

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL**

**MARCELO DE OLIVEIRA E SILVA**

**MEDULA ÓSSEA ASSOCIADA AO ENXERTO ÓSSEO XENÓGENO NA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM CALVÁRIA DE COELHOS**

**São Paulo**

**2014**

Silva, Marcelo Oliveira e

**Medula Óssea Associada ao Enxerto Xenógeno na  
Regeneração Óssea Guiada em Calvária de Coelhos** / Marcelo  
de Oliveira e Silva. – São Paulo, 2014.  
70 f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional. São Paulo,  
2014.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Lydia Masako Ferreira

Título em Inglês: Bone Marrow Associated with Bone  
Xenograft in Bone Guided Regeneration in Rabbits Calvária

1. Medula óssea. 2. Coelhos. 3. Enxerto Ósseo

**MARCELO DE OLIVEIRA E SILVA**

**MEDULA ÓSSEA ASSOCIADA AO ENXERTO ÓSSEO  
XENÓGENO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM  
CALVÁRIA DE COELHOS**

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

Coordenador: Prof. Dr. Miguel Sabino Neto  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dra. Lydia Masako Ferreira  
Co-orientadores: Prof. André Antonio  
Pelegrine e Prof. Antonio Carlos Aloise

**São Paulo  
2014**

Nome: SILVA, Marcelo Oliveira e  
Título: Medula Óssea Associada ao Enxerto Xenógeno na Regeneração Óssea  
Guiada em Calvária de Coelhos

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_  
Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_  
Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição \_\_\_\_\_  
Julgamento \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, por terem me transmitido seus valores éticos e morais.

Ao meu pai e amigo, João Henrique de Oliveira e Silva, exemplo de cidadão e médico, meu inspirador na escolha pela medicina.

Ao meu irmão e mestre, Julio de Oliveira e Silva, pela minha formação como cirurgião.

Ao Professor Ivo Pitanguy, pelos ensinamentos na cirurgia plástica.

À Professora e amiga, Lydia Masako Ferreira, pelo incentivo ao ingresso na vida acadêmica, apresentando sua importância e seus valores.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram e, de forma generosa, entenderam os meus momentos de ausência.

À minha amiga Izabel Offrede, por estar ao meu lado participando da minha caminhada profissional.

## AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. **Lydia Masako Ferreira**, Professora Titular do Departamento de Cirurgia Plástica e Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional (UNIFESP-EPM) e Orientadora desta tese, pelos ensinamentos e dedicação à minha formação como pesquisador.

Ao Professor **André Antonio Pelegrine**, Co-orientador, que esteve sempre presente contribuindo com seus ensinamentos para esta tese e que, com muita gentileza, preparou-me para a vida acadêmica.

Ao Professor **Antonio Carlos Aloise**, Co-orientador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) que, de forma amiga e absolutamente desprendida, sempre dedicou seu tempo e energia para a realização deste projeto.

A todos os colegas do programa de pós-graduação em Cirurgia Translacional e do grupo de pesquisa do Laboratório de Cultura de Células da disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP, pela amizade durante todos estes anos.

Às Secretárias, **Sandra da Silva**, **Marta Rejane** e **Silvana Aparecida de Assis**, da disciplina de Cirurgia Plástica (UNIFESP-EPM), pela assistência e atenção prestadas desde o meu ingresso no programa de pós-graduação.

*"A educação é a arma mais poderosa que temos para mudar o mundo."*

*Nelson Mandela*

## RESUMO

**Introdução:** A reconstrução óssea de áreas consideradas críticas pode ser realizada com o uso de biomateriais substitutos do tecido ósseo como, por exemplo, os materiais xenógenos, porém sabe-se que uma das limitações destes materiais é a sua incapacidade de ser osteogênico. De outra forma, frequentemente nestes procedimentos são utilizadas membranas ou barreiras teciduais, caracterizando uma regeneração óssea guiada, com o intuito de se obter resultados com maior previsibilidade. **Objetivo:** Avaliar a associação do aspirado de medula óssea a um enxerto ósseo xenógeno na técnica de regeneração óssea guiada em calvária de coelhos. **Métodos:** Dez coelhos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos com cinco animais cada. Vinte defeitos ósseos críticos bilaterais, com diâmetro de 12 milímetros, foram criados nos ossos parietais. Foram preenchidos com xenoenxerto ósseo, associado ou não à medula óssea, e sempre um dos defeitos em cada animal realizado de forma aleatória, recoberto por uma membrana de colágeno, formando assim os seguintes grupos: grupo controle com membrana (GC CM), grupo controle sem membrana (GC SM), grupo experimental com membrana (GE CM) e grupo experimental sem membrana (GE SM). Os coelhos foram eutanasiados oito semanas após a cirurgia e, em seguida, as suas calvárias foram removidas e analisadas por tomografia computadorizada. Na sequência, os ossos parietais foram removidos e as áreas de enxertia foram selecionadas e analisadas histologicamente por histomorfometria. **Resultados:** A tomografia mostrou uma menor área de defeito ósseo remanescente ( $p < 0,05$ ) no grupo experimental coberto com membrana de colágeno ( $56,46 \pm 9,05 \text{ mm}^2$ ), quando comparado com o grupo controle, com e sem membrana ( $68,01 \pm 2,86 \text{ mm}^2$  e  $72,64 \pm 5,59 \text{ mm}^2$ , respectivamente). A histomorfometria não mostrou diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ) em relação à área de tecido mineralizado não vital. Para a área de tecido mineralizado vital, o grupo experimental coberto com membrana obteve uma área maior ( $21,16 \pm 3,76\%$ ), quando comparado com o grupo controle, com e sem membrana ( $12,78 \pm 5,9\%$  e  $6,31 \pm 1,29\%$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ). Para a área de tecido não mineralizado, o grupo experimental coberto com membrana obteve uma área menor ( $20,29 \pm 4,17\%$ ), quando comparado com o grupo controle, com e sem membrana ( $67,95 \pm 7,03\%$  e  $81,41 \pm 3,25\%$ , respectivamente) ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** A associação do aspirado de medula óssea a um enxerto xenógeno na regeneração óssea guiada em calvária de coelhos, aumentou significativamente a quantidade de tecido mineralizado vital, bem como diminuiu significativamente a quantidade de tecido não mineralizado.

Palavras-chave: Medula óssea. Regeneração óssea. Transplante de células. Células estromais.



## ABSTRACT

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the bone healing after the usage of a scaffold enriched with bone marrow. **Methods:** Ten rabbits were randomly divided into 2 groups of 5 animals. Bilateral 12 mm diameter defects were created in the parietal bones. In control group Bio-Oss® were inserted in both defects and, in experimental group, xenograft enriched with autologous bone marrow were inserted in both defects. In these two groups, one of the calvarial defects was randomly covered with collagen membrane. The rabbits were sacrificed 8 weeks after surgery, their heads were removed and analysed by CT. Then, their parietal bones were harvested and analysed by histomorphometrics. **Results:** The CT showed a lower remaining defect area ( $p < 0.05$ ) in the experimental group covered with collagen membrane ( $56.46 + 9.05 \text{ mm}^2$ ) when compared with control group, with and without xenograft ( $68.01 + 2.86 \text{ mm}^2$  and  $72.64 + 5.59 \text{ mm}^2$ , respectively). The histomorphometrics showed no difference between groups ( $p > 0.05$ ) regarding the non-vital mineralized tissue area. For vital mineralized tissue area, the experimental group covered with membrane obtained a higher percentage area ( $21.16 + 3.76\%$ ) when compared with control group, with and without membrane ( $12.78 + 5.9 \%$  and  $6.31 + 1.29 \%$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). For non-mineralized tissue area, the experimental group covered with membrane obtained a lower percentage area ( $20.29 + 4.17\%$ ) when compared with control group, with and without membrane ( $67.95 + 7.03 \%$  and  $81.41 + 3.25 \%$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). **Conclusion:** The combination of aspirate a xenogeneic bone graft for guided bone regeneration in rabbit calvaria, bone marrow significantly increased the amount of living mineralized tissue, as well as significantly reduced the amount of non-mineralized tissue.

Key Words: Bone marrow. Bone regeneration. Cell transplantation. Stromal cells

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentação comercial do enxerto ósseo particulado .....	25
Figura 2. Apresentação comercial da membrana de colágeno .....	26
Figura 3. Introdução da agulha na parte superior da tibia .....	27
Figura 4. Seringa plástica heparinizada conectada a agulha para aspiração da medula óssea.....	27
Figura 5. Incisão para exposição dos ossos parietais.....	29
Figura 6. Conferência da extensão da incisão .....	29
Figura 7. Descolamento da pele e do periósteo para exposição dos ossos parietais.....	30
Figura 8. Posicionamento da broca trefina para realização da craniectomia.....	30
Figura 9. (a) craniotomia (b) craniectomia.....	31
Figura 10. Preenchimento dos defeitos ósseos. Um lado com enxerto xenógeno e o outro com enxerto xenógeno e cobertura da membrana de colágeno.....	31
Figura 11. Posicionamento da caixa de acrílico no aparelho de tomografia.....	32
Figura 12. Marcação dos parâmetros no software Xoran (USA) para determinação da área remanescentes dos defeitos ósseos após aquisição das imagens pelo tomógrafo.....	33
Figura 13. Fragmento ósseo do osso parietal removido da calvária após o exame Tomográfico.....	34
Figura 14. Aspecto da fotomicrografia de uma lâmina histológica sendo avaliada pelo <i>software</i> Infinity Analyse.....	35

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores das médias das áreas de defeito ósseo remanescente expressa em mm<sup>2</sup> verificada no exame tomográfico das calvárias dos coelhos. Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<0,05) foram assinalados por (\*). .....36
- Tabela 2. Valores das médias expressas em porcentagem de área de tecido mineralizado vital (TMV) nos GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana; GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<0,05) foram assinalados por (\*). .....36
- Tabela 3. Valores das medias expressas em porcentagem de área de tecido não mineralizado (TNM) nos GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com Membrana Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<0,05) foram assinalados por (\*). .....37
- Tabela 4. Valores das médias expressas em porcentagem de tecido mineralizado não vital (TMNV) nos GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana; GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com Membrana Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<0,05) foram assinalados por (\*). .....37
- Tabela 5. Valores das médias expressas em porcentagem do GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana; TMNV: tecido mineralizado não vital; TMV: tecido mineralizado vital; TMN tecido não mineralizado Teste ANOVA *one way* com correção pelo teste de Tukey (\*). .....38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>ad libitum</i>	à vontade
CTMVT	contato tecido mineralizado vital titânio
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	força centrífuga
h	altura
IM	intra muscular
Kg	kilograma
Mg	miligrama
Microg	micrograma
ml	mililitros
mm	milímetros
TMNV	tecido mineralizado não vital
TMV	tecido mineralizado vital
TNM	tecido não mineralizado

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2. OBJETIVO</b>	14
<b>3. LITERATURA</b>	15
<b>4. MÉTODOS</b>	25
4.1 DESENHO DE ESTUDO	25
4.2 AMOSTRA	25
4.3 MATERIAIS	25
4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4.5 ETAPAS EXPERIMENTAIS	26
4.5.1 Coleta do Aspirado de Medula Óssea	26
4.5.2 Protocolo Cirúrgico	28
4.6 SERVIÇOS AUXILIARES	32
4.6.1 Análise Tomográfica	32
4.6.2 Análise Histológica	33
4.6.3 Análise Histomorfométrica	34
4.6.4 Análise Estatística	35
<b>5. RESULTADOS</b>	36
<b>6. DISCUSSÃO</b>	39
<b>7. CONCLUSÃO</b>	45
<b>REFERÊNCIAS</b>	46
<b>FONTES CONSULTADAS</b>	50
<b>NORMAS ADOTADAS</b>	51
<b>APÊNDICES</b>	52



## 1. INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos decorrentes de fatores extrínsecos ou intrínsecos, como trauma e tumores são comuns e, ainda hoje, o seu tratamento representa um desafio. Estes tratamentos podem ser instituídos por diferentes métodos, sendo a enxertia óssea autóloga o mais utilizado, devido a seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor (URIST, 1965; PROLO & RODRIGO, 1985; JENSEN *et al.*, 2011).

