

**ALLAN ZIMMERMANN**

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO  
AUTÓLOGO ASSOCIADAS A  
HIDROXIAPATITA NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA DA CALVÁRIA DE  
COELHOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**SÃO PAULO**

**2015**

**ALLAN ZIMMERMANN**

**CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO  
AUTÓLOGO ASSOCIADAS A  
HIDROXIAPATITA NA REGENERAÇÃO  
ÓSSEA GUIADA DA CALVÁRIA DE  
COELHOS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo  
para obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**ORIENTADOR:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. LYDIA MASAKO FERREIRA

**COORIENTADORES:** Prof. ANDRÉ ANTÔNIO PELEGRINE

Prof. ANTÔNIO CARLOS ALOISE

**SÃO PAULO**

**2015**

Zimmermann, Allan.

**Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo autólogo associadas a hidroxiapatita na regeneração óssea guiada da calvária de coelhos.**

/ Allan Zimmermann.

-- São Paulo, 2015.

xxi, 128f.

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

Título em inglês: Autologous adipose-derived mesenchymal stem-cells and hydroxyapatite in guided bone regeneration of rabbit calvaria.

1. Células-tronco adultas. 2. Tecido adiposo. 3. Regeneração óssea. 4. Regeneração tecidual guiada. 5. Coelhos. 6. Durapatita.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

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

**COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO**

## DEDICATÓRIA

À maravilhosa árvore, imponente, bela e florida, sobretudo de fortes raízes, minha esposa querida, Rina Andréa e, aos seus frutos, nossos amados filhos Alexandre e Raphael...

À minha mãe Enilda, pelo amor incondicional e ao meu pai Zalmino (*in memoriam*) a quem não posso pagar pelo que fizeram por mim a não ser, tentando fazer o mesmo por aqueles que amo...

Ao meu sogro Rino amigo companheiro e verdadeiro pai, que, desprezando qualquer probabilidade ou estatística, permitiu meu casamento com sua princesa. E a minha sogra Ema Dalva, sobretudo porque também concordou...

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer importante, quando não gigantesco, apoio e auxílio é tarefa inglória, pois, num trabalho longo como este, existe sempre o risco da memória nos trair. Não obstante, correndo o risco de ser injusto pela ausência, não posso deixar de ser pelo menos grato àqueles que, de uma forma ou de outra, tiveram relevante papel para que esta tese pudesse ser concluída:

**À PROF<sup>a</sup>. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA,**  
TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP),  
orientadora da presente tese, pela sua seriedade e  
comprometimento científico e, pelo seu incrível espírito  
empreendedor e de liderança que gera oportunidades não apenas  
a mim, mas também a centenas de outros profissionais  
possibilitando nosso desenvolvimento não apenas no âmbito  
científico, mas também – senão principalmente – nosso  
desenvolvimento como seres humanos.

;

Ao **PROF. Dr. MIGUEL SABINO NETO**, PROFESSOR LIVRE DOCENTE, RESPONSÁVEL PELO SETOR DE RECONSTRUÇÃO MAMÁRIA DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA DA UNIFESP, E COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela sua dedicação e disponibilidade quando precisei um verdadeiro exemplo de dedicação, ética e profissionalismo como professor, médico e pesquisador.

Ao **PROF. ANDRÉ ANTÔNIO PELEGRINE**, DOUTOR EM CIÊNCIAS MÉDICAS PELA UNICAMP, PROFESSOR DE IMPLANTODONTIA NA FACULDADE SÃO LEOPOLDO MANDIC, coorientador da presente tese, pelo acolhimento, pela amizade despretensiosa, pela excelência do seu trabalho, pelo exemplo de ética, profissionalismo, humildade e dedicação, pelo estímulo constante para que esta tese pudesse ser concretizada e, sobretudo, por seu aguçado espírito científico, sem o qual, este trabalho não poderia ter sido concluído.

Ao **PROF. ANTÔNIO CARLOS ALOISE**, DOUTOR EM CIRURGIA PLÁSTICA PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, coorientador da presente tese, pelo acolhimento, pela excelência do seu trabalho, pelo profundo conhecimento do tema, por sua dedicação e sobretudo por sua enorme paciência comigo, guiando meus passos e não permitindo que eu me perdesse nos momentos mais difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. **SILVANA GAIBA**, DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelo acolhimento, pela amizade, pelo auxílio direto no projeto e pelos valiosos ensinamentos científicos particularmente em cultivo celular

Ao Prof. **JERÔNIMO PEREIRA DE FRANÇA**, DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelo acolhimento, pela amizade e pela absoluta disposição em sempre nos passar valiosos ensinamentos científicos. Um verdadeiro poço de sabedoria e humildade.

