,03	22,46	18,22	31,28	36,26	33,77	8,56	
5	20,95	21,52	21,24	14,91	18,47	33,92	26,19	15,58	
6	22,84	21,45	22,15	9,25	34,15	34,58	34,37	11,34	
Média			18,96				28,02		
Mediana			21,69				29,98		0,3087
DP			9,00				8,76		

Tabela 3: Valores de tecido mineralizado vital TMV nos cilindros esquerdo (CE) e direito (CD) expressa em porcentagem (%) dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de $p (< 0,05)$ foram assinalados por (*).

A análise dos valores de tecido não mineralizado (TNM) não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos (Tabela 4).

Coelho	GC				GE				Valor de p
	CD	CE	Média	DP	CD	CE	Média	DP	
1	62,87	71,63	67,25	15,46	48,89	61,11	55,00	10,01	
2	61,08	68,11	64,60	12,21	57,63	60,63	59,13	13,34	
3	36,63	43,66	40,15	13,84	34,75	30,14	32,45	16,84	
4	44,23	49,27	46,75	11,52	44,78	40,54	42,66	10,92	
5	46,44	49,23	47,83	15,28	55,34	44,37	49,86	16,19	
6	49,70	48,45	49,07	9,99	40,75	38,05	39,4	14,85	
Média			52,61				46,42		
Mediana			48,45				46,26		0,6412
DP			10,80				10,06		

Tabela 4: Valores de tecido não mineralizado TNM nos cilindros esquerdo (CE) e direito (CD) expressa em porcentagem (%) dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de $p (< 0,05)$ foram assinalados por (*).

A análise dos valores de contato ente tecido mineralizado vital e titânio (CTMVT) os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (Tabela 4).

Coelho	GC				GE				Valor de p
	CD	CE	Média	DP	CD	CE	Média	DP	
1	4,69	6,41	5,55	10,44	2,92	57,88	30,40	30,08	
2	0,00	0,00	0,00	0,00	22,54	18,25	20,40	25,31	
3	8,23	13,39	10,81	20,76	0,00	29,26	14,63	20,09	
4	0,00	0,00	0,00	0,00	8,55	51,05	29,80	35,24	
5	5,31	10,28	7,79	15,38	30,94	20,93	25,93	35,65	
6	7,40	4,01	5,75	11,28	47,77	37,34	42,56	35,69	
Média			4,98				27,29		
Mediana			5,65				27,86		0,0258*
DP			4,30				9,58		

Tabela 5: Valores de contato tecido mineralizado vital – titânio CTMVT nos cilindros esquerdo (CE) e direito (CD) expressa em porcentagem (%) dos grupos controle (GC) e experimental (GE). Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de $p (< 0,05)$ foram assinalados por (*).

A Tabela 6 sintetiza os valores encontrados pelas análises histomorfométricas.

	Grupos		n	Valor de P
	GC	GE		
TMNV	28,43 ± 2,44	25,57 ± 2,33	6	0,11
TMV	18,96 ± 9,00	28,02 ± 8,76	6	0,30
TNM	52,61 ± 10,80	46,42 ± 10,06	6	0,64
CTMVT	4,98 ± 4,30	27,29 ± 9,58	6	0,02*

Tabela 6: Comparação dos valores das médias \pm desvio-padrão dos percentuais de tecido mineralizado não vital (TMNV), tecido mineralizado vital (TMV), tecido não mineralizado (TNM) e contato tecido mineralizado vital – titânio (CTMVT) entre os grupos controle (GC) e experimental (GE)

Teste de Wilcoxon onde os valores considerados significantes de p ($<0,05$) foram assinalados por (*).

DISCUSSÃO

6. Discussão

O tratamento reabilitador por meio de implantes osseointegráveis associado à reconstrução do tecido ósseo são comumente utilizados para o tratamento de pacientes, especialmente nas áreas odontológica e ortopédica (CHIAPASCO, CASENTINI, ZANIBONI, 2010). Em casos de perdas ósseas de grande volume, técnicas de enxertia óssea aposicional podem ser realizadas seguindo-se os princípios provenientes da técnica de regeneração óssea guiada (JENSEN et al., 1996; CONSOLARO et al., 2013; ZIGDON et al 2014).

A técnica de regeneração óssea guiada (ROG) consiste no uso de barreiras para estabilizar e isolar, mecanicamente, o material de enxertia. Essas barreiras devem permitir que somente as células relacionadas à formação óssea estejam presentes, impedindo que células indesejadas provenientes dos tecidos moles circunjacentes interfiram na revascularização e neoformação óssea (RETZEPI *et al.* 2009; PIERI *et al.* 2010; ZHOU *et al.* 2010; ZIGDON et al. 2014).

No âmbito da pesquisa sobre regeneração óssea utilizando-se técnicas de enxertia, principalmente a aposicional, faz-se mister a procura por um modelo que supra a necessidade de se criar uma barreira tecidual para a reprodução da técnica de ROG. No presente estudo, foi utilizado um modelo de regeneração óssea guiada no qual o enxerto foi inserido aposicionalmente ao leito receptor. Este modelo, está descrito na literatura científica por outros autores no mesmo modelo animal. TAMIMI *et al.* 2006 e TORRES *et al.* 2008 utilizaram um cilindro de titânio aberto na porção superior e fixado somente através de canaletas esculpidas na cortical dos ossos parietais de coelhos. Entretanto este modelo de cilindro, por ser aberto, não apresenta qualquer barreira de prevenção da

invaginação dos tecidos moles adjacentes, o que descaracteriza a técnica de ROG.

PIERI *et al.* 2010, utilizaram um modelo para ROG aposicional no qual foi confeccionado hemi-esferas de titânio com 8mm de diâmetro por 4mm de altura, fixadas ao osso parietal através de canaletas esculpidas na cortical óssea e dois parafusos em sua base. No mesmo ano ZHOU *et al.* 2010 desenvolveram um modelo de hemi-esferas porém confeccionadas em ouro com 10mm de diâmetro por 5mm de altura e fixados somente por parafusos em sua base, modelo esse também adaptado por ZIGDON *et al.* 2014. O modelo de cilindro desenvolvido por SLOTTE *et al.* 2003 utilizou um cilindro de titânio com 6mm de diâmetro por 4,5mm de altura fixado ao osso parietal de coelhos através de canaletas esculpidas na cortical óssea e dois parafusos em sua base e fechado por tampas obliterativas.

Para o alcance dos objetivos propostos por este estudo era necessário um modelo de cilindro o qual possibilitasse a criação de uma barreira mecânica frente à interferência dos tecidos suprajacentes, além de permitir a padronização do volume enxertado e assim possibilitar, no momento da reabertura, a mensuração da quantidade do volume enxertado e do contato entre o Tecido Mineralizado Vital (TMV) e a parede de titânio. Desta maneira, o cilindro utilizado por PELEGRINE *et al.* 2011 foi o que mais se adequou ao estudo.

A vascularização e nutrição do material de enxertia no interior do cilindro é possibilitada por meio da abertura existente no fundo do cilindro e pelas perfurações da cortical óssea externa, que expôs a camada medular corroborando com a metodologia utilizada por PIERI *et al.* 2010; ZHOU *et al.* 2010; PELEGRINE *et al.* 2010 e ZIGDON *et al.* 2014.

A escolha do coelho da raça Nova Zelândia como modelo animal deste estudo seguiu os padrões descritos por PIERI *et al.* 2010 em que necessitou-se de um hospedeiro com características metabólicas,

morfológicas e fisiológicas semelhantes ao do organismo humano além da presença de um sítio cirúrgico em calvária de proporções suficientes para a realização do modelo de estudo proposto.