O procedimento para a remoção do enxerto autólogo repercute na necessidade de uma intervenção com duas ou mais regiões cirúrgicas, elevando o trauma cirúrgico, o custo e a morbidade pós operatória (PELEGRINE *et al.*, 2010). Com isso, substitutos homólogos, sintéticos e xenógenos vêm sendo estudados e disponibilizados para reposição óssea (SZABÓ *et al.*, 2005; ROTHAMEL *et al.*, 2009; PELEG *et al.*, 2010). Apesar da aceitação desta técnica, devido a simplificação da sua utilização, estes biomateriais ainda apresentam limitações mecânicas e biológicas, principalmente quanto às suas propriedades osteogênicas e baixo potencial osteoindutor.

A reconstrução óssea minimamente traumática está vinculada ao uso de biomateriais substitutos ósseos e visa à abertura de um horizonte cirúrgico. Porém, frequentemente, faz-se necessária a associação de membranas ou barreiras teciduais. As membranas, reabsorvíveis ou não, oferecem uma barreira mecânica com o intuito de impedir a migração de células dos tecidos moles ao redor da região enxertada, favorecendo a qualidade do osso neoformado (PARRISH *et al.*, 2009). A utilização de um enxerto ósseo associado ao uso de uma membrana caracteriza a técnica de regeneração óssea guiada (ROG).

Juntamente à técnica de regeneração tecidual, os estudos envolvendo as células tronco mesenquimais adultas demonstram um grande potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica (HASEGAWA *et al.*, 2006; PIERI *et al.*, 2009; PELEGRINE *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2011).

Atualmente, estão sendo desenvolvidas metodologias embasadas na utilização conjunta da terapia com biomateriais xenógenos e células tronco mesenquimais adultas (PELEGRINE *et al.*, 2014). Estas terapias podem passar: (1) por procedimentos simples, como a associação de medula óssea *in natura*; (2) por procedimentos de mediana complexidade, como a concentração da fração de células mononucleares da medula óssea; ou (3) por procedimentos de isolamento e cultura celular (PELEGRINE *et al.*, 2014).

O cultivo das células tronco mesenquimais adultas possibilita o uso de um maior número de células osteoprogenitoras específicas, porém demanda maior tempo de

processamento envolvendo a coleta, cultivo e reimplantação, o que gera maior custo, além da dificuldade operacional, aumentando, assim, o risco de contaminação. A metodologia para a concentração das células tronco mesenquimais adultas da medula óssea, apesar de elevar a quantidade de células tronco e fatores de crescimento envolvidos, também necessita de um protocolo de execução relativamente complexo (YAMAMOTO *et al.*, 2002; YAMADA *et al.*, 2008; SAKAI *et al.*, 2008; SAUERBIER *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; STOCKMAN *et al.*, 2011).

A utilização do aspirado de medula óssea, apesar de resultar em um número menor de células tronco mesenquimais adultas quando comparada às técnicas de concentração e cultura celular, vem sendo utilizada conjuntamente a procedimentos de enxertia óssea devido à facilidade de execução técnica, rapidez trans-operatória, rápida recuperação do paciente e esta associada a uma menor morbidade. Devido ao carregamento dos arcabouços mecânicos com um conjunto heterogêneo de células, uma neoformação óssea é obtida quando comparada à utilização apenas do coágulo sanguíneo (PLENK *et al.*, 1972; PELEGRINE *et al.*, 2010).

As células derivadas dos tecidos enxertados e da região receptora, para desempenharem a função de produzir tecido ósseo, necessitam de uma propriedade específica dos biomateriais ósseos, que é a sua estrutura física responsável pelo suporte das células. A forma de como estes biomateriais desempenham a função de arcabouço também é uma das características que os diferencia. Desta forma, os enxertos xenógenos estão sendo cada vez mais considerados para a terapia celular do tecido ósseo, pois podem fornecer esta sustentação mecânica, tanto quanto na apresentação particulada, quanto na apresentação em blocos (PIATTELLI *et al.*, 1999; TRAINI *et al.*, 2007).

Assim, este estudo propõe a avaliação do uso do aspirado de medula óssea, associada a enxertos xenógenos e membranas de colágeno em defeitos ósseos na calvária de coelhos.



## **2. OBJETIVO**

Avaliar a associação da medula óssea ao enxerto xenógeno na regeneração óssea guiada em calvária de coelhos.

### 3. LITERATURA

GUPTA *et al.* (1982) investigaram o papel de implantes ósseos xenógenos descalcificados, desengordurados e impregnados com medula fresca autóloga para regenerar grandes defeitos ósseos corticais. Os enxertos ósseos corticais foram obtidos a partir de cirurgias ortopédicas nas diáfises de seres humanos e de porcos-da-índia e preparados com acetona, ácido clorídrico e etanol. Os enxertos foram utilizados para regenerar defeitos de três centímetros na diáfise da ulna de coelhos. A medula óssea fresca foi adicionada aos xenoenxertos e avaliações periódicas foram feitas clínica, radiográfica e histologicamente e por marcação por tetraciclina. Uma neoformação óssea abundante foi observada em 85,7% dos xenoenxertos humanos e em 83,3% dos xenoenxertos de cobaia. Os autores concluíram que o potencial osteo-indutor da medula autóloga foi responsável pela regeneração dos defeitos auxiliados pelo melhor meio tecidual fornecido pela remoção da gordura dos xenoinplantes descalcificados.

PALEY *et al.* (1986) testaram em rádio de coelhos a efetividade da injeção percutânea de medula óssea fresca no reparo de fraturas ósseas e no volume e resistência à fratura da área de regeneração óssea. Os autores aplicaram em defeitos ósseos bilaterais, em um mesmo coelho, medula óssea ou solução salina de forma randomizada. Após o período de duas semanas, foi observado um aumento do calo ósseo onde foi injetado a medula óssea em comparação à solução salina. Os exames radiográficos e histológicos confirmaram a melhor regeneração óssea nas regiões enxertadas com medula óssea. Desta maneira, os autores concluíram que o uso da técnica de enxertia de medula óssea, via injeção percutânea, foi considerada um método minimamente invasivo com resultados satisfatórios.

CONNOLLY *et al.* (1989) compararam a utilização da medula óssea *in natura* com o uso da fração estromal da medula, obtida por centrifugação na regeneração óssea em coelhos. A implantação da medula *in natura* e a fração estromal foi realizada em regiões ortotópicas e ectópicas de coelhos e, após um período de cinco semanas, os autores observaram um aumento na deposição de cálcio, com um crescimento da regeneração óssea nas regiões onde foi enxertado o concentrado de medula óssea em relação às regiões onde foi implantadosamente o aspirado de medula óssea (medula *in natura*).

WOLFF *et al.* (1994) avaliaram histomorfometricamente o crescimento ósseo, cartilaginoso e do tecido conjuntivo fibroso em fêmures de ratos. Para isso os autores realizaram defeitos ósseos que foram enxertados com substitutos ósseos de cerâmica composta por hidroxiapatita e fosfato tricálcio ou com fibrometal em titânio, os quais foram

associados ou não a um aspirado de medula óssea, proveniente dos fêmures dos animais e associado ao colágeno bovino. Os autores verificaram uma quantidade significativamente maior de tecido mineralizado vital nas regiões onde a medula óssea foi associada ao substituto ósseo.

MUSCHULER *et al.* (1997) em seu estudo realizaram a aspiração de quantidades diferentes de medula óssea em trinta e dois pacientes, sendo dezenove homens e treze mulheres. O objetivo foi avaliar o número de unidades formadoras de colônias (UFC-F) positivas para fosfatase alcalina por meio de um teste colorimétrico para fosfatase alcalina. Observou-se que a coleta de quatro mililitros de medula em comparação à de somente um mililitro gerou uma diminuição pela metade das unidades formadoras de colônias positivas para fosfatase alcalina. Desta maneira, os autores confirmaram que aumentar o volume do aspirado acresce proporcionalmente a quantidade de matéria indesejada, concluindo, portanto, que o volume aspirado não deveria exceder dois mililitros.

TAKAHASHI *et al.* (1999) avaliaram a quantidade óssea de alvéolos enxertados com osso autógeno particulado esponjoso, associados à medula óssea para a instalação de implantes em pacientes com fissuras alveolares. Foram avaliadas a altura óssea e a largura óssea interdental ao nível da crista alveolar, utilizando tomografia computadorizada e radiografia periapical. A altura da crista alveolar interdental, segundo os autores, pareceu ser o fator crítico para a cirurgia de implante. Uma grande proporção dos alvéolos enxertados (metade) necessitou de outro enxerto ósseo no prazo de 24 meses. Estes dados sugerem que os alvéolos enxertados com osso esponjoso e particulado, associados à medula óssea, são adequados para a colocação de implantes, mas a perda de largura e altura da crista alveolar óssea também deveria ser considerada.

MUSCHULER *et al.* (2001) constataram que a medula óssea coletada por aspiração contém células progenitoras de tecido conjuntivo, que podem ser induzidas para expressar um fenótipo de osso *in vitro*. O número de células progenitoras osteoblásticas pode ser estimado por contagem das unidades formadoras de colônias que expressam fosfatase alcalina (UFC-FALs). Este estudo foi realizado para testar a hipótese de que o envelhecimento humano está associado a uma mudança significativa no número de progenitores ou prevalência de células osteoblásticas na medula óssea. Quatro aspirados de medula óssea de 2 ml foram colhidos bilateralmente da crista ilíaca anterior de 57 pacientes, sendo 31 homens (15 a 83 anos) e 26 mulheres (13 a 79 anos). Uma média de 64 milhões de células nucleadas foram coletadas por aspirado. A prevalência média de UFC-FALs foi de 55 por milhão de células nucleadas. Estes dados revelaram uma diminuição significativa, relacionada à idade no número de células

nucleadas coletadas por aspirado para homens e mulheres ( $p = 0,002$ ). O número de UFC-FALs avaliado por aspirado também diminuiu significativamente de acordo com a idade para as mulheres ( $P = 0,02$ ), mas não para os homens ( $P = 0,3$ ). Estes resultados são relevantes para a coleta de células progenitoras da medula óssea na utilização em enxertos ósseos e, igualmente para outras aplicações em engenharia tecidual, podendo também ser relevante para a patofisiologia da perda óssea relacionada com a idade e osteoporose pós-menopáusia.