Ao Dr. **RAFAEL DE MELLO E OLIVEIRA**, MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE PELA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelo gigantesco auxílio em todas as etapas deste projeto e, porque, embora tão jovem, tenha tido a capacidade de me ensinar muitas coisas, da ciência e da vida.



Ao colega NEUROCIRURGIÃO E COORDENADOR DO SERVIÇO DO HOSPITAL SÃO VICENTE DE PAULO, DR. **DÊNIS ISAO UEOKA**, não apenas pela valiosa e importantíssima cobertura em todos os períodos em que precisei estar ausente da equipe, mas também, pela grande amizade, profissionalismo e profunda capacidade de liderança que foram também pilares fundamentais para que este trabalho se concretizasse.

Aos colegas NEUROCIRURGIÕES, Drs, **DIEGO DAIBERT, GUSTAV LEBRÃO, IGOR NOIA STROHER, MARIO ALBERTO SANTANA MACHADO FILHO** e aos “quase” neurocirurgiões **MATEUS PADEIRO, BREITNER LOUSADA LUCIO, ANDRÉ TELES DE MATTOS, HEBER MARTIN, KARINA RUIZ E RAMON JUNQUEIRA** e, especialmente, aos Drs, **ANDERSON RODRIGO SOUZA, MARCOS ROGÉRIO RAMOS, RICARDO VALEJO GUTIERREZ** e **VALDIR ESCHIAVANO** pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência e pela não menos importante cobertura nos períodos em que tive que estar distante da equipe.

Às Srtas. **PRISCILA SELES** e **JOELMA PUERTAS DIAS** minhas secretárias, pelo apoio, amizade e incentivo,

**AOS PROFESSORES** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP pelas críticas construtivas e sugestões apresentadas.

**AOS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP e, especialmente aos Drs. **ANDRÉ PIRES DE FREITAS** e **MARCELO MELO SOARES** pelas dicas sugestões e orientações.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo, **MARTA REJANE DOS REIS SILVA, SANDRA DA SILVA E SILVANA APARECIDA COSTA** pela atenção, consideração e profissionalismo.

A todos que nos auxiliaram e que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

**“Só se pode saber se algo será descoberto pela  
experimentação,  
não pelo argumento.**

*Francis Bacon*

*1561-1626*

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b>	<b>vi</b>
<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xv</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xviii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xxi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>5</b>
<b>3. LITERATURA</b>	<b>7</b>
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>76</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	<b>99</b>
<b>8. CONCLUSÃO</b>	<b>101</b>
<b>9. REFERÊNCIAS</b>	<b>103</b>
<b>NORMAS ADOTADAS</b>	<b>116</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>118</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>120</b>
<b>FONTES CONSULTADAS</b>	<b>126</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 01	Bio-Oss	<b>43</b>
Figura 02	Bio-Gide	<b>43</b>
Figura 03	Procedimento Anestésico	<b>45</b>
Figura 04	Incisão para Lipectomia	<b>46</b>
Figura 05	Exposição do Tecido Adiposo	<b>47</b>
Figura 06	Fragmento de Tecido Adiposo Coletado após Pesagem	<b>47</b>
Figura 07	Cultura Primária de CTM-Adp	<b>51</b>
Figura 08	Diferenciação Adipogênica	<b>53</b>
Figura 09	Diferenciação Osteogênica	<b>55</b>
Figura 10	Diferenciação Condrogênica	<b>57</b>
Figura 11	Monitorização da Temperatura Retal	<b>60</b>
Figura 12	Pontos de Referência para Incisão na Cabeça	<b>61</b>
Figura 13	Incisão com Exposição do Perióstio	<b>62</b>

Figura 14	Incisão do Periósteeo e Exposição do Crânio	<b>63</b>
Figura 15	Pontos de Referência para Craniectomias	<b>64</b>
Figura 16	Início da Craniectomia	<b>65</b>
Figura 17	Craniectomia	<b>66</b>
Figura 18	Fragmentos Prontos para Retirada Preservadas as Suturas	<b>66</b>
Figura 19	Craniectomias após Retirada da Dura-Máter	<b>67</b>
Figura 20	Defeitos Ósseos Preenchidos por Hidroxiapatita	<b>68</b>
Figura 21	Defeito Ósseo Coberto com Membrana Colágena	<b>69</b>
Figura 22	Espécimes Retirados	<b>72</b>
Figura 23	Histomorfometria	<b>74</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Imunofenotipagem	<b>58</b>
Tabela 2	Resultados em porcentagem de cada tecido	<b>78</b>
Tabela 3	Medidas de Histomorfometria GC <i>vs</i> GE para TMV, TMNV e TNM	<b>79</b>
Tabela 4	Medidas de Histomorfometria em porcentagem no GC com membrana e sem membrana	<b>80</b>
Tabela 5	Medidas de Histomorfometria em porcentagem no GE com membrana e sem membrana	<b>80</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS

Kg	Kilograma
mg	Miligramma
µg	Microgramma
cm	Centímetro
mm	Milímetro
ml	Mililitro
l	Litro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
cm <sup>2</sup>	Centímetros Quadrados
cm <sup>3</sup>	Centímetros Cúbicos
°C	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
µmol	Micromolar
min	Minuto
nmol	Nanomolar
ng	Nanogramma
mol	Molar (Mol)
NaCl	Cloreto de Sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
µ	Micron



$H_0$	Hipótese Nula
$Na_2HPO_3$	Fosfato Dissódico Hidrogenado
$KH_2PO_4$	Fosfato Monobásico de Potássio
UI	Unidades Internacionais

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINH	Antiinflamatório não Hormonal
ANA	Analgésico
APC	<i>Allophycocyanin</i>
ATB	Antibiótico
BC	Bifosfato de Cálcio
BMP	<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C/M	Com Membrana
CFE	Colônia Formadora de Fibroblastos
CPLA	Células do Processado Lipoaspirado
CT	Células-Tronco
CTA	Células-Tronco Adultas
CTDM	Células-Tronco Derivadas da Dura-Máter
CTE	Células-Tronco Embrionárias
CTM	Células-Tronco Mesenquimais
CTM-Adp	Células-Tronco Mesenquimais Derivadas do Tecido Adiposo
CTMO	Células-Tronco Mesenquimais Derivadas da Medula Óssea
DP	Desvio Padrão

DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium + Nutrient F12 Mixture</i>
e-PTFE	Politetrafluoretileno expandido
EO	Enxertia Óssea
FA	Fosfatase Alcalina
FEV	Fração Estromal Vascular
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
GC	Grupo Controle
GE	Grupo Experimento
GVHD	<i>Graft-Versus-Host Disease</i>
HA	Hidroxiapatita
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IM	Por via Intramuscular
IP	Por via Intraperitoneal
IV	Por via Intravenosa
MEC	Matriz Extracelular
MO	Medula Óssea
NK	<i>Natural Killer Cell</i>
OII	Óbito Indolor Induzido
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PLA	Ácido Poliláctico
PLGA	<i>Polylactic-co-Glicolitic Acid</i>

PRP	Plasma Rico em Plaquetas
RO	Regeneração Óssea
ROG	Regeneração Óssea Guiada
RTG	Regeneração Tecidual Guiada
S/M	Sem Membrana
SC	Por via Subcutânea
SF	Soro Fisiológico (Solução de NaCl a 0,9%)
SFB	Soro Fetal Bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
TA	Tecido Adiposo
TGF- $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1-</i>
TLR	<i>Tool Like Receptor</i>
TMNV	Tecido Mineralizado Não Vital
TMV	Tecido Mineralizado Vital
TNM	Tecido Não Mineralizado
VB	Vidro Bioativo
VO	Por via Oral
$\beta$ -TCP	Beta Tricálcio Fosfato

## RESUMO

**Introdução:** Os biomateriais utilizados habitualmente em regeneração óssea não possuem potencial osteogênico e osteoindutivo, apesar de possuírem potencial osteocondutivo.

**Objetivo:** Avaliar a associação entre células-tronco mesenquimais do tecido adiposo autólogo (CTM-TAA) e hidroxiapatita na regeneração óssea guiada da calvária de coelhos.

**Métodos:** CTM-TAA de seis animais foram associadas à hidroxiapatita e implantadas nas perdas ósseas pós-craniectomias de 12mm criadas bilateralmente na calvária de seis coelhos (grupo experimento - GE). No grupo controle (GC) o material de enxertia foi utilizado sem células. Em cada animal, uma das áreas de perda óssea foi coberta por uma membrana colágena. Após oito semanas os animais foram submetidos a óbito indolor induzido e a região das falhas ósseas avaliadas por histomorfometria.

**Resultados:** O GE apresentou maior quantidade ( $p < 0,05$ ) do tecido mineralizado vital e não vital ( $17,0\% \pm 5,3\%$  e  $25,9\% \pm 4,6\%$ , respectivamente) comparado ao GC ( $9,8\% \pm 5,0\%$  e  $13,3\% \pm 2,3\%$ , respectivamente). No GE nenhuma diferença foi observada entre os lados em que foram ou não utilizada as membranas colágenas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, uma diferença estatisticamente significativa foi observada para GC ( $p < 0,05$ ) relativamente à quantidade de tecido mineralizado vital no lado em que a membrana foi utilizadas.

**Conclusão:** A associação entre CTM-TAA de coelhos e hidroxiapatita de origem bovina foi capaz de promover uma maior regeneração óssea da calvária