O material de enxertia xenógeno Bio-Oss® é um substituto ósseo de origem bovina descalcificado e desproteinado. Ele é constituído principalmente por hidroxiapatita com características física, química e mecânica semelhantes ao do osso humano. Seu alto nível de porosidade (75-80% do volume total) serve para aumentar significativamente a área de superfície, a qual apresenta macro e nano rugosidades de forma semelhante ao do osso humano (SOLLAZZO *et al.*, 2010). Este aumento da área de superfície fornece um substrato para o aumento da angiogênese e assim representar um arcabouço para a formação óssea. BERGLUNDH & LINDHE 1997; PIATELLI *et al.*, 1999; SOLLAZZO *et al.*, 2010 e PELEGRINE *et al* 2014 relataram que além do Bio-Oss® promover osteogênese ele apresenta uma taxa de reabsorção muito baixa. Em algumas situações clínicas este biomaterial é utilizado como substituto para enxertia óssea autógena, devido à sua atuação nos estágios primários de diferenciação das células-tronco mesenquimais, contribuindo para a formação óssea. Desta maneira, este estudo optou pelo uso de Bio-oss® como um arcabouço celular, funcionando como um carreador.

Neste estudo, a medula óssea foi coletada de ambos os grupos (Controle e Experimental), a fim de padronizar o estresse sofrido na coleta por todos os animais, porém somente a medula dos animais do Grupo Experimental foi utilizada, sendo todo o material coletado dos animais do Grupo Controle descartado. CLARKE *et al.* 2007 em um estudo em coelhos Nova Zelândia, realizaram a aspiração da medula óssea das tíbias dos animais, porém para isso realizaram exposição da epífise tibial que teve sua cortical externa perfurada com auxílio de broca cirúrgica para exposição da medula óssea e posterior aspiração. Em outro estudo EÇA *et*

al. 2009 realizaram punções da medula óssea de coelhos utilizando a epífise femural ou a região anterior da crista ilíaca dos animais, porém também necessitando expor a cortical óssea através de intervenção cirúrgica. Neste estudo a tíbia foi escolhida como osso doador devido à dificuldade técnica presenciada na tentativa de se coletar mais do que 1ml de medula óssea da crista ilíaca ou da epífise femural. Além disso, neste estudo, foi verificado a incongruência da abertura de outro campo cirúrgico para a obtenção da medula óssea, já que a mesma foi obtida por simples punção aspirativa.

O método de obtenção das células mononucleares da medula óssea obtida por gradiente de densidade através de Ficoll-Histopaque (1077 density) utilizado no presente estudo foi semelhante ao de EÇA *et al.* 2009, porém estes autores realizaram somente uma centrifugação por 30 minutos em temperatura ambiente. O protocolo de dupla centrifugação utilizado neste estudo foi igual ao de PELEGRINE *et al.* 2014. Em estudos em humanos, o método de utilização do Ficoll não apresentou diferença estatística quando comparado ao método de concentração por sistema fechado (BMAC®) utilizado por SAUERBIER *et al.* 2010 e DUTTENHOEFER *et al.* 2014, que, segundo os autores, parece representar uma metodologia de terapia celular clinicamente plausível. No presente estudo, a utilização da tecnologia BMAC® foi descartada já que a mesma demanda coleta de ao menos 30 ml de medula óssea o que, evidentemente, é impossível em animais de pequeno porte.

O sacrifício dos animais ocorreu na oitava semana pois o metabolismo do coelho é aproximadamente três vezes mais rápido do que o humano (ROBERTS *et al.* 1987). Isto justifica o período de tempo escolhido por este estudo, visto que em procedimentos de enxertia óssea xenógena em humanos o tempo de espera comumente utilizado é de seis meses (24 semanas) (daCOSTA *et al.*, 2011). No entanto, mesmo após este tempo de cicatrização em humanos ainda são encontradas partículas

remanescentes de Bio-Oss® (SAUERBIER *et al.* 2010; DUTTENHOEFER *et al.* 2014), o que justifica a presença de partículas remanescentes (TMNV) após o período de oito semanas neste estudo em coelhos.

A mensuração de volume apresentou ganho tecidual similar em ambos os grupos, com grande estabilidade do volume enxertado após o tempo de ossificação de oito semanas, corroborando SLOTTE *et al.* 2003 e PELEGRINE *et al.* 2011. No Grupo controle, $88,36 \pm 25,97\%$ do volume do cilindro permaneceu preenchido enquanto no grupo experimental, $98,96 \pm 0,00\%$ do volume continuou estável sem sofrer alteração ou perda de volume considerável no mesmo período. Por outro lado, estudos em que os cilindros de titânio foram mantidos abertos na porção superior apresentaram níveis de perda volumétrica elevados em seus grupos controle (TAMIMI *et al.* 2006 e TORRES *et al.* 2008). No presente estudo, a utilização de cilindros com tampa possibilitou bons resultados na manutenção do volume enxertado sem apresentar diferença estatística entre os grupos controle e experimental.

A escolha da técnica de coloração das lâminas histológicas normalmente recai na consagrada técnica de Hematoxilina Eosina ou ainda da técnica de coloração por Tricrômio de Mallory, porém neste estudo foi substituída pela técnica de *Stevenel's Blue*, corroborando com PELEGRINE *et al.* 2014, devido ao fato da melhor competência desta coloração em realçar as diferenças de cor entre os tecidos mineralizados vitais dos não vitais, o que facilita a análise histomorfométrica.

Os Tecidos Mineralizado Não Vital (TMNV), Mineralizado Vital (TMV) e Não Mineralizado (TNM), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e experimental. Porém a quantidade total de Tecido Mineralizado Vital (TMV) no Grupo Controle foi de $18,96 \pm 9,00\%$ e no Grupo Experimental de $28,02 \pm 8,76\%$, o que, a despeito da ausência de significância estatística, sugere ganho na quantidade de tecido

ósseo vital após a associação do biomaterial osseocondutor com a Fração de Células Mononucleares da Medula Óssea (FMMO), dados estes que corroborados por PELEGRINE *et al.* 2014, que em um modelo experimental com reconstruções ósseas interposicionais na calvária de coelhos utilizando a mesma metodologia de concentração celular e biomaterial, observaram aumento significativo na quantidade de TMV. Soma-se a isso o fato de grande quantidade do TMV no grupo experimental estar situada nas adjacências da superfície do titânio, o que culminou com a obtenção de um maior nível de Contato entre Tecido Mineralizado Vital e Titânio (CTMVT), considerada estatisticamente significante ($p < 0,05$). O CTMVT ou, em outras palavras, o nível de osseointegração é de suma importância para o sucesso de reabilitações implanto suportadas e tecnologias que possam maximizar seus níveis representam um campo de ampla repercussão científica.

Portanto, pode-se definir a concentração da fração de células mononucleares da medula óssea como uma técnica que repercute em maior relação de contato entre o tecido mineralizado vital com a superfície do titânio. Porém mais estudos relacionados ao tema, incluindo-se prospectivos em humanos, devem ser realizados para o avanço neste campo do conhecimento.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

A reconstrução óssea aposicional com enxerto xenógeno associado à fração de células mononucleares da medula óssea não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle, exceto na variável Contato Tecido Mineralizado Vital - Titânio (CTMVT).