MUSCHULER & MIDURA (2002) afirmam que a engenharia de tecidos pode ser definida como qualquer esforço para criar ou induzir a formação de um certo tipo de tecido em uma localização específica por meio da seleção e manipulação de células, matrizes e estímulos biológicos. Os conceitos biológicos e os princípios bioquímicos e biofísicos que estão na base destes esforços tornaram-se um campo em rápida evolução na pesquisa biomédica. Na opinião dos autores, a engenharia tecidual nunca pode desviar muito dos princípios biológicos fundamentais, e uma delas é que as células fazem todo o trabalho. Não há novas formas de tecido, exceto através da atividade de células vivas. Declaram no texto que a eficácia de todos os instrumentos clínicos correntes depende inteiramente das células no local enxertado, particularmente o pequeno subconjunto de células estaminais e células progenitoras capazes de gerar um novo tecido. Os paradigmas funcionais da biologia das células estaminais foram revistos, incluindo autorrenovação, a mitose assimétrica e simétrica, e restrição de linhagem. Foram discutidas várias fontes potenciais de células-tronco autógenas de tecidos conjuntivos. Finalmente, um modelo matemático simples é apresentado como uma ferramenta para compreender as demandas funcionais colocadas em células-tronco e progenitoras no local do enxerto, fornecendo uma estrutura conceitual para o desenho racional de enxertos compostos de matriz celular.

LUCARELLI *et al.* (2004) relatam que o osso é um tecido que tem a capacidade de se regenerar quando fraturado. Ocasionalmente, um defeito crítico pode ser formado quando a parte do osso foi perdida ou excisada e, neste caso, o osso não consegue se curar e exige uma reconstrução para evitar um defeito de não-união. Osso esponjoso autógeno é o atual tratamento padrão-ouro em perda óssea. Porque a quantidade de osso esponjoso autógeno que pode ser coletada é limitada, a crescente necessidade de reconstrução óssea está emparelhada pelo crescimento do interesse na disciplina de engenharia de tecidos. Os autores comentam que vários investigadores têm focado a sua atenção sobre um subconjunto de células estaminais / progenitoras hematopoiéticas autólogas não contidas no estroma da medula óssea adulta, referidas como células estaminais de estroma (CEE), como as células apropriadas para serem transplantadas. Em protocolos pré-clínicos e clínicos de defeitos críticos, em que são

empregadas CEE, duas abordagens foram usadas: na primeira CEE são derivadas da medula óssea e introduzidas diretamente no local da lesão; na segunda CEE são derivadas de várias regiões e expandidas *ex vivo* antes de serem implantadas. Os autores comentam que ambas as abordagens são igualmente corretas e, em princípio, terão de demonstrar com provas definitivas a sua eficácia, e capacidade de regenerar em um problema clínico crítico, como a não-união óssea.

SMILER & SOLTAN (2006) descrevem uma técnica para a obtenção de células estaminais adultas a partir de aspirado de medula óssea. Relatos de casos mostraram como este procedimento pode substituir o padrão ouro para enxertos ósseos com a obtenção de células-tronco. Os autores denominaram de padrão platina o uso do aspirado de medula óssea e o transplante de células-tronco adultas dentro de uma matriz reabsorvível para enxertos ósseos. Existem várias vantagens de se usar o aspirado de medula óssea. A técnica é simples, um segundo local da cirurgia não é necessária e a morbidade pós-operatória.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de osso disponível em implantes dentários, CERRUTTI FILHO *et al.* (2007) recomendam que os implantes devem ser colocados associados ao plasma rico em plaquetas (PRP) e células mononucleares (CMN) a partir do aspirado de medula óssea e arcabouço ósseo andaime (AO). O estudo foi realizado em 32 pacientes com idades entre 45 e 75 anos. A obtenção das CMN e a adesão ao AO foram confirmados através de histologia, cultura de células, e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados clínicos, analisados por tomografia computadorizada, mostraram que os arcabouços foram bem integrados e adaptados ao osso cortical. Os autores concluíram que o processo de regeneração observados nos pacientes foi devido à presença de células estaminais mesenquimais na fração de CMN nos enxertos ósseos.

NAIR *et al.* (2007) realizaram um estudo comparativo de enxertia óssea em calvária de coelhos onde puderam avaliar a eficácia diagnóstica da tomografia computadorizada convencional e compará-la com a tomografia computadorizada de abertura sintonizada. Após três períodos de tempo, variando entre 2, 4 e 8 semanas, os autores analisaram histomorfometricamente os locais de enxertia para posterior comparação aos métodos tomográficos. Os resultados apresentaram uma correlação positiva entre os dois métodos tomográficos, apresentando grande precisão na detecção da cicatrização óssea. Em relação à análise histomorfométrica, concluíram que o aumento da área de tecido mineralizado vital e não vital coincide com as imagens de maior densidade óptica, indicando a presença de tecidos mineralizados. No entanto, não se poderia distinguir entre ambos nos casos onde na tomografia a indicação era de uma área não ossificada, a histomorfometria indicava maior

área de tecido não mineralizado.

SAKAI *et al.* (2008) em seu estudo relataram que o transplante de medula óssea pode levar à reparação osteogênica de condições ósseas intratáveis. Para alcançar resultados clínicos ótimos, seria necessário um enxerto ósseo como muitas células com potencial osteogênico. Os autores relatam que, no entanto, as abordagens que envolvem equipamentos especiais e reagentes para a extração e purificação de células têm alto custo e os procedimentos envolvidos são complexos e se tornam um obstáculo para a aceitação generalizada do enxerto de medula óssea na regeneração osteogênica. Para padronizar os enxertos de medula óssea nos procedimentos de regeneração, um sistema de baixo custo simples, seguro e limpo seria necessário. Os autores descreveram um método fácil de se usar, utilizando uma técnica de centrifugação da medula óssea em uma bolsa de sangue convencional.

VADALÁ *et al.* (2008) indicam que os resultados da fusão da coluna multinível pósterio em clínicas difíceis, como em um paciente osteoporótico multi-doente idoso, permanecem imprevisíveis. As células osteoprogenitoras em diminuição de medula óssea, com o envelhecimento, perdem seu potencial osteogênico. Células de medula óssea autólogas (BMCs), a partir de crista ilíaca aspirada, podem ser concentradas na sala de operações e de fibrina rica em plaquetas (PRF), obtidas a partir de uma amostra de sangue periférico como fonte de células osteoprogenitoras autólogas e factores de crescimento, respectivamente. Apresentamos o caso de uma paciente osteoporótica de 88 anos multidoente, afectada por estenose cervical. Submetidas a C3 - C7 a descompressão posterior, instrumentação e fusão pósterio-lateral, usando uma intra-operatória "engenharia de tecidos", com um composto de enxerto ósseo córtico aumentado com CMO, autólogos concentrados a partir de aspirado crista ilíaca, enriquecidos com PRF de sangue periférico. Raios-X, dinâmicas laterais, e tomografia computadorizada mostraram sinais de consolidação em três meses de acompanhamento, com sólida C3 - fusão C7 aos 6 meses de seguimento. Este artigo descreve um método simples e eficaz para melhorar potencialmente a taxa de fusão em pacientes com osteoporose usando enxerto ósseo córtico aumentada com concentrado autólogo CMO da crista ilíaca, enriquecido com PRF de sangue periférico, rapidamente obtido antes do procedimento cirúrgico.

KIM *et al.* (2009) analisaram, em coelhos, a eficácia da utilização da dupla camada de membrana colágena (Bio-Gide®) sobre enxertia óssea autógena da crista ilíaca na formação de blocos córtico medulares. Após 2, 4 e 6 meses, os autores realizaram exames histológicos e histomorfométricos, relatando a presença da membrana após 6 meses, quando utilizada a

técnica de 2 camadas, enquanto a técnica convencional da camada única apresentou degradação parcial com 4 meses e total com 6 meses. Os autores relataram uma menor reabsorção óssea e presença de maior densidade no grupo onde foi utilizada a técnica da dupla camada, concluindo que a membrana pode gerar uma redução na reabsorção óssea do enxerto, apresentando uma melhora na efetividade do processo quando utilizada a técnica de camada dupla.

PIERI *et al.* (2009) enxertaram arcabouços de hidroxiapatita impregnados com células tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas, cobertos por uma membrana reabsorvível, em defeitos ósseos na mandíbula de mini-porcos. Os autores avaliaram histológica e histomorfometricamente os resultados, que apresentaram uma maior quantidade de tecido ósseo após um período de 3 meses de uso das células tronco, com resultados compatíveis à da enxertia autógena.

PELEGRINE *et al.* (2010) avaliaram em humanos o potencial da utilização do aspirado de medula óssea autóloga na preservação do osso alveolar pós-exodontia. Os autores preencheram os alvéolos do grupo teste com medula óssea imediatamente após a extração, sendo que o grupo controle não teve nenhum tipo de preenchimento fora o coágulo sanguíneo. Exames clínico, histológico e histomorfométrico foram realizados em um período de 6 meses, demonstrando menor perda óssea no grupo teste em relação ao controle do ponto de vista clínico. As análises histológicas e histomorfométricas não apresentaram diferenças entre os dois grupos. Não ocorreu formação de nenhum tipo de tecido indesejável nos pacientes do grupo teste, apenas tecido ósseo vital.

PELEGRINE *et al.* (2010) avaliaram a formação óssea aposicional na calvária de coelhos quando da associação da medula óssea autóloga com osso homólogo, obtido das tíbias dos animais. Foram realizados exames clínicos, de microscopia óptica e histomorfométricos. Os autores observaram resultados estatisticamente melhores, com níveis de formação óssea superiores, no grupo teste em relação ao grupo controle. Os autores concluíram que o osso homólogo fresco congelado pode ser um bom material osteocondutor, quando associado à medula óssea.

COSTA *et al.* (2011) avaliaram clinicamente, em humanos, a eficácia da enxertia homóloga (banco de ossos) quando da impregnação dos blocos ósseos com um aspirado de medula óssea autóloga. Os autores selecionaram dois grupos de 5 indivíduos, divididos randomizadamente, realizando a enxertia de dois blocos ósseos homólogos, fixados com parafusos de titânio. Utilizou-se no grupo teste a coleta da medula pela crista ilíaca do paciente, imediatamente antes da cirurgia. No grupo controle, os blocos ósseos não foram

associados com o aspirado. Os resultados foram avaliados pelos métodos histológico, histomorfométrico e tomográfico. As amostras foram removidas imediatamente antes da instalação dos implantes e o parafuso de fixação foi utilizado como ponto de referência para mensuração da perda óssea após o período estipulado de 6 meses. Obtiveram-se melhores resultados no grupo onde foi utilizado o aspirado de medula óssea quando comparado ao grupo controle, sugerindo que esta associação pode melhorar o potencial de remodelação dos enxertos ósseos homólogos.

JENSEN *et al.* (2011) realizaram uma revisão sistemática da literatura com o objetivo de testar a hipótese de não haver diferença entre o uso de Bio-Oss puro ou misturado com osso autólogo no levantamento do assoalho do seio maxilar. Os autores realizaram um levantamento de dados nas bases MEDLINE (PubMed), Embase e Cochrane Library, selecionando estudos realizados em animais e publicados em inglês de 1 de janeiro de 1990 a 1 de julho de 2010. Os autores concluíram que a estabilidade volumétrica do enxerto aumentou significativamente com o uso do Bio-Oss, porém ainda não foram realizados estudos comparando o contato entre osso e implante, a biomecânica do implante no osso enxertado e a mistura de Bio-Oss com osso autólogo. Assim, os autores não puderam confirmar, com base nos estudos existentes, a hipótese da diferença entre o uso do biomaterial puro ou associado ao enxerto autólogo.

STOCKMAN *et al.* (2011) compararam o potencial osteogênico de células derivadas do tecido adiposo, do periósteo e da medula óssea. Os autores realizaram defeitos monocorticais na calvária de 21 porcos domésticos, nos quais foram adicionados arcabouços mecânicos de colágeno associados às células osteogênicas, apresentando um grupo controle somente com o arcabouço colágeno. Realizaram-se, após 30 e 90 dias, avaliações por RT-PCR, fosfatase alcalina, imunofluorescência, microrradiográfico, microscopia de luz, imunohistoquímico e avaliação histomorfométrica para verificação e quantificação de volume ósseo, volume total do defeito e taxa de mineralização do osso recém formado. Nos estágios iniciais da cicatrização de feridas, até 30 dias, os defeitos teste não mostraram melhor regeneração óssea do que os defeitos controle, mas o processo de cicatrização óssea nos defeitos teste foi acelerado na fase posterior comparados aos defeitos controle. Todos os defeitos do grupo teste mostraram a regeneração óssea completa após 90 dias, frente às do defeito controle. Os resultados indicam que a eficiência osteogênica das células derivadas do tecido adiposo, periósteo e da medula óssea, apesar de superiores, não apresentam diferença significativa para a regeneração guiada de defeitos ósseos.

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. Utilizaram-se 6 cães submetidos a extrações de pré-molares inferiores, bilateralmente. Após doze semanas, quatro defeitos ósseos (6 mm de largura/4 mm de comprimento) foram realizados, de um lado e preenchidos aleatoriamente com: DBBM; HA/TP; ab; e Cg, respectivamente, e esperaram a cicatrização do defeito ósseo. Após oito semanas, um implante foi instalado. Na mesma sessão, quatro defeitos semelhantes foram realizados no lado oposto, e realizou-se 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. Prepararam-se 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. A área das partículas tende a ser mais elevada 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) os autores relataram que Na avaliação das propriedades de biomateriais particulados enxertados em cavidades ósseas cirúrgicas, deveM-se considerar separadamente dois ambientes diferentes. Em primeiro lugar, o que ocorre diretamente na interface das partículas com o coágulo sanguíneo e o tecido de granulação, inclusive a osteogênese. Em segundo, o que ocorre nos espaços entre as partículas, distante de sua superfície: quais as reações teciduais induzidas, inclusive a osteogênese. Os autores formulam algumas questões como, por exemplo: Nesses espaços, como evoluem o coágulo sanguíneo, o tecido de granulação e a neoformação óssea? A mais preponderante das reações frente aos biomateriais particulados deve estar relacionada com o que ocorre diretamente sobre a superfície das partículas e, se ao longo do tempo, essas partículas serão ou não reabsorvidas

para dar lugar ao tecido ósseo e restabelecer por completo a normalidade no local.

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, distribuídos aleatoriamente em três grupos de seis animais e 1 grupo de 3 animais. Criaram-se defeitos bilaterais de 12 mm de 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, 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 regeneração 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 em todos os outros grupos, mas de forma significativa 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 aos 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.

## 4. MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisas da Unifesp, CEP-UNIFESP 2139/11 (APÊNDICE).

### 4.1 DESENHO DE ESTUDO

Primário; Intervencional; Experimental; Longitudinal; Prospectivo; Aleatorizado; Unicego; Centro único.

### 4.2 AMOSTRA

Foram utilizados 10 coelhos da raça Nova Zelândia com idade entre 10 e 12 meses e peso entre 3 a 5 kg . Os animais vieram do biotério central da UNIFESP, acompanhados por veterinário responsável. As dependências do biotério estavam de acordo com as normas da lei nº 6.638 de 08 de maio de 1979, acondicionando os animais em gaiolas individuais em salas com temperatura controlada entre 18 a 20°C, e alimentação baseada em ração comercial peletizada e água *ad libitum*.

### 4.3 MATERIAIS

Enxerto Bovino: Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Substituto ósseo xenógeno particulado. Origem bovina (Figura1).

Membrana de Colágeno: Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Membrana reabsorvível bilaminar. Origem suína (Figura 2).



Figura 1- Apresentação comercial do enxerto ósseo particulado



Figura 2- Apresentação comercial da membrana de colágeno

#### 4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram distribuídos de forma randomizada pelo *site* [www.randomization.com](http://www.randomization.com) em dois grupos com cinco animais cada, a saber: Grupo Controle (GC) no qual foi utilizado o enxerto xenógeno (origem bovina) para o preenchimento dos defeitos e Grupo Experimental (GE), no qual foi utilizado o enxerto xenógeno associado ao aspirado de medula óssea no preenchimento dos defeitos ósseos. Em todos os coelhos foram realizadas vinte craniectomias (duas por animal), sendo que uma delas recebeu uma cobertura com membrana de colágeno, que permitiu outra distribuição em relação ao lado que receberia esta membrana compondo os seguintes sub-grupos com o (n) baseado na quantidade de defeitos ósseos criados: GCCM (grupo controle com membrana) (n=5); GCSM (grupo controle sem membrana) (n=5); GECM (grupo experimental com membrana) (n=5); GESM (grupo experimental sem membrana) (n=5). Nos 10 animais, os defeitos ósseos criados na calvária foram circulares, medindo 12 mm de diâmetro, localizados na região posterior da calvária, especificamente nos ossos parietais. Nos animais do grupo controle, ambos os defeitos foram preenchidos com enxerto xenógeno particulado (Bio-Oss). Os animais do grupo experimental foram submetidos à associação do enxerto xenógeno particulado com o aspirado de medula óssea. Em todos os animais, um dos defeitos foi coberto por uma membrana de colágeno. Os lados da calvária que receberam a membrana de colágeno foram escolhidos de forma randomizada, utilizando-se o *site* [www.randomization.com](http://www.randomization.com). O óbito induzido dos animais foi realizado em grupos de cinco, após um período de oito semanas. As análises histomorfométrica e tomográfica foram realizadas por dois avaliadores cegos.

#### 4.5 ETAPAS EXPERIMENTAIS

##### 4.5.1 Coleta do Aspirado de Medula Óssea

Os 10 animais foram submetidos a anestesia geral induzida por quetamina (40mg/kg), midazolam (2mg/kg) e citrato de fentanila (0,8mg/kg), mantida com oxigênio e isoflurano em vaporizador universal com máscara facial. Posteriormente, foi realizada a aspiração de medula óssea da tíbia na porção superior do seu platô, com o joelho do coelho na posição de flexão forçada (Figura 3). Utilizou-se, para a punção, uma agulha 40x15mm (B-D, Becton & Dickinson Ind. Cirúrgicas S/A, São Paulo, SP, Brasil) em seringas de 20 ml previamente heparinizadas (1:100) (Figura 4). Nos animais do grupo controle a medula aspirada foi descartada e nos animais do grupo experimental a medula foi misturada ao enxerto xenógeno.

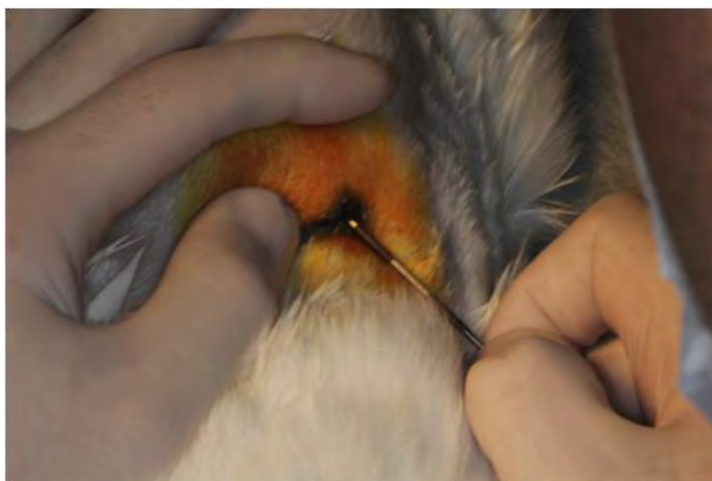


Figura 3- Introdução da agulha na parte superior da tíbia



Figura 4- Seringa plástica heparinizada conectada a agulha para aspiração da medula óssea.

#### 4.5.2 Protocolo Cirúrgico

Com os animais previamente submetidos à anestesia geral, realizou-se a tricotomia na cabeça para posterior assepsia do meio com solução de iodo-povidona. A anestesia local foi feita à base de lidocaína com epinefrina 1:100.000 para a promoção de uma isquemia local.

Demarcaram-se dois pontos na cabeça do coelho para a incisão sobre o plano sagital mediano 1) anterior: baseado dos arcos superciliares e 2) posterior: ponto imediatamente anterior à inserção da orelhas. Uma linha de sete centímetros foi demarcada com azul de metileno para orientação da incisão, realizada com uma lâmina de bisturi número 10 (Figuras 5 e 6). Uma vez realizada a incisão seguiu-se o rebatimento da pele e sua divulsão com tesoura romba em uma área de aproximadamente 30mm<sup>2</sup> em cada lado da calvária. O periósteo foi descolado utilizando-se um descolador de Mot (número 5). Após a exposição dos ossos parietais, duas suturas estavam evidentes a) sutura inter-parietal e b) sutura fronto-parietal (Figura 7). Utilizando-se estas duas suturas como parâmetros, foram criados defeitos com 12mm de diâmetro com o auxílio de uma broca trefina de 10mm, adaptada em um motor elétrico com um contra-ângulo redutor 16:1 e irrigação de solução salina (Driller, São Paulo, SP, Brasil). A broca trefina, em todas as craniotomias, foi posicionada dois milímetros equidistantes das duas suturas, que têm uma relação ortogonal entre si (Figura 8). Uma vez posicionada a broca, realizou-se a craniotomia e, em seguida, a craniectomia, com exposição da dura-máter (Figura 9). O material de enxertia foi posicionado sobre a dura-máter cobrindo todo o volume do osso local removido e coberto ou não por membrana colágena (Figura 10). A síntese foi realizada com pontos simples com fios de sutura nylon 4-0 (Ethilon<sup>TM</sup>), para evitar a exposição da membrana e/ou material de enxertia. No período pós operatório, medicou-se os animais com: antibióticocefazolina sódica (30mg/kg) de 12 em 12 horas por 7 dias; anti-inflamatório flunixin metaglumina (1mg/kg) de 24 em 24 horas por 3 dias; analgésico cloridrato de tramadol (2mg/kg) de 8 em 8 horas por 3 dias. As feridas cirúrgicas foram higienizadas duas vezes ao dia com solução fisiológica 0,9% e iodo povidona por 15 dias. Os animais receberam ração peletizada e água *ad libitum* pelo restante do período experimental.