REFERÊNCIAS

8. Referências

1. ANTUNES AA, OLIVEIRA NETO P, DE SANTIS E, CANEVA M, BOTTICELLI D, SALATA LA. Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(2):135-42.
2. BERGLUNDH T, LINDHE J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res.* 1997;8(2):117-24.
3. CHIAPASCO M, CASENTINI P, ZANIBONI M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009; 24(SUPPL): 237-59.
4. CLARKE SA, HOSKINS NL, JORDAN GR, MARSH DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone.* 2007;40(4):939-47.
5. CLUNE JE, MULLIKEN JB, GLOWACKI J, ROGERS GF, ARANY PR, KULUNGOWSKI AM, GEENE AK. Inlay Cranioplasty: An Experimental Comparison of Particulate Graft versus Bone Dust. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126:1311-19.
6. CONNOLY J, GUSE R, LIPPIELLO L, DEHNE R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am* 1989; 71: 684-91.
7. CONSOLARO A, FRANKLIN A, MIRANDA D, CONSOLARO R, BIANCO R. Onde devemos analisar o reparo ósseo após a colocação de enxertos particulados em cavidades ósseas cirúrgicas. Maringá. p. 30-42. *Dental Press Implantology.* 2013;7(1);30-42.

8. daCOSTA CE, PELEGRINE AA, FAGUNDES DJ, SIMOES MJ, TAHA MO. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks impregnated with bone marrow aspirate: a clinical, tomographic, and histomorphometric study. *General Dentistry* 2011; 59(5): 200-5.
9. deOliveira e Silva M, PELEGRINE AA, SILVA AAP, JÚNIOR LRM, OLIVEIRA RM, FRANÇA SG, ALOISE AC, FERREIRA LM. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstruction: A tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *International Journal of Biomaterials*. 2012; 2012:170520.
10. DUPOIRIEUX L, POURQUIER D, PICOT MC, NEVES M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001;30;58–62.
11. DUTTENHOEFER F, HIEBER SF, STRICKER A, SCHMELZEISEN R, GUTWALD R, SAUERBIER S. Follow-up of implant survival comparing ficoll and bone marrow aspirate concentrate methods for hard tissue regeneration with mesenchymal stem cells in humans. *Biores Open Access*. 2014;1;3(2):75-6.
12. EÇA LP, RAMALHO RB, OLIVEIRA IS, GOMES PO, PONTES P, FERREIRA AT, MAZZETTI MP. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cir Bras*. 2009;24(5):400-4.
13. GUPTA D, KHANNA S, TULI SM. Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. An experimental study. *Int Orthop* 1982;(6):79-85.

14. HAMANISHI C, YOSHI T, TOTANI Y, TANAKA S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(303):250-5.
15. HASEGAWA N, KAWAGUCHI H, HIRACHI A, TAKEDA K, MIZUNO N, NISHIMURA M, KOIKE, C, TSUJI K, IBA H, KATO Y, KURIHARA H. Behavior of transplanted bone marrow derived mesenchymal stem Cells in Periodontal Defects. *J Periodontol* 2006;(77):1003-7.
16. JENSEN SS, AABOE M, PINHOLT EM, HJORTING-HANSEN E, MELSEN F, RUYTER IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11(1):55-66.
17. JOHNSTONE B, HERING TM, CAPLAN AI, GLDBERG VM, YOO JU. In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells. *Exp Cell Res* 1998;(238):265-72.
18. KAWAGUCHI H, HIRACHI A, HASEGAWA N, IWATA T, HAMAGUCHI H, SHIBA H, TAKATA T et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontal*. 2004;(75): 1281-87.
19. KIM SH, KIM DY, KIM KH, KU Y, RHYU IC, LEE YM. The efficacy of a double-layer collagen membrane technique for overlaying block grafts in a rabbit calvarium model. *Cil Oral Implants Res*. 2009; 20(10):1124-32.
20. KIM SH, KIM KH, SEO BM, KOO KT, KIM TI, SEOL YJ, KU Y, RHYU IC, CHUNG CP, LEE YM. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: a pilot study. *J Periodontal* 2009;(80):1815-23.

21. Kim SH, Kim DY, Kim KH, Ku Y, Rhyu IC, Lee YM. The efficacy of a double-layer collagen membrane technique for overlaying block grafts in a rabbit calvarium model. *Clin Oral Implants Res.* 2009 Oct;20(10):1124-32.
22. KOTOBUKI N, HIROSE M, MACHIDA H, KATOU Y, MURAKI K, TAKAKURA Y, OHGUSHI H. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng.* 2005;11(5-6):663-73.
23. MARKEL DC, GUTHRIE ST, WU B, SONG Z, WOOLEY PH. Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. *J Inflamm Res.* 2012;5:13-8.
24. MOORE WR, GRAVES SE, BAIN GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg.* 2001;71(6):354-61.
25. MUSCHLER GF, BOEHM C, EASLEY K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. *J Bone Joint Surg Am* 1997;(79):1699-1709.
26. OHGUSHI H, GOLDBERG, CAPLAN AL. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;(60):334-9.
27. PALLESEN L, SCHOU S, AABOE M, HJORTING-HANSEN E, NATTESTAD A, MELSEN F. Influence of particle size of autogenous bone grafts on the early stages of bone regeneration: a histologic and stereologic study in rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(4):498-506.
28. PELEGRINE AA, ALOISE AC, ZIMMERMANN A, DE MELLO E OLIVEIRA R, FERREIRA LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria.

- Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(5):567-72.
29. PELEGRINE AA, COSTA CE, CORREA MEP, MARQUES Jr JFC. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Impl Res* 2010;(21):535-42.
30. PELEGRINE AA, COSTA CE, SENDYK WR, GROMATZKY A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank.* 2011;12(3):171-84.
31. PETERBAUER-SCHERB A, VAN GRIENSVEN M, MEINL A, GABRIEL C, REDL H, WOLBANK S. Isolation of pig bone marrow mesenchymal stem cells suitable for one-step procedures in chondrogenic regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(6):485-90.
32. PIATTELLI M, FAVERO GA, SCARANO A, ORSINI G, PIATTELLI A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1999;14(6):835-40.
33. PIERI F, LUCARELLI E, CORINALDESI G, ALDINI NN, FINI M, PARRILLI A, DOZZA B, DONATI D, MARCHETTI C. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials.* 2010;31(13):3527-35.
34. PLENK Jr H, HOLLMANN K, WILFERT KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of kiel bone containing fresh autologous bone marrow. *J Bone Joint Surg Br* 1972;(54):735-43.

35. RETZEPI M, DONOS N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(6):567-76.
36. ROKN AR, KHODADOOSTAN MA, REZA RASOULI GHAHROUDI AA, MOTAHHARY P, KHARRAZI FARD MJ, BRUYN HD, AFZALIFAR R, SOOLAR E, SOOLARI A. Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. *Open Dent J.* 2011;5:96-104. Epub 2011 Jul 7.
37. SAKAI S, MISHIMA H, ISHII T, AKAOGI H, YOSHIOKA T, UEMURA T, OCHIAI N. Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. *Acta Orthop.* 2008 Jun;79(3):445-8.
38. SAUERBIER S, STRICKER A, KUSCHNIERZ J, BÜHLER F, OSHIMA T, XAVIER SP, SCHMELZEISEN R, GUTWALD R. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICOLL method or the BMAC method. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Apr;16(2):215-23.
39. SLOTTE C, LUNDGREN D, BRUGOS PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003;18(6):795-806.
40. SOLLAZZO V, PALMIERI A, SCAPOLI L, MARTINELLI M, GIRARDI A, ALVIANO F, PELLATI A, PERROTTI V, CARINCI F. Bio-Oss® acts on Stem cells derived from Peripheral Blood. *Oman Med J.* 2010;25(1):26-31.
41. TAMIMI FM, TORRES J, TRESGUERRES I, CLEMENTE C, LÓPEZ-CABARCOS E, BLANCO LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae:

- comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol*. 2006;33(12):922-8.
42. TORRES J, TAMIMI FM, TRESGUERRES IF, ALKHRAISAT MH, KHRAISAT A, LOPEZ-CABARCOS E, BLANCO L. Effect of solely applied platelet-rich plasma on osseous regeneration compared to Bio-Oss: a morphometric and densitometric study on rabbit calvaria. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2008;10(2):106-12.
43. YAMADA Y, NAKAMURA S, ITO K, KOHGO T, HIBI H, NAGASAKA T, UEDA M. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6 years follow-up. *Tissue Engineering: part A* 2008;(14):1699-1707.
44. YAMADA Y, UEDA M, NAIKI T, NAGASAKA T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(5):589-97.
45. Yoshioka T, Mishima H, Akaogi H, Sakai S, Li M, Ochiai N. Concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation treatment for corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Int Orthop*. 2011 Jun;35(6):823-9.
46. ZHAO M, ZHOU J, LI X, FANG T, DAI W, YIN W, DONG J. Repair of bone defect with vascularized tissue engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery* 2011.31(2):130-7.
47. Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jan;49(1):37-41.
48. ZIGDON H, LEWINSON D, BICK T, MACHTEI EE. Vertical bone augmentation using different osteoconductive scaffolds combined with

- barrier domes in the rat calvarium. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2014.16(1):138-44.
49. ZIMMERMANN R, JAKUBIETZ R, JAKUBIETZ M, STRASSER E, SCHLEGEL A, WILTFANG J, ECKSTEIN R. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;(41): 1217-24.

ABSTRACT

Abstract

Purpose: This study investigated the combination of a bone marrow mononuclear fraction with a bone xenograft material in an appositional bone regeneration technique. **Methods:** Twelve New Zealand rabbits were randomly divided into two groups of six animals. Bone reconstruction situations were created using titanium cylinders filled with xenograft in Control group and xenograft enriched with the bone marrow mononuclear fraction in Experimental group. Two cylinders were adapted onto the calvaria of each animal. The bone marrow aspirate was obtained from the tibia of every animal. After 8 weeks, the animals were sacrificed and their parietal bone fixed in 10% formalin for analysis: (1) clinical measurement of the bone volume formed inside the cylinders and (2) histomorphometric evaluation of parameters such as vital mineralized tissue (VMT), non-vital mineralized tissue (NVMT), non-mineralized tissue (NMT) and vital mineralized tissue in contact with titanium (VMTCT). **Results:** The clinical measurements of groups 1 and 2 demonstrated a bone volume gain of $88.36 \pm 25.97\%$ and $98.96 \pm 0.00\%$, respectively. Histomorphometry demonstrated a VMT of $18.96 \pm 9.00\%$ and $28.02 \pm 8.76\%$; NVMT of $28.43 \pm 2.44\%$ and $25.57 \pm 2.33\%$; NMT of $52.61 \pm 10.80\%$ and $46.42 \pm 10.06\%$; VMTCT of $4.98 \pm 4.30\%$ and $27.29 \pm 9.58\%$, respectively. **Conclusion:** The results from this study suggest that the use of the bone marrow mononuclear fraction can improve bone healing and the level of osseointegration.

Key Words: Bone marrow, Bone regeneration, Cell Transplantation, Stromal cells..

APÊNDICE

Apêndice

QUADRO 1 Células Mononucleares da Medula de Coelhos por Gradiente de Densidade		
COELHO	RENDIMENTO (células/mL) x 10 ⁶	Viabilidade (%)
1	9,04	98,05
2	9,00	96,74
3	9,70	95,32
4	8,72	99,46
5	9,22	98,71
6	9,57	95,97
MÉDIA	9,00	94,67
Média ± Desvio Padrão		97,16± 1,91


Rendimento (células/ml) e viabilidade (%) das Células Mononucleares da Medula Óssea de coelhos obtidas por Gradiente de Densidade.

QUADRO 2 Distribuição de variáveis, coeficiente de correlação de Spearman e p-valor da avaliação dos resultados.				
Variáveis		N	Coeficiente de Correlação (r)	Significância (p-valor)
VOLUME (mm ²)	I1 ⁵ x I2 ⁶	3	0,098	0,002
TMNV ¹	I1 x I2	3	0,099	0,000
TMV ²	I1 x I2	3	0,097	0,001
TNM ³	I1x I2	3	0,097	0,001
CTMV ⁴	I1 x I2	3	0,099	0,000

(1) **TMNV** – Tecido mineralizado não vital; (2) **TMV** - Tecido mineralizado vital; (3) **TNM** - Tecido não mineralizado; (4) **CTMVT** - Contato tecido mineralizado vital com titânio; (5) **I1** - Investigador 1; (6) **I2** - Investigador 2.

ANEXOS

Anexos


 Universidade Federal de São Paulo
 Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
 Hospital São Paulo

São Paulo, 25 de novembro de 2011
CEP Nº: 1812/11

Ilmo(a) Sr(a)
 Pesquisador(a): Rafael de Mello e Oliveira
 Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica
 Pesquisadores associados: Lydia Masako Ferreira (orientadora), Antonio Carlos Aloise, André Antonio Pelegrine

**Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo**

TÍTULO DO ESTUDO: USO DE BIO-OSSE® IMPREGNADO COM CONCENTRADO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA EM ENXERTOS APOSICIONAIS NA CALVÁRIA DE COELHOS: ESTUDO CLÍNICO, TOMOGRÁFICO E HISTOMORFOMÉTRICO. :

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo crônico

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica

OBJETIVO DO ESTUDO: Estudar a associação ou não de concentrado de células tronco mesenquimais da medula óssea autóloga ao enxerto ósseo xenólogo juntamente à técnica de regeneração óssea guiada, em situações de reconstruções ósseas aposicionais em coelhos. Será avaliada a incorporação e remodelação do material de enxertia após período de duas e oito semanas de cicatrização.

RESUMO: Estudo com 20 coelhos Nova Zelândia, machos, com 10-12 meses. Anestésico: quetamina. Analgésico: midazolam. Eutanásia: sobredose anestésica. Será realizada uma divisão dos animais em 2 grupos de 10 animais cada de forma randomizada com auxílio de programa de randomização. Em cada animal serão criadas situações de reconstruções ósseas aposicionais, com auxílio de cilindros ósseos confeccionados em titânio comercialmente puro com 6 mm de diâmetro por 5 mm de altura com tampa rosqueável, que se insinua 1 mm para dentro do cilindro. Nos animais do grupo 01, os dispositivos serão preenchidos com Bio-Osse® e, nos do grupo 02 preenchidos com Bio-osse® enriquecido com concentrado de células da medula óssea. Serão realizadas análises histomorfométricas e tomográficas. Os animais serão sacrificados após duas e oito semanas em grupos de 10 animais por período de tempo. Todos os animais serão submetidos à análises tomográficas computadorizadas realizadas sob a supervisão de um radiologista responsável em horários pré determinados. Cada calvária será submergida em EDTA 10% por 8 a 12 semanas para serem descalcificadas. Posteriormente as calvárias serão seccionadas em uma porção posterior e uma anterior e embetidas em blocos de parafina. Serão obtidas de cada calvária seções de 7 micrômetros progressivamente do centro dos defeitos para exames qualitativos sob microscopia óptica.

FUNDAMENTOS FUNDACIONAIS: Perdas ósseas são relacionadas a traumas, infecções ou tumores e frequentemente tratados por meio da enxertia óssea autóloga, considerada padrão ouro. Entretanto, a remoção do osso autólogo está em fatores ligados ao trauma e complicações pós operatórias na região doadora. Com isso o desenvolvimento de biomateriais substitutos do enxerto ósseo autólogo e de novas técnicas minimamente traumáticas está aumentando.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, detalhando os procedimentos cirúrgicos e descrevendo os métodos de análise.