Após o período de oito semanas, realizou-se o óbito indolor induzido dos animais por sobredose de tiopental sódico via cateter na veia auricular marginal, após a aplicação de quetamina 40mg.kg-1. Posteriormente ao óbito induzido, todos os animais tiveram toda a calvária removida por dissecação. As calvárias removidas foram esqueletizadas com auxílio de descoladores e tesouras e fixadas em formol 10% tamponado. Após 36 horas, as calvárias

foram transferidas para um recipiente de acrílico com tampa contendo álcool absoluto (sete vezes o volume da calvária) para sua conservação. Depois da avaliação tomográfica, foram removidos fragmentos de 2,0 X 2,0 cm dos ossos parietais por meio de uma broca tronco-cônica carbide número 10 montada em peça de mão irrigada com solução salina e acoplada a uma motor elétrico. Os fragmentos foram acondicionados em tubos cônicos tipo Falcon de 15 ml, contendo 10ml de álcool absoluto. Uma vez acondicionados nos tubos, estes fragmentos foram enviados para processamento histológico.



Figura 5- Incisão para exposição dos ossos parietais



Figura 6- Conferência da extensão da incisão





Figura 7. Descolamento da pele e do periósteo para exposição dos ossos parietais



Figura 8- Posicionamento da broca trefina para realização da craniotomia

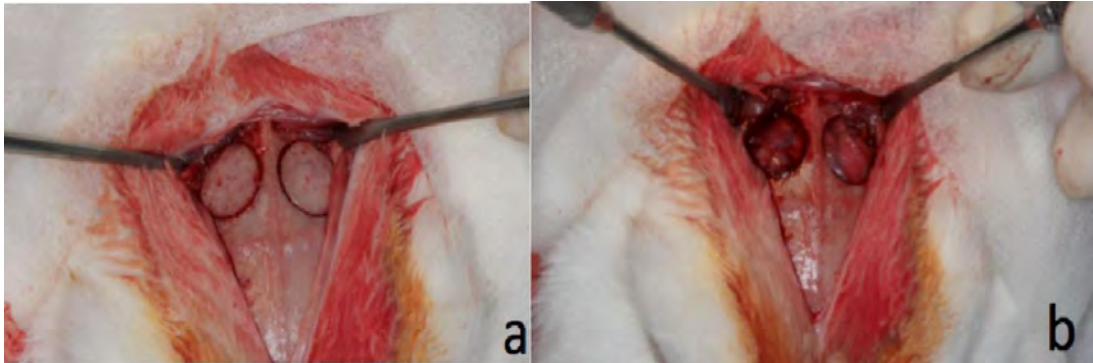


Figura 9 - (a) craniotomia (b) craniectomia

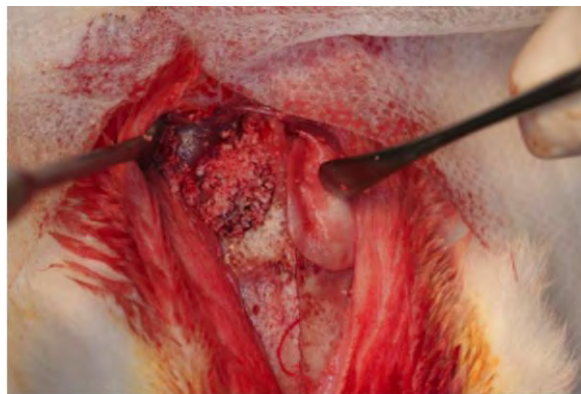


Figura 10- Preenchimento dos defeitos ósseos no grupo controle.

Um lado com enxerto xenógeno e o outro com enxerto xenógeno e cobertura com uma membrana de colágeno

## 4.6 SERVIÇOS AUXILIARES

### 4.6.1 Análise Tomográfica

As caixas contendo as cabeças esqueletizadas, já fixadas por cera para manter o seu longo eixo, foram posicionadas no aparelho tomógrafo (Figura 11). O tempo de aquisição foi de 40 segundos, empregando-se 0,2 voxel de resolução, 120 kilovolts (KV) e 46,72 miliamperes por segundo (mas). A área total da craniotomia foi mensurada e, no seu interior, foi calculada em milímetros quadrados a região que correspondeu ao tecido ainda não mineralizado ou a região denominada de remanescente do defeito ósseo. Após a aquisição, as imagens foram transferidas para um microcomputador instalado em uma sala contígua, de onde era possível visualizar a caixa de acrílico. As imagens adquiridas foram visualizadas e trabalhadas em programas computacionais do próprio tomógrafo (Xoran Technologies, Ann Arbor, Michigan USA) (Figura 12). O tomógrafo utilizado foi do tipo cone beam I-CAT (Kavo Kerr Group). As tomografias e as aquisições das imagens foram realizadas por um radiologista com experiência neste tipo de exame.



Figura 11- Posicionamento da caixa de acrílico no aparelho de tomografia



Figura 12- Marcação dos parâmetros no software Xoran (USA) para determinar a área remanescente dos defeitos ósseos após aquisição de imagens pelo tomógrafo.

#### 4.6.2 Análise Histológica

Para análise histológica foram removidos fragmentos de 20mm x 20mm dos ossos parietais (Figura 13). Em todos os fragmentos, a área selecionada para análise foi a região central, obtida por um corte longitudinal na peça equidistante das extremidades, dividindo o fragmento ao meio. Estes fragmentos foram descalcificados em EDTA 10% por 36 horas. Após este período, eles foram fixados e embebidos em blocos de parafina. Os blocos de parafina foram levados ao micrótomo para os cortes histológicos de sete micrômetros de espessura. Foram selecionados, para análise histomorfométrica, os dois primeiros cortes de cada metade do fragmento original, totalizando quatro cortes por lâmina histológica.



Figura 13- Fragmentos ósseos provenientes do osso parietal removido da calvária após o exame tomográfico

#### 4.6.3 Análise Histomorfométrica

De cada um dos quatro cortes, que compunham cada lâmina histológica, 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.

A imagem capturada, referente a área total do corte do tecido ósseo na lâmina, foi avaliada pelo programa Infinity Analyse® (Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá). As imagens das áreas, obtidas pela fotomicrografia, foram demarcadas utilizando ferramentas do próprio programa e foram realizadas as mensurações relativas aos seguintes parâmetros: [1] Tecido Mineralizado Não Vital (TMNV); [2] Tecido Mineralizado Vital (TMV); [3] Tecido Não Mineralizado (TNM). Dois examinadores foram treinados para identificação destas áreas e, em caso de divergência, a imagem era reavaliada e um consenso obtido. Todos os resultados foram obtidos em micrômetros quadrados e expressados em porcentagem da área total (Figura 14).

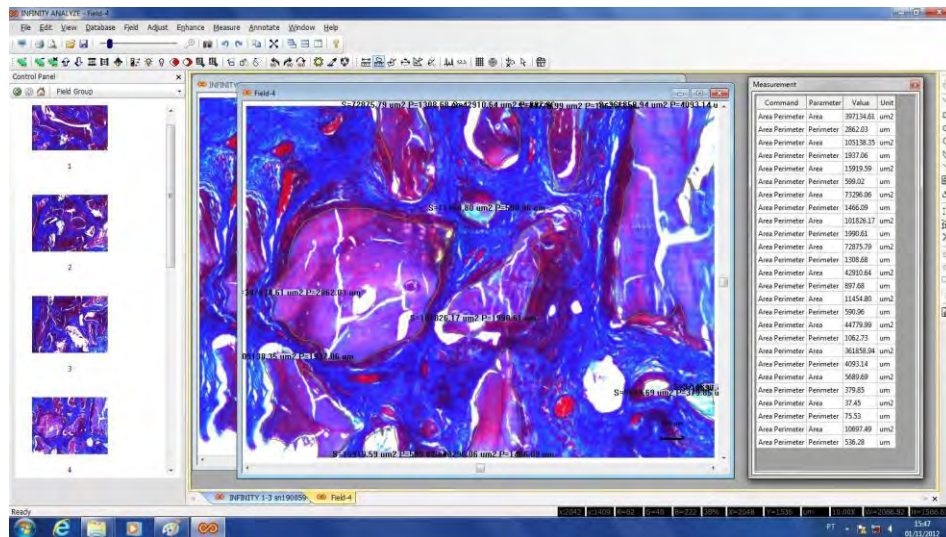


Figura 14- Aspecto da fotomicrografia de um corte histológico sendo avaliado pelo software Infinity Analyse.

#### 4.6.4 Análise Estatística

O cálculo amostral foi realizado baseado no desfecho primário, que foi determinado como a mensuração da influência do aspirado de medula óssea no enxerto xenógeno na geração de tecido mineralizado vital.

Após quantificação dos dados, utilizou-se o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA) e aplicado o teste de ANOVA com correção de Tukey, este teste foi utilizado para comparar os resultados obtidos em relação às variáveis TMNV, TMV e TNM. 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.

## 5. RESULTADOS

Tabela 1: Valores das médias das áreas de defeito ósseo remanescente expressa em mm<sup>2</sup> verificada no exame tomográfico das calvárias dos coelhos.

Coelho	Grupo Controle		Grupo Experimental		Valor de P
	Com Membrana	Sem Membrana	Com Membrana	Sem Membrana	
1	73,45	70,60	62,89	53,23	
2	73,78	70,40	61,54	51,85	
3	73,67	70,49	62,60	52,50	
4	72,45	70,50	62,40	52,30	
5	74,48	70,49	62,40	52,60	
Média	73,70	70,50	62,60	52,50	0.03*
DP	5,90	6,12	4,78	5,40	

Tese de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (0,05) foram assinalados por (\*).

Tabela 2: Valores das médias das áreas de tecido mineralizado vital (TMV) expressas em porcentagem nos grupos: GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana

Coelho	Grupo Controle		Grupo Experimental		Valor de P
	Com Membrana	Sem Membrana	Com Membrana	Sem Membrana	
1	12,70	6,54	21,14	12,48	
2	13,08	7,08	21,16	12,30	
3	11,80	6,66	20,54	11,90	
4	12,70	6,43	20,09	12,50	
5	12,80	6,32	21,19	12,46	
Média	12,78	6,61	21,16	12,44	0.04*
DP	5,9	1,29	3,76	7,08	

Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<005) foram assinalados por (\*).

Tabela 3: Valores das médias das áreas de tecido não mineralizado (TNM) expressas em porcentagem nos grupos: GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana

Coelho	Grupo Controle		Grupo Experimental		Valor de P
	Com Membrana	Sem Membrana	Com Membrana	Sem Membrana	
1	81,42	67,97	72,20	58,50	
2	81,38	67,40	72,02	58,55	
3	80,99	67,95	71,90	58,49	
4	82,01	66,98	72,45	58,54	
5	81,44	67,34	72,16	58,50	
Média	81.41	67.95	72.16	58.54	0.01*
DP	3.25	7.03	3.27	3.58	

Teste de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (<0,05) foram assinalados por (\*).

Tabela 4: Valores das médias das áreas de tecido mineralizado não vital (TMNV) expressas em porcentagem nos grupos: GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana

Coelho	Grupo Controle		Grupo Experimental		Valor de P
	Com Membrana	Sem Membrana	Com Membrana	Sem Membrana	
1	13,35	13,65	20,30	15,31	
2	13,40	13,70	20,29	15,30	
3	13,30	13,60	20,28	15,31	
4	13,35	13,64	20,29	15,29	
5	13,40	13,67	20,28	15,31	
Média	13.35	13.64	20.29	15.31	0.21
DP	3.13	6.31	4.17	5.22	

Tese de ANOVA *one way* com correção de Tukey onde os valores considerados significantes de p (0,05) foram assinalados por (\*).



Tabela 5: Valores das médias das áreas de TMNV: tecido mineralizado não vital; TMV: tecido mineralizado vital; TMN tecido não mineralizado expressas em porcentagem nos grupos: GC SM: grupo controle sem membrana; GC CM: grupo controle com membrana GE SM: grupo experimental sem membrana; GE CM: grupo experimental com membrana

	GC		GE		n	Valor de P
	Sem Membrana	Com Membrana	Sem Membrana	Com Membrana		
	Media e DP	Media e DP	Media e DP	Media e DP		
TMNV	13.64 ± 2.34	13.35 ± 3.13	15.31 ± 5.22	20.29 ± 4.17	5	0.21
TMV	6.31 ± 1.29	12.78 ± 5.9	12.44 ± 7.08	21.16 ± 3.76	5	0.04*
TNM	81.41 ± 3.25	67.95 ± 7.03	72.16 ± 3.27	58.54 ± 3.58	5	0.01*

Tese ANOVA *one way* com correção pelo teste de Tukey (\*).

## 6. DISCUSSÃO

Os traumatismos, sob todos os aspectos, apresentam uma grande importância na sociedade atual estando entre as principais causas de morbimortalidade, principalmente em grandes centros urbanos (KRUG *et al.*, 2000). Os acidentes e a violência no Brasil configuram um problema de saúde pública de grande magnitude e transcendência, que têm provocado forte impacto na morbidade e na mortalidade da população. Traumas crânio-faciais são as maiores causas de perda óssea em humanos e animais (KOIZUM *et al.*, 1997). Os enxertos ósseos são utilizados para manter a continuidade dos cotos remanescentes e promover a produção de matriz óssea para que ocorra o depósito e migração de células osteoprogenitoras, permitindo a completa regeneração óssea (PELEGRINE *et al.*, 2014).

O interesse no estudo de materiais capazes de substituir o tecido ósseo vem aumentando, principalmente na cirurgia maxilo-facial e odontologia, onde o surgimento de tratamentos como os implantes osteointegrados e uma maior conscientização da importância da reconstrução óssea nos pacientes submetidos a procedimentos mutiladores têm levado à necessidade de se repor o tecido ósseo perdido com maior frequência que anteriormente (PELEGRINE *et al.* 2010).

O tecido ósseo, em função da sua capacidade regenerativa é, em muitas situações, capaz de restabelecer perfeitamente sua anatomia e suas propriedades mecânicas (PIERI *et al.* 2010). No entanto, a capacidade regenerativa do tecido ósseo tem limites podendo falhar em certos casos. Algumas situações podem explicar estas complicações como: falhas de vascularização, defeitos de tamanho crítico e a invasão de tecidos moles adjacentes (PIERI *et al.* 2010). Histologicamente, em todos os animais onde a neoformação óssea foi observada, o osso recém-formado apresentou aspecto imaturo, acompanhado de intensa formação vascular e fibras colágenas organizadas irregularmente. Ao longo do tempo, o osso adquire aspecto de “osso maduro”, podendo-se identificar a presença de osteócitos e uma aparente estabilidade, características compatíveis com o padrão descrito em outros experimentos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

Nos defeitos denominados críticos, a formação óssea limita-se às áreas periféricas, sendo preenchida, em toda extensão, por tecido conjuntivo fibroso. Isto faz com que a formação óssea total seja retardada ou nem ocorra (NAIR *et al.*, 2007 e ZHAO *et al.*, 2011).

A definição do tamanho do defeito para que seja considerado crítico ou não, é determinada pela relação do tamanho da área do defeito em relação ao tamanho da área total do osso onde ele foi realizado. Por não repararem espontaneamente, os estudos baseados em

defeitos ósseos críticos são os mais comuns para se analisar como atuam os biomateriais na regeneração tecidual (SCHMITZ & HOLLINGER 1986; CONSOLARO *et al.*, 2013; ZIGDON *et al.*, 2014), como foi utilizado nesse estudo.

Os defeitos críticos na calvária de coelhos podem chegar até 15 mm de diâmetro no entanto, com esta dimensão, apenas um defeito por calvária seria possível, uma vez que se deve permitir um suprimento sanguíneo do periósteo e um padrão membranoso de regeneração óssea. Esse tamanho de defeito foi aceito como um padrão no uso de defeito crítico no crânio de coelhos na maioria dos estudos como os de PALEY *et al.* (1986) e GUPTA *et al.* (1982) e CLOCKIE *et al.* (2002) e foi utilizado como modelo de defeito ósseo no estudo em questão.

Defeitos ósseos com 8 mm e 10mm de diâmetro, contudo não podem ser considerados críticos, pois existe a formação óssea no centro do defeito, o que o descaracteriza como um defeito crítico (ZHAO *et al.*, 2011).

O enxerto ósseo autógeno ainda é considerado o melhor para a substituição de perdas ósseas, acima do limite crítico necessário à reparação e, apesar de suas vantagens indiscutíveis, tem-se também algumas desvantagens, dentre elas uma maior morbidade e ser um recurso de fonte esgotável, motivando diversas especialidades a procurar substitutos ósseos à altura, que aliem as vantagens, minimizando as desvantagens (COSTA *et al.*, 2011).

Para testar substitutos ósseos, os estudos geralmente optam por um desenho metodológico de investigação experimental em animal, prospectivo, comparativo e aleatório. Esta opção é feita devido ao fato de ser este o modelo mais adequado para a experimentação de substitutos ósseos antes dos ensaios clínicos. (JENSEN *et al.*, 2011).

Em relação à escolha do coelho como modelo para estudos em regeneração óssea, sabe-se que a velocidade da regeneração óssea entre coelhos e humanos é diferente, sendo o metabolismo ósseo do coelho é, aproximadamente, três vezes mais rápido do que dos humanos (FRAKE *et al.*, 1980; DODDE *et al.*, 2000; CLOKIE *et al.*, 2002; GUO *et al.*, 2012). Apesar das diferenças entre o uso da calvária de coelhos e a ossificação em humanos, é muito freqüente a sua utilização, como em PELEGRINE *et al.* (2010) e PELEGRINE *et al.* (2014), pois modelos animais para estudos de enxerto ósseo são mais fáceis de obter e manusear e também adequados para preparação de cavidades maiores no osso.

A calvária de coelho tem as mesmas características que o osso da mandíbula, como a sua origem embriológica intramembranosa, a presença de duas camadas corticais separadas por osso esponjoso e a fisiologia da reparação óssea (FRAME, 1980). Além disso, o crânio tem estrutura similar a todas as espécies animais mais desenvolvidos e isso é um forte

indicador da relevância clínica para a reconstrução maxilo-facial (FINDIKCIOGLU *et al.*, 2009).

Algumas avaliações em relação aos biomateriais utilizados ainda precisaram ser feitas para que fossem utilizados clinicamente (FRAKE *et al.*, 1980; KIM *et al.*, 2012).

A utilização da medula óssea, na melhora da performance de biomateriais para engenharia tecidual, é um assunto bem discutido na literatura (CONNOLLY *et al.*, 1989; MUSCHULER *et al.*, 1997; TAKAHASHI *et al.*, 1999; MUSCHULER *et al.*, 2001 e MUSCHULER & MIDURA 2003). Um fato que limita a utilização de xenoenxertos ósseos é que estes biomateriais são osteocondutores, mas não são osteoprogenitores, uma vez que esta característica só existe onde são encontradas células indiferenciadas que possuem capacidade de diferenciação osteoblástica (PIATTELLI *et al.*, 1999). Esta característica tem sido atribuída à medula óssea humana e de outros animais e, talvez por isto, a ideia de associá-la a um biomaterial seja tão frequente (SMILER & SOLTAN 2006; CERRUTI FILHO *et al.*, 2007; SAKAI *et al.*, 2008 e VADALÁ *et al.*, 2008).

As metodologias envolvendo a medula óssea como modelo para regeneração óssea podem ser resumidas em quatro tipos: utilização do seu aspirado ou uso *in natura*, concentrado do aspirado, fração de células mononucleares e isolamento e cultivo da células tronco mesenquimais adultas (YAMAMOTO *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2008; PELEGRINE *et al.*, 2014).

Neste estudo, utilizou-se o aspirado de medula óssea, em detrimento dos outros métodos, por se tratar da forma mais simples que não requer manipulação em laboratório ou em equipamentos específicos (SMILER & SOLTAN, 2006).

Em modelos experimentais, considera-se importante avaliar o uso do aspirado de medula óssea associada a técnica de regeneração óssea guiada, a qual se baseia no uso de uma barreira física (membrana) para impedir a migração dos tecidos moles durante a regeneração tecidual, melhorando a qualidade óssea no processo regenerativo, como observado nesse estudo e nos estudos de STOCKMAN *et al.* (2011). Em nosso estudo, a influência da membrana de colágeno (denominada regeneração óssea guiada) ficou evidente, uma vez que, tanto no grupo controle quanto no grupo experimental, os lados cobertos apresentaram os valores significativamente maiores de tecido mineralizado vital e valores significativamente menores de tecido não mineralizado, à semelhança de PARRISHI *et al.* (2009).

Na execução dos estudos envolvendo regeneração óssea, utilizaram-se avaliações histomorfométricas e tomográficas para a análise de regeneração óssea, de modo análogo aos estudos de BORIE *et al.* (2001) e KIM *et al.* (2012).