TCE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: FAPESP R\$ 15794,90

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 18 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 19/11/2012 e 14/11/2013

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo ANALISOU e APROVOU o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Página 1 de 2
 Rua Botucatu, 572 - 1o andar - CEP 04023-062 - São Paulo/Brasil
 CEP N. 1812/11

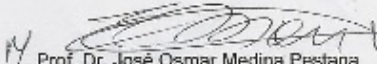
ANEXO 1: Folha de aprovação do Comitê de ética em pesquisa-UNIFESP



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

ANEXO 2: Folha de aceite para publicação e artigo publicado.

The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants

manuscript: 3462

Xenograft impregnated with bone marrow mononuclear fraction for appositional bone regeneration in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study.

Date submitted: 2013-11-27

Decision date: 2013-12-07

Decision: Accept

Decision letter:

Dear Dr

It is a pleasure to inform you that the above article is now acceptable for publication.

The authors will receive a revised manuscript in the galley proof stage. They are asked to carefully evaluate any changes that were made to ensure that the meaning of their article has not been changed. The galley proofs will be provided to the authors electronically shortly before the time that the manuscript goes to final press.

We thank you very much for submitting this valuable information and hope that you will continue to consider The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants the primary journal of publication for your most interesting and important studies.

Sincerely,

The Editorial Staff

Review:

Date of review:2013-12-07

Comments to authors:

The authors have addressed the concerns of the reviewers. Thank you for this effort. The article is now acceptable for publication.

Congratulations!

It is distinctly possible that there will be changes made in the editorial office prior to the publication of this paper. These changes will be communicated with the authors via the galley proof. It is incumbent upon

Decision and reviewer reports

Xenograft Impregnated with Bone Marrow Mononuclear Fraction for Appositional Bone Regeneration in Rabbit Calvaria: A Clinical and Histomorphometric Study

Rafael de Mello e Oliveira, DDS¹/André Antonio Pelegrine, DDS, MS, PhD²/
Antonio Carlos Aloise, DDS, MS, PhD³/Lydia Masako Ferreira, DMD, PhD⁴

Purpose: This study investigated the combination of a bone marrow mononuclear fraction with a bone xenograft material in an appositional bone regeneration technique. **Materials and Methods:** Twelve New Zealand rabbits were randomly divided into two groups of six animals each. Bone reconstruction situations were created using titanium cylinders; these were filled with xenograft in group 1 animals and xenograft enriched with bone marrow mononuclear fraction in group 2 animals. Two cylinders were adapted onto the calvaria of each animal. Bone marrow aspirate was obtained from the tibia of every animal. After 8 weeks, the animals were sacrificed and the parietal bone and cylinders were fixed in 10% formalin for analysis of clinical measurement of the bone volume formed inside the cylinders and histomorphometric evaluation of parameters such as vital mineralized tissue (VMT), nonvital mineralized tissue (NVMT), nonmineralized tissue (NMT), and vital mineralized tissue in contact with titanium (VMTCT). **Results:** Clinically, groups 1 and 2 demonstrated bone volume gains of $88.29\% \pm 25.97\%$ and $98.96\% \pm 0.00\%$, respectively. Histomorphometry for groups 1 and 2, respectively, demonstrated the following mean values: VMT, $18.96\% \pm 8.99\%$ and $28.02\% \pm 8.76\%$; NVMT, $28.43\% \pm 2.44\%$ and $25.57\% \pm 2.33\%$; NMT, $52.61\% \pm 10.80\%$ and $46.42\% \pm 10.06\%$; and VMTCT, $4.98\% \pm 4.30\%$ and $27.29\% \pm 9.58\%$. **Conclusion:** The results of this study suggest that the use of the bone marrow mononuclear fraction can improve bone healing and the level of osseointegration. *INT J ORAL MAXILLOFAC IMPLANTS* 2014;29:962–968. doi: 10.11607/jomi.3462

Key words: bone marrow, bone regeneration, cell transplantation, stromal cells

Bony defects may be a result of multiple factors, including infections and tumors.¹ A considerable number of bony defects require appositional reconstruction, which may entail difficulties with vascularization and, consequently, osseointegration. Bone grafts used in appositional reconstructions must have structural integrity as well as the potential for osteoinduction, osteoconduction, and, if possible, osteogenesis.²

Autologous bone is the gold standard for grafting because of its osteogenic, osteoinductive, and osteoconductive potential.³ However, such procedures involve morbidity such as trauma at the donor site, as well as potential postoperative complications.^{4,5} Consequently, some authors have developed approaches that combine bone marrow mesenchymal cells with autologous bone substitutes.^{6–12} Furthermore, the use of mesenchymal stem cells from the bone marrow seems to result in higher levels of osseointegration.¹³

Several bone-sparing materials are currently available to carry out routine reconstructive procedures, including allografts, xenografts, and synthetic grafts, all of which have some limitations caused by their lack of osteogenic properties. The field of tissue engineering involves the development of methods to reproduce lost tissue, including bone. Because of the growing scientific demand for new approaches and protocols to replace lost tissue with minimal trauma, many studies have been performed in this area.^{14–17}

As a result of the increasing interest in tissue engineering, studies using stem cells are proliferating in the scientific literature, since stem cells can potentially

¹Postgraduate Student, Department of Plastic Surgery, Paulista Medicine School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

²Professor and Head, Department of Implant Dentistry, São Leopoldo Mandic Institute and Research Center, Campinas, Brazil.

³Professor, Department of Plastic Surgery, Paulista Medicine School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴Professor and Head, Department of Plastic Surgery, Paulista Medicine School, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondence to: Lydia Masako Ferreira, Rua Pedro de Toledo, 781 - 11andar CEP 04039-032, Sao Paulo, Brazil. Fax: +55-11-5576 4118. Email: sandcir@hotmail.com

©2014 by Quintessence Publishing Co Inc.

962 Volume 29, Number 4, 2014

© 2014 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.



Fig 1 Cylinders filled with grafting material.

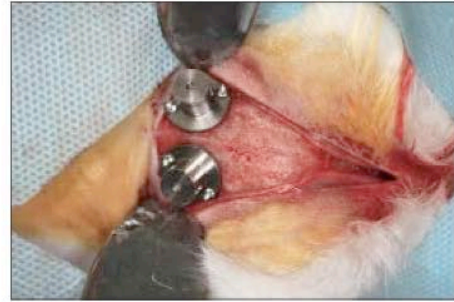


Fig 2 Titanium cylinders closed with sealing lids in place.

differentiate into a wide variety of other cells, including osteoprogenitor cells. The use of mesenchymal stem cells from bone marrow combined with mechanical frameworks for bone regeneration might reduce the need for autologous grafts and, consequently, postoperative morbidity.^{6,8,18-20}

The presence of stem cells within the bone marrow mononuclear fraction (BMMF), which have the potential to differentiate into osteoblasts, may optimize the results of bone grafting¹² as well as the bone-titanium contact area.^{21,22} Pelegrine et al⁸ demonstrated that fresh bone marrow yields better bone regeneration than a blood clot in humans. However, there is still no consensus regarding the best way to process bone marrow stem cells for reconstructive bone grafting.

Some decades ago, Plenck et al²³ reported that the use of fresh autologous bone marrow that was combined with a bone xenograft improved bone neoformation. On the other hand, bone marrow mesenchymal stem cell culture provides a greater number of osteoprogenitor cells, although the costs associated with this approach, as well as the lack of a standardized technique and the long wait between bone marrow aspiration and re-implantation of the cells, constitute hurdles that remain to be overcome.^{1,12}

The technique of concentrating the BMMF by centrifuging, when compared to fresh bone marrow, does not require a wait of several weeks after harvesting, as is the case with cell culture. It also results in a higher number of nucleated cells and fibroblast colony-forming units.^{10,24-26} Consequently, the combination of osteogenic cells with associated growth factors may make the process of concentrating the BMMF, which contains mesenchymal stem cells, a favorable micro-environment for cell proliferation and differentiation.²⁷ Pelegrine et al¹² demonstrated that, in an inlay graft in the calvaria of rabbits, the use of the BMMF combined with a xenograft biomaterial improved the outcome of reconstruction. However, the use of such an

association in appositional grafting and osseointegration has not yet been established.

This study proposed a case-control design using a concentrate of BMMF combined with a bone-sparing xenograft in an appositional bone grafting model in rabbits.

MATERIALS AND METHODS

Surgical Protocol

The study was approved by the Animal Research Ethics Committee at Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil. Twelve adult New Zealand rabbits with fully mature skeletons weighing between 3.5 and 4 kg were selected for this study. Each animal had two commercially pure titanium cylinders fitted to outline the grafting area and serve as a barrier.

Prior to surgery, the animals were kept in individual cages for an adaptation period. They received water and a processed diet ad libitum in temperature-controlled rooms between 18°C and 20°C and cycles of day and night (12 hours light/12 hours dark).

At the time of surgery, the rabbits were anesthetized with ketamine (40 mg/kg), midazolam (2 mg/kg), and fentanyl citrate (0.8 µg/kg); anesthesia was maintained with isoflurane/nitrous oxide (1:1.5%) and oxygen (2/3:1/3) via a pediatric face mask. A head trichotomy was carried out, followed by asepsis with an iodine-povidone solution. Local infiltration with 2% lidocaine + epinephrine 1:100,000 was subsequently administered, followed by a sagittal incision and a full-skin/periosteal flap to expose the parietal bone.

In all 12 rabbits, two commercially pure titanium cylinders, measuring 6 mm in diameter and 5 mm in height, were fixed with a screw-on sealing lid into their parietal bone, bilaterally to the midline with the aid of two fixing screws. All 24 cylinders were made by the same company (Microplant) and were



Fig 3 Puncture point in tibia to harvest the bone marrow.

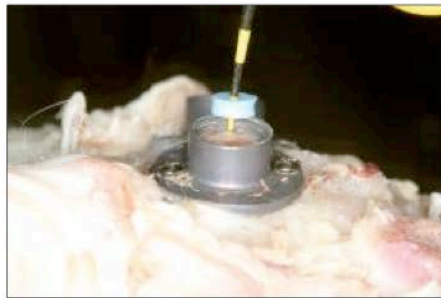


Fig 5 Millimetric measurement of the volume of bone gain. Note the substantial amount of mineralized tissue.

randomly divided into two groups with the aid of specific software (<http://randomization.com>). Control group (group 1) cylinders were filled with xenograft bone, and experimental group (group 2) cylinders were filled with xenograft bone enriched with BMMF. In cell therapy, being careful to avoid the use of control and experimental groups in the same individual is required because of the lack of consensus regarding the possibility of cell migration between experimental and control sites. After all cylinders were placed, five perforations were made in the cortical bone to encourage bleeding and graft nutrition. All cylinders were filled with the same amount of grafting material (Fig 1) and sealed completely with a screw-on lid (Fig 2). The surgical wounds were then closed.

Bone marrow aspiration was carried out immediately before surgery (Fig 3) under general anesthetic. Two milliliters of bone marrow were aspirated from each tibia using a 40×10 (1.10 \times 38-mm) needle and a 20-mL syringe previously heparinized to prevent blood clotting. To standardize the variable of stress, all animals had a bone marrow aspirate taken; in group 1, this was subsequently discarded.

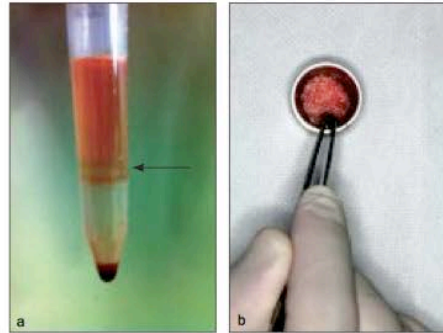


Fig 4 (a) Polypropylene tube after separation by gradient density. Note the mononuclear phase (arrow). (b) BMMF combined with the grafting material.

The BMMF was obtained as follows. The aspirate was transferred to conical falcon tubes containing heparin (1,000 units/mL) and homogenized. The bone marrow was separated using a density gradient technique by centrifuging it together with Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. Each 3.5 mL of bone marrow was diluted in a 1:1 proportion with phosphate-buffered saline (PBS) in a falcon tube containing the same amount of Ficoll-Histopaque 1077. The suspension was then centrifuged for 30 minutes at 400g and 22°C. The mononuclear cell phase was pipetted out and rinsed with PBS. A separate tube was filled with the mononuclear cell phase and topped with PBS up to a total volume of 4 mL, followed by centrifuging at 200g for 10 minutes at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of PBS. Cell density was established using 200 μ L of the final suspension diluted in 2 mL of PBS, from which 10 μ L was used in a Neubauer chamber. Trypan blue was used to eliminate dead cells. This final BMMF suspension was added to the xenograft bone substitute (Fig 4).

All animals were medicated postoperatively with benzylpenicillin (40,000 IU) and sodium dipyrone (0.25 mg/kg). They were given water and food ad libitum.

All animals were sacrificed 8 weeks after surgery, and bone volume was evaluated clinically. Subsequently, the parietal bone was removed and processed for histologic and histomorphometric evaluation.

Clinical Measurement of Volume

The screw-on lids were removed from the cylinders, and a periodontal probe was used to measure the total volume of bone gain by probing four pre-established

points in relation to the bone crest and the external border of the cylinder (coronal, caudal, medial, and lateral) (Fig 5). The measurements took into account the thickness of the cylinder lid (1 mm), which was subtracted from the total cylinder height. Therefore, the maximum height was 4 mm. Bone volume gain was calculated from the inner aspect of the cylinder using the mathematical formula $V = \pi \times R^2 \times H$, where V = volume, $\pi = 3.1416$, and H = height.

Histologic Preparation and Histomorphometric Evaluation

A portion of the parietal bone, with an approximate area of 10 mm², and the cylinder in its center were removed using an oscillating saw in all grafted sites. This sample was decalcified in 10% ethylenediaminetetraacetic acid for 8 to 12 weeks at room temperature. The 24 slides for histology were made using a microtome to cut 7- μ m sections of the entire set, including the titanium cylinder and the graft, at 2 mm from the center of the cylinder (Fig 6). The sections were stained with Mallory trichrome and Stevenel blue and assessed under a light microscope. The amount of tissue was quantified in square micrometers. All slides were analyzed in six areas (upper left, lower left, upper central, lower central, upper right, and lower right) and an average was calculated for each slide. Subsequently, an average between the values of the two slides was calculated per animal.

Digital images were obtained from each of the six areas using a charge-coupled device digital camera (Rt Color, Diagnostic Instruments) attached to a light microscope (magnification $\times 1.25$).

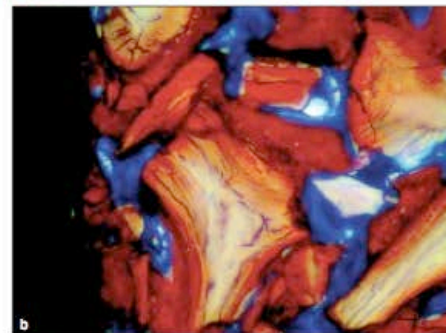
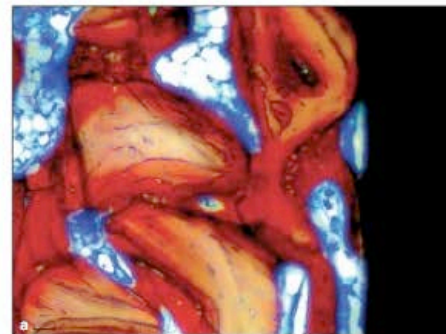
Two previously calibrated examiners assessed the specimens blindly; in case of disagreement, a case would be reviewed to reach consensus. The examiners traced all images using the program Infinity Analyse (Lumenera Corporation) and measured the following parameters: nonvital mineralized tissue (NVMT), vital mineralized tissue (VMT), nonmineralized tissue (NMT), and vital mineralized tissue in contact with titanium (VMTCT) (Fig 7). All results were obtained in squared micrometers and expressed as percentages of the total area.