Nesta pesquisa, aplicou-se a histomorfometria óssea, pois é a técnica que permite quantificar áreas por meio de *softwares* baseados em fotomicrografias de lâminas histológicas. O princípio básico da histomorfometria óssea é analisar de maneira quantitativa os componentes da morfologia óssea como área e volume ocupados. Nos estudos em que foram analisados defeitos críticos de 15 mm vazios (apenas coágulo sanguíneo), verificou-se a formação de uma cicatriz fibrosa fina e flexível sobre o defeito, com pouca formação óssea apenas na margem do defeito (WOLLF *et al.*, 1994). Por este motivo, o defeito de 12mm foi aqui realizado.

Ainda neste estudo, realizaram-se defeitos críticos na calvária de coelhos, analisados após o período de oito semanas (ROBERTS *et al.*, 1987), o que se aproxima de um período de seis meses em humanos, o qual é o intervalo de tempo mais utilizado nos casos de utilização de enxertos ósseos para instalação de implantes dentais (PELEGRINE *et al.*, 2014)

Os resultados desta análise demonstraram que o defeito de 12mm também pode ser considerado crítico. A importância disso se deve ao fato de que, além de causar um dano menor ao animal, é possível com esse tamanho, realizar dois defeitos simultaneamente na calvária de um mesmo animal, sem correr o risco do extravasamento de algum material ou contato entre os defeitos, que pode ocorrer em tamanhos maiores. Isto implica uma redução direta do número de animais envolvidos na pesquisa.

O enxerto ósseo xenógeno foi utilizado em ambos os grupos experimental e controle. Este material é semelhante ao osso humano, tanto a partir de um ponto de vista químico quanto físico, e pode ser usado para substituir o enxerto ósseo autógeno em muitos casos (ANTUNES *et al.*, 2014). Porém, trata-se de um material acelular, não possuindo capacidade osteogênica ou osteoindutora, propriedades estas necessárias para um biomaterial se aproximar do enxerto autógeno.

Como era esperado no grupo controle, onde o enxerto ósseo não foi associado à medula óssea autógena, tanto a análise tomográfica quanto a análise histomorfométrica demonstraram um menor nível de tecido ósseo em relação ao grupo experimental, no qual o enxerto ósseo foi associado à medula óssea autógena. Os resultados no presente estudo, no grupo que utiliza a medula óssea autógena em defeitos ósseos interposicionais, ou seja, defeitos ósseos que possuem paredes ósseas remanescentes, corroboram os estudos de PALEY *et al.* (1986), LUCARELLI *et al.* (2004) e PELEGRINE *et al.* (2010).

Mais recentemente, os resultados das análises tomográfica e histomorfométrica demonstraram benefícios na utilização adjunta de medula óssea autógena com enxerto ósseo homólogo na reconstrução óssea aposicional, ou seja, regeneração óssea em altura e volume

sem apoio em paredes ósseas remanescentes, em humanos, permitindo a instalação de implantes dentais após seis meses (COSTA *et al.*, 2011). Isso pode ser explicado pela presença de células-tronco na medula óssea utilizada no grupo experimental, mas há outros fatores na medula óssea, que podem contribuir para a melhora destes resultados, tais como a presença de outras células e fatores de crescimento.

No presente estudo, a medula óssea foi aspirada em ambos os grupos (controle e experimental), apesar de efetivamente somente utilizá-la no grupo experimental. Este procedimento foi realizado para padronizar o nível de estresse dos coelhos nos dois grupos.

A utilização de uma membrana de colágeno como barreira demonstrou melhores resultados, frente aos grupos que não a utilizaram, confirmando os princípios da técnica de regeneração óssea guiada. No grupo experimental, em que foi usado o enxerto xenógeno associado à medula óssea, a análise tomográfica demonstrou menor nível de defeito ósseo residual.

Pela análise histomorfométrica, demonstrou-se que o uso de uma membrana de colágeno como barreira pode impedir a migração dos tecidos moles adjacentes na fase de regeneração aumentando a quantidade de tecido mineralizado vital (TMV) e diminuindo a quantidade do tecido não mineralizado (TNM). Ambos os grupos (controle e experimental) corroboram os estudos de BUSENLECHNER *et al.* (2005).

O tecido mineralizado não vital (TMNV) representa as partículas residuais do enxerto xenógeno, e foi encontrado em um padrão semelhante em todos os grupos, mostrando que, apesar da melhor formação óssea com a utilização do aspirado de medula óssea e a membrana de colágeno, o nível de reabsorção das partículas de enxerto xenógeno não foi alterado.

Isto pode ser considerado uma vantagem em muitos procedimentos nos quais a taxa de reabsorção do enxerto necessita ser mais lenta. O nível mais elevado de tecido mineralizado vital (TMV) e o nível menor de tecido não mineralizado (TNM), obtidos com o uso de membranas de colágeno e do aspirado de medula óssea enxerto foram otimizados quando ambos foram usados em conjunto, sugerindo um possível efeito sinérgico entre eles. Portanto, a utilização de medula óssea autóloga parece ter um potencial semelhante ao enxerto ósseo autógeno quando associado a um material substituto ósseo.

Em coelhos, o metabolismo do osso é aproximadamente três vezes mais rápido do que em seres humanos. Este fato justifica a eutanásia dos animais após oito semanas, no presente estudo. Os níveis mais elevados de TMV, os níveis mais baixos de TNM e a área inferior do defeito ósseo residual após oito semanas, nas áreas enxertadas com medula óssea autóloga associada à técnica de regeneração óssea guiada, sugere que o processo de regeneração é

acelerado por esta técnica e, talvez, a qualidade do processo de regeneração seja otimizada. No entanto, esta hipótese deve ser confirmada por meio de novos estudos, com um período de regeneração mais longo. Até agora, não havia nenhum estudo publicado analisando a eficácia da associação entre enxerto ósseo xenógeno e membrana de colágeno de origem porcina com o aspirado de medula óssea.

Embora o presente estudo sugira que a utilização da medula óssea autóloga e uma membrana de colágeno associadas a enxerto ósseo xenógeno apresente os níveis mais elevados de ganho ósseo após oito semanas, o potencial de outros métodos, tais como a utilização de células cultivadas provenientes de medula óssea devem ser avaliados (KIM *et al.*,2009). Os resultados obtidos nesta análise contribuem para um melhor entendimento da relação entre a utilização de enxertos ósseos xenógenos e tecidos osteo-indutores como a medula óssea, mas outros estudos serão necessários para uma compreensão mais abrangente do processo como um todo.

## **7. CONCLUSÃO**

A associação da medula óssea a um enxerto xenógeno na regeneração óssea guiada em calvária de coelhos aumentou significativamente a quantidade de tecido mineralizado vital, bem como diminuiu significativamente a quantidade de tecido não mineralizado.



## REFERÊNCIAS

- ANTUNES, A.A. et al. Comparisons between Bio-Oss(®) and Straumann(®) Bone Ceramic in immediate and staged implant placement in dogs mandible bone defects. **Clin Oral Implants Res.** v. 24, p.135-42, 2013.
- BORIE, E. et al. The influence of FDBA and autogenous bone particles on regeneration of calvaria defects in the rabbit: a pilot study. **Clin Oral Implants Res.** v.193, p. 412-7, 2001.
- BUSENLECHNER, D. et al. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin Oral Implants Res.** v. 16, p. 220–7, 2005.
- CERRUTTI FILHO, H. et al. Allogeneous bone grafts improved by bone marrow stem cells and platelet growth factors: clinical case reports. **Artif Organs.** v. 31, p. 268-73, 2007.
- CONNOLLY, J. et al. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. **J Bone Joint Surg Am.** v. 71, p. 684-91, 1989.
- CONSOLARO, A. et al. Onde devemos analisar o reparo ósseo após a colocação de enxertos particulados em cavidades ósseas cirúrgicas. **Dental Press Implantology.** v. 7, p. 30-42, 2013.
- COSTA, C.E.S. et al. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks impregnated with bone marrow aspirate: A clinical, tomographic, and histomorphometric study. **Gen Dent.** v. 59, n. 5, p. 98-103, 2011.
- CLOKIE, C.M.L. et al. Closure of Critical Sized Defects With Allogenic and Alloplastic Bone Substitutes. **J Craniofac Surg.** v.13, p. 111-21, 2002.
- DODDE, R. 2nd.; YAVUZER, R.; BIER, U.C. Spontaneous bone healing in the rabbit. **J Craniofac Surg.** v. 11, p. 346-49, 2000.
- DUAILIBI, S.E. et al. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. **J Dent Res.** v. 87, p. 745-50, 2008.
- FRAKE, J.W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg.** v. 38, p. 176-80, 1980.
- GUO, J. et al. Restoration of critical-size defects in the rabbit mandible using porous nanohydroxyapatite-polyamide scaffolds. **Tissue Eng Part A.** v. 18, p. 1239-52, 2012.
- GUPTA, D.; KHANNA, S.; TULI, S.M. Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. An experimental study. **Int Orthop.** v. 6, p. 79-85, 1982.
- HADDAD, A.J. et al. Closure of rabbit calvarial critical-sized defects using protective composite allogeneic and alloplastic bone substitutes. **Clin Oral Implants Res.** v. 17, p. 926-

34, 2006.

JENSEN, T. et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 12, p. 345-52, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIM, J. et al. Bone Regeneration in a Rabbit Critical-Sized Calvarial Model Using Tyrosine-Derived Polycarbonate Scaffolds. **Tissue Eng Part A**. v. 18, p. 1132-9, 2012.

KIM, Y.K. et al. Analysis of the healing process in sinus bone grafting using various grafting materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v.107, p. 204-11, 2009.

KOUZUMI, M.S. et al. Morbimortalidade por traumatismo crânio-encefálico no Município de São Paulo. **Aq Neuro-Psiquiatria**. v. 58, n. 1, p. 81-9, 1997.

KRUG, E.G.; SHARMA, G.K.; LOZANO, R. The global burden of injuries. **Am J Public Health**. v. 90, p. 523-6, 2000.

LUCARELLI, E. et al. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. Transfusion and Apheresis. **Science**. v. 30, p. 169–174, 2004.

MUSCHLER, G.F.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **J Bone Joint Surg Am**. v. 79, p. 1699-709, 1997.

MUSCHLER, G.F. et al. Age and gender related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors. **J Orthop Res**. v. 19, p. 117-25, 2001.

MUSCHLER, G.F.; MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clin Orthop**. v. 395, p. 66-80, 2002.

NAIR, M.K. et al. Correlation of tuned computed tomography with conventional computed tomography for evaluation of osseous healing in calvarial defects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. v. 103, n. 2, p. 267-73, 2007.

PALEY, D. et al. Percutaneous bone marrow grafting of fractures and bony defects. An experimental study in rabbits. **Clin Orthop Relat Res**. v. 208, p. 300-12, 1986.

PARRISH, L.C. et al. Non-bioabsorbable vs. bioabsorbable membrane: assessment of their clinical efficacy in guided tissue regeneration technique. A systematic review. **J Oral Sci**. v. 5, p. 383-400, 2009.

PIATTELLI, M. et al. 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**. v. 14, n. 6, p. 835-40, 1999.