Statistical Analysis

All quantitative data were analyzed with SPSS software (version 17, SSPS Inc). The Kruskal-Wallis test was used to compare the results obtained for NVMT, VMT, NMT, and VMTCT. The Wilcoxon test was used for comparisons between variables and to statistically compare the gains in bone volume. A P value $\leq .05$ was accepted as significant. The Spearman correlation coefficient was used to determine the level of agreement between examiners.



Fig 6 Histologic section of the titanium cylinder revealing Stevenel blue-stained tissue on its inner aspect.



Figs 7a and 7b Histologic sections from (a) group 1 (control) and (b) group 2 (experimental) (original magnification $\times 100$). Red = VMT; blue/white = NMT; orange/yellow = NVMT; black = titanium. Note the contact between the mineralized tissue and titanium (VMTCT).

RESULTS

The Spearman correlation coefficient showed good interexaminer agreement ($r = 0.988; P = .000$). All animals remained clinically stable during the postoperative

Table 1 Clinical Analysis of Bone Volume Gain

Group	n	Bone volume gain (%)
1 (control)	6	88.36 ± 25.97
2 (experimental)	6	98.96 ± 0.00
P*		.4047

*Wilcoxon test.

Table 2 Analysis of Histomorphometric Measurements with Statistical Comparison of Mean Values Between Groups 1 and 2

Group	n	NVMT (%)	NMT (%)	VMT (%)	VMTCT (%)
G1 (control)	6	28.43 ± 2.44	52.61 ± 10.80	18.96 ± 9.00	4.98 ± 4.30
G2 (experimental)	6	25.57 ± 2.33	46.42 ± 10.06	28.02 ± 8.76	27.29 ± 9.58
P		.1179	.6412	.3087	.0258

Table 3 No. of Cells in the BMMF ($\times 10^6$ /mL) and Cell Viability

Animal	No. of cells/mL ($\times 10^6$)	Cell viability (%)*
1	9.04	98.05
2	9.00	96.74
3	9.70	95.32
4	8.72	99.46
5	9.22	98.71
6	9.00	94.67
Mean ± SD		97.16 ± 1.91

*Tested using the trypan blue method.

period. All cylinders were stable and closed at the time of removal for histologic assessment.

With respect to the clinical results, a considerable amount of mineralized tissue was observed upon removal of the cylinder lids. Macroscopically, the control (group 1) and experimental (group 2) groups demonstrated mean bone volume gains of 88.29% ± 25.97% and 98.96% ± 0.00%, respectively. This was not a statistically significant difference (Table 1).

The histomorphometric results demonstrated percentages for group 1 and group 2 of 18.96% ± 8.99% and 28.43% ± 2.44% for VMT, 52.61% ± 10.80% and 28.02% ± 8.76% for NVMT, and 25.57% ± 2.33% and 46.42% ± 10.06% for NMT, respectively. None of these differences reached statistical significance. VMTCT values were statistically significantly different: 4.98% ± 4.30% for group 1 and 27.29% ± 9.58% for group 2 (Table 2).

The number of mononuclear cells in group 2 grafts is presented in Table 3.

DISCUSSION

In the present study, a guided bone regeneration model was used, with titanium cylinders placed on the calvaria of rabbits bilaterally to the midline. This model, first described by Slotte et al,⁷ was chosen because an appositional grafting model of greater volume was needed. The titanium cylinders created a mechanical barrier to prevent interference from adjacent tissues, and they also aided in standardizing the graft volume.^{7,8,28,29}

The xenograft material was selected as the bone substitute because its physical and chemical characteristics are similar to those of human bone and for its osteoconductive potential.³⁰ In some clinical situations, this biomaterial has been used as a substitute for autologous bone grafting, acting during the primary stages of mesenchymal stem cell differentiation and thus contributing to bone formation.³⁰⁻³²

In this study, the bone marrow was collected from both groups (control [group 1] and experimental [group 2]) to standardize the level of stress experienced by the animals; however, only the bone marrow from the experimental group (group 2) was used, whereas the material from the control group (group 1) was discarded. The bone marrow was harvested from both the right and the left tibias to obtain a standard volume of 4 mL. The tibia was chosen because of the difficulty in harvesting more than 1 mL of bone marrow from sites such as the iliac crest or the femoral epiphysis, as discussed by Eça et al.³³ Each animal had 1 mL of the sample quantified and qualified with trypan blue and a Neubauer chamber.

Clinical analysis of bone volume showed significant gains in both groups, with high stability of the volume grafted after the 8-week period of ossification. For group 1, 88.29% ± 26.24% of the cylinder volume remained filled, whereas for group 2, 98.96% ± 0.00% of the volume remained stable, with no considerable alteration or loss of volume; this corroborates the results of Tamimi et al.²⁸

The investigation of the intimate contact between newly formed bone and the titanium surface (ie, VMTCT) revealed a significant increase (27.29% ± 9.58%) in the experimental group, compared with 4.98% ± 4.30% in the control group. Because contact between newly formed bone and titanium forms the basis of osseointegration, methods that increase the level of osseointegration, as was done with the experimental group in this study, represent a promising option in situations of poor bone density.

In this study, the total VMT in group 1 was 18.96% ± 8.99%, whereas in group 2 it was 28.02% ± 8.76%; despite the lack of statistical significance, this suggests some gain of vital bone tissue when an osteoconductive

biomaterial is combined with the BMMF and corroborates the findings of Pelegrine et al,¹² who used BMMF associated with a xenograft for inlay reconstructions. This new bone formation was distributed homogeneously and was integrated with the recipient bed in both groups. In the present study, the higher level of VMT in group 2 probably increased the VMTCT.

Soltan et al³⁴ reported that, in addition to the mesenchymal stem cells, the presence of growth factors and other bone marrow cells may contribute to bone formation. The BMMF concentrate obtained via density gradient incorporated not only the stem cells, but also growth factors and other mononuclear cells. However, little information is available regarding which growth factors are present in BMMF. On the other hand, the mesenchymal stem cell culture method (not examined in this study) provides a much greater number of stem cells than BMMF. However, there is no consensus on the method to separate and culture cells from bone marrow.^{35,36} In addition, cell culture faces complicating factors, such as lack of specific markers, high operational costs, time needed between harvesting and reimplantation, risk of contamination, and the need for a high number of cells.^{12,37,38} Therefore, in this study only the BMMF concentration was used and compared to the control because it is regarded as a plausible technique for routine use.

The animals were sacrificed in the eighth week, as the metabolism of rabbits is approximately three times that of humans.³⁹ This justifies the period of time chosen for this study, since in bone xenograft procedures in humans, the waiting time used is typically 6 months.⁶ However, even after this healing period in humans, some remaining xenograft particles have been found,⁴⁰ which justifies the presence of remaining particles (NVMT) after 8 weeks in this rabbit-based study.

It is important to highlight that, because this is a preclinical study, its inherent limitations must be taken into account. The significant difference in osseointegration obtained using BMMF may be of clinical relevance; however, prospective clinical studies are necessary to confirm it.

CONCLUSION

An appositional grafting technique that uses xenograft biomaterial combined with bone marrow mononuclear fraction may improve bone healing and the level of osseointegration.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Geistlich Pharma for donating the xenograft biomaterials and Microplant for donating the titanium cylinders used in this study. The authors have no relationship with the companies cited in this article.

REFERENCES

1. de Oliveira E, Silva M, Pelegrine AA, et al. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: A tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Biomater* 2012;2012:170520.
2. Markel DC, Guthrie ST, Wu B, Song Z, Wooley PH. Characterization of the inflammatory response to four commercial bone graft substitutes using a murine biocompatibility model. *J Inflamm Res* 2012;5:13–18.
3. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 2001;41:1217–1224.
4. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001 Jun;71:354–361.
5. Chiapasco M, Casentini P, Zaniboni M. Bone augmentation procedures in implant dentistry. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2009;24(suppl):237–259.
6. da Costa CE, Pelegrine AA, Fagundes DJ, Simoes Mde J, Taha MO. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks impregnated with bone marrow aspirate: A clinical, tomographic, and histomorphometric study. *Gen Dent* 2011;59:e200–205.
7. Slotte C, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogenic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: A rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:795–806.
8. Pelegrine AA, da Costa CE, Correa ME, Marques JF Jr. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. *Clin Oral Implants Res* 2010;21:535–542.
9. Pelegrine AA, Sorgi da Costa CE, Sendyk WR, Gromatzky A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: A clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank* 2011;12:171–184.
10. Sakai S, Mishima H, Ishii T, et al. Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. *Acta Orthop* 2008;79:445–448.
11. Yoshioka T, Mishima H, Akaogi H, Sakai S, Li M, Ochiai N. Concentrated autologous bone marrow aspirate transplantation treatment for corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Int Orthop* 2011;35:823–829.
12. Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, Oliveira RD, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: A histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res* 2014;25(5):567–572.
13. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15:589–597.
14. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60:334–339.
15. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238:265–272.
16. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: Preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004;28:33–39.

17. Sato K, Haruyama N, Shimizu Y, Hara J, Kawamura H. Osteogenesis by gradually expanding the interface between bone surface and periosteum enhanced by bone marrow stem cell administration in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:32–40.
18. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, et al. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 2004;75:1281–1287.
19. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 2006;77:1003–1007.
20. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: A comparative histomorphometric study in minipigs. *J Oral Maxillofac Surg* 2009;67:265–272.
21. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, et al. Dose-dependent effect of adipose-derived adult stem cells on vertical bone regeneration in rabbit calvarium. *Biomaterials* 2010;31:3527–3535.
22. Antunes AA, Oliveira Neto P, de Santis E, Caneva M, Botticelli D, Salata LA. Comparisons between Bio-Oss and Straumann Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:135–142.
23. Plenck H Jr, Hollmann K, Wilfert KH. Experimental bridging of osseous defects in rats by the implantation of Kiel bone containing fresh autologous bone marrow. *J Bone Joint Surg Br* 1972;54:735–743.
24. Sauerbier S, Stricker A, Kuschnierz J, et al. In vivo comparison of hard tissue regeneration with human mesenchymal stem cells processed with either the FICCOL method or the BMAC method. *Tissue Eng Part C Methods* 2009;15:1–9.
25. Yamada Y, Nakamura S, Ito K, et al. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: Clinical application report from a 2-6 years follow-up. *Tissue Eng Part A* 2008;14:1699–1707.
26. Kim SH, Kim KH, Seo BM, et al. Alveolar bone regeneration by transplantation of periodontal ligament stem cells and bone marrow stem cells in a canine peri-implant defect model: A pilot study. *J Periodontol* 2009;80:1815–1823.
27. Hamanishi C, Yoshi T, Totani Y, Tanaka S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. *Clin Orthop Relat Res* 1994;303:250–255.
28. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *J Clin Periodontol* 2006;33:922–928.
29. Torres J, Tamimi F, Martínez PP, et al. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: A randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2009;36:677–687.
30. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: A histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:835–840.
31. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 1997;8:117–124.
32. Sollazzo V, Palmieri A, Scapoli L, et al. Bio-Oss acts on stem cells derived from peripheral blood. *Oman Med J* 2010;25:26–31.
33. Eça LP, Ramalho RB, Oliveira IS, et al. Comparative study of technique to obtain stem cells from bone marrow collection between the iliac crest and the femoral epiphysis in rabbits. *Acta Cir Bras* 2009;24:400–404.
34. Soltan M, Smiler D, Choi JH. Bone marrow: Orchestrated cells, cytokines, and growth factors for bone regeneration. *Implant Dent* 2009;18:132–141.
35. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000;18:959–963.
36. Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Marsh DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone* 2007;40:939–947.
37. Kotobuki N, Hirose M, Machida H, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng* 2005;11:663–673.
38. Lucarelli E, Donati D, Cenacchi A, Fornasari PM. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. *Transfus Apher Sci* 2004;30:169–174.
39. Roberts WE, Turley PK, Breznick N, Fielder PJ. Implants: Bone physiology and metabolism. *CDA J* 1987;15:54–61.
40. Wang GS, Li SW, Cai L. Quantitative analysis on guided bone regeneration-membrane technique with Bio-Oss in dental implantation. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2012;21:317–320.

ERRATUM

It has been brought to the publisher's attention that in the March/April issue of JOMI, in the article "Multifactorial Evaluation of Implant Failure: A 19-year Retrospective Study" (*Int J Oral Maxillofac Implants* 2014;29:303–310), the first sentence of the "Late Failures" section on page 305 should read: "Forty-two of the 64 (65.6%) late implant failures occurred in male patients." This correction has been made to the electronic version of the article, which can be found at www.quintpub.com/journals.

968 Volume 29, Number 4, 2014

© 2014 BY QUINTESSENCE PUBLISHING CO, INC. PRINTING OF THIS DOCUMENT IS RESTRICTED TO PERSONAL USE ONLY. NO PART MAY BE REPRODUCED OR TRANSMITTED IN ANY FORM WITHOUT WRITTEN PERMISSION FROM THE PUBLISHER.

FONTES CONSULTADAS

1. Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica - SBCP
http://www.sbcpmg.org.br/20130130_Pesquisa_ISAPS.pdf
2. Bennett MI, Hughes N, Johnson MI. Methodological quality in randomised controlled trials of transcutaneous electric nerve stimulation for pain: low fidelity may explain negative findings. *Pain*. 2011;152(6):1226-32.
3. Aulete, Caldas. Aulete Digital – Dicionário contemporâneo da língua portuguesa: Dicionário Caldas Aulete. Lexikon Editora Digital, 2008. Disponível em: <<http://aulete.uol.com.br/>> [consultado em 01-10-2013].
4. Frahling, Gereon. Linguee - Dicionário online, 2011. Disponível em: <<http://www.linguee.com.br/portugues-ingles>>. [consultado em 01-10-2013].
5. Houaiss, A., Villar, M. de S. In: Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa. (versão 3.0). Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2009. 1 CD-ROM.[consultado em 01-10-2013].
6. Priberam, In: Dicionário Priberam da Língua Portuguesa online, 2012. Disponível em: <<http://www.priberam.pt/dlpo/dlpo.aspx?pal=casa>> [consultado em 01-10-2013].
7. Weiszflog, W. Michaelis. Moderno dicionário de português online. Editora Melhoramentos, 2009. Disponível em <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/ingles/index.php>>.[consultado em 01-10-2013].

NORMAS ADOTADAS

- 1- Terminologia Anatômica. Terminologia Anatômica Internacional. São Paulo. Manole; 2001.248p.
- 2- Ministério da Saúde – Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília-DF; 1996.24p.
- 3- Consulta ao DeCs – Descritores em Ciência da Saúde. <http://decs.bvs.br> – terminologia em saúde.
- 4- Consulta ao Mesh – Medical Subject Headings. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> - termos/ descritores.
- 5- Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. Guia Prático. São Paulo. Livraria Médica Paulista; 2008. 84p.