PELEG, M. et al. Use of corticocancellous allogeneic bone blocks for augmentation of

alveolar bone defects. **Int J Oral Maxillofac Implants.** v. 25, p. 153-62, 2010.

PIERI, F. 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.** v. 67, p. 265-72, 2009.

PELEGRINE, A.A. et al. Clinical and histomorphometric evaluation of extraction sockets treated with an autologous bone marrow graft. **Clin Oral Impl Res.** v. 21, p. 535-42, 2010.

PELEGRINE, A.A. et al. 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.** v. 12, n. 3, p. 171-84, 2010.

PELEGRINE, A.A. et al. 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.** v. 25, p. 567-72, 2014.

PROLO, D.J.; RODRIGO, J.J. Contemporary bone graft physiology and surgery. **Clin Orthop Relat Res.** v. 200, p. 322-42, 1985.

ROBERTS, W.E. et al. Implants: Bone physiology and metabolism. **CDA J.** v. 15, p. 54-61, 1987.

SAKAI, S. et al. Concentration of bone marrow aspirate for osteogenic repair using simple centrifugal methods. **Acta Orthop.** v. 79, n. 3, p. 445-8, 2008.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res.** v. 205, p. 299-308, 1986.

SOLLAZZO, V. et al. Bio-Oss® acts on Stem cells derived from Peripheral Blood. **Oman Medical Journal.** v. 25, n. 1, p. 26-31, 2010.

SMILER, D.; SOLTAN, M. Bone marrow aspiration: technique, grafts and reports. **Implant Dent.** v. 15, p. 229-35, 2006.

STOCKMANN, P. et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells - A comparison of different tissue sources. **J Craniomaxillofac Surg.** junho, 2011. [Epub ahead of print]

SZABÓ, G. et al. A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation. **Int J Oral Maxillofac Implants.** v. 20, p. 371-81, 2005.

TAKAHASHI, T. et al. Placement of endosseous implants into bone-grafted alveolar clefts: assessment of bone bridge after autogenous particulate cancellous bone and marrow graft. **Int J Oral Maxillofac Implants.** v. 14, p. 86-93, 1999.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science.** v. 150, p. 893-9, 1965. 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 year follow – up. *Tissue Engineering: part A*. v.14, n. 10, p. 1699-1707, 2014.

VADALÀ, G. et al. Use of autologous bone marrow cells concentrate enriched with platelet-rich fibrin on corticocancellous bone allograft for posterolateral multilevel cervical fusion. *J Tissue Eng Regen Med*. v. 2, p. 515-20, 2008.

WOLFF, D.; GOLDBERG, V.M.; STEVENSON, S. Histomorphometric analysis of the repair of a segmental diaphyseal defect with ceramic and titanium fibermetal implants: effects of bone marrow. *J Orthop Res*. v. 12, p. 439-46, 1994.

WU, Y. et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. v. 25, p. 2648-59, 2007.

YAMADA, Y. et al. Injectable tissue-engineered bone using autogenous bone marrow-derived stromal cells for maxillary sinus augmentation: clinical application report from a 2-6 year follow-up. *Tissue Eng Part A*. v. 10, p. 1699-707, 2008.

YAMAMOTO, N.; FURUYA, K.; HANADA, K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for in vitro bone formation. *Biol Pharm Bull*. v. 25, p. 509-55, 2002.

ZHAO, L. et al. Comparative study between tissue-engineered periosteum and structural allograft in rabbit critical-sized radial defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. v. 97, p. 1-9, 2011.

ZIGDON, H. et al. Vertical bone augmentation using different osteoconductive scaffold combined with barrier cone in the rat calvarium. *Clin Implant Dent Relat Res*. v. 6, n. 1, p. 138-44, 2014.

**FONTES CONSULTADAS**

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].

Houaiss, A.; Villar, M. de S. *Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa*. (versão 3.0). Rio de Janeiro: Editora Objetiva, 2009. 1 CD-ROM. [consultado em 01-10-2013].

Weiszflog, W. Michaelis. *Moderno dicionário de português online*. São Paulo: Editora Melhoramentos, 2009. Disponível em <<http://michaelis.uol.com.br/moderno/ingles/index.php>>. [consultado em 01-10-2013].

## NORMAS ADOTADAS

Manual para confecção de teses do Programa de Pós Graduação em Cirurgia Translacional. Coordenadora Professora Dra. Lydia Masako Ferreira, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF, 1996, 24 p.

Consulta ao DeCs – Descritores em Ciência da Saúde. Disponível em <<http://decs.bvs.br> – Terminologia em saúde>. [consultado em 01-10-2014].

Consulta ao Mesh – Medical Subject Headings. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh> - termos/ descritores>. [consultado em 01-10-2014].

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. Guia Prático. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2008, 84 p.

## APÊNDICES

### APÊNDICE1: 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

São Paulo, 13 de janeiro de 2012  
CEP Nº: 2139/11

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): Marcelo de Oliveira e Silva

Disciplina/Departamento Cirurgia Plástica

Pesquisadores associados: Antonio Carlos Aloise, André Antonio Pelegrine, Lydia Masako Ferreira (orientadora)

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

**TÍTULO DO ESTUDO:** ENXERTO ÓSSEO XENÓGENO ASSOCIADO A MEDULA ÓSSEA IN NATURA NA REGENERAÇÃO TÍCIDUAL DE CALVÁRIA DE COELHOS :

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

**RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE:** Não se aplica

**OBJETIVO DO ESTUDO:** O objetivo deste estudo é avaliar a cicatrização óssea após o uso do biomaterial substituto ósseo bovino Bio-Oss® associado ou não ao concentrado de células da medula óssea, sendo associados ou não à membrana de colágeno bovina Bio-Gide®.

**RESUMO:** Estudo com 20 coelhos, New Zealand, machos, com 10-12 meses. Anestésico: quetamina. Analgésico: midazolam. Eutanásia: sobredose de anestésico. Serão utilizados 20 coelhos adultos brancos machos da raça Nova Zelândia, com média de peso de 4 Kg, distribuídos em dois grupos de 10 coelhos. Serão produzidos defeitos ósseos bilaterais com 15mm em diâmetro na calvária de cada animal. Nos animais do grupo 1 o Bio-Oss® será inserido em ambos defeitos e nos animais do grupo 2 o Bio-Oss® enriquecido com a medula óssea será colocado nos dois defeitos. Nos animais dos dois grupos um dos defeitos será recoberto com a membrana Bio-Gide®. Uma das tíbias dos 20 coelhos será utilizada como região doadora da medula óssea pela técnica de aspiração com auxílio de uma agulha de Osgood heparinizada. Nos animais do grupo 2 o aspirado será misturado ao Bio-Oss®. Nos coelhos do grupo 1 o aspirado não será utilizado e, portanto, descartado. Os animais serão sacrificados duas e oito semanas após a cirurgia sendo a sua calvária removida. Após fixação em formol a 10%, os espécimes serão analisados por tomografia computadorizada e, após processamento histológico, por histomorfometria.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** Os enxertos ósseos autólogos são considerados padrão-ouro em técnicas de reconstrução óssea, porém repercutem em grande morbidade pós operatória relacionada à região doadora. Com isso muitos biomateriais vêm sendo desenvolvidos mas seus potenciais ainda são considerados inferiores aos da enxertia autóloga.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo

**TCLE:** Não se aplica

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo - R\$ 13722,50

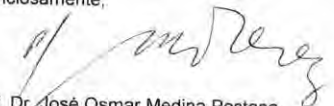
**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 18 meses

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA :** 07/01/2013 e 02/01/2014

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.

Atenciosamente,

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

## APÊNDICE 2: Artigo Publicado

Hindawi Publishing Corporation  
International Journal of Biomaterials  
Volume 2012, Article ID 170520, 7 pages  
doi:10.1155/2012/170520

## Research Article

## Xenograft Enriched with Autologous Bone Marrow in Inlay Reconstructions: A Tomographic and Histomorphometric Study in Rabbit Calvaria

Marcelo de Oliveira e Silva,<sup>1</sup> André Antonio Pelegrine,<sup>1</sup> Alexandre Alves Pinheiro da Silva,<sup>1</sup> Luiz Roberto Manhães Júnior,<sup>2</sup> Rafael de Mello e Oliveira,<sup>1</sup> Silvana Gaiba França,<sup>1</sup> Antonio Carlos Aloise,<sup>1</sup> and Lydia Masako Ferreira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Medicine School, Unifesp, Rua Pedro de Toledo, 781-11 andar, 04039-032 São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup> Unesp Dental School, 04039-032 São José dos Campos, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to Lydia Masako Ferreira, lydiamasako@gmail.com

Received 8 May 2012; Accepted 23 July 2012

Academic Editor: Gissur Örylgsson

Copyright © 2012 Marcelo de Oliveira e Silva et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Objective.** The aim of this study was to evaluate the bone healing after the usage of a scaffold enriched with bone marrow. **Study Design.** Ten rabbits were divided into 2 groups of 5 animals. Bilateral 12 mm diameter defects were created in the parietal bones. In control group Bio-Oss were inserted in both defects and, in experimental group, Bio-Oss enriched with autologous bone marrow were inserted in both defects. In these two groups, one of the calvarial defects was covered with Bio-Gide. The rabbits were sacrificed 8 weeks after surgery and both CT and histomorphometric analysis were done. **Results.** The CT showed a lower remaining defect area in the experimental group covered with Bio-Gide when compared with control group, with and without Bio-Gide. The histomorphometrics showed no difference between groups regarding the non-vital mineralized tissue area. For vital mineralized tissue area, the experimental group covered with Bio-Gide obtained a higher percentage area when compared with control group, with and without Bio-Gide. For non-mineralized tissue area, the experimental group covered with Bio-Gide obtained a lower percentage area when compared with control group, with and without Bio-Gide. **Conclusion.** Both autologous bone marrow and membrane can contribute to the enhancement of bone healing.

### 1. Introduction

Bone defects are created by different etiological factors, such as tumors, infections, and trauma. They can usually be treated with bone grafting procedures. For these situations, the autogenous bone graft is considered the gold standard [1, 2] because it has osteogenic potential [3]. However, the removal of autologous graft often presents a significant risk of postoperatively complications and morbidity [4].

A large number of bone substitute materials such as homologous, xenogeneic, and synthetic grafts are available, but also have drawbacks related to mechanical and biological properties [5].

Tissue engineering has advanced recently in an attempt to reproduce lost tissues and organs, including bone tissue.

Thus, several studies have been directed to the creation of cellular therapies protocols [6–8] in order to restore the native tissue without requiring the harvest of large autologous bone grafts.

The use of stem cells has been extensively related. Its ability to differentiate into a variety of specialized cells (producing adipose tissue, bone, cartilage, and endothelium) becomes the object of great interest in the tissue engineering field. Many studies have been reported in the literature using mesenchymal cells from bone marrow to maximize the results of bone repair [9–13]. This therapy promotes the use of a vital bone graft, with osteogenic potential, without the need of harvesting an autologous bone graft.

In order to increase the number of available osteoprogenitor cells, mesenchymal stem cells can undergo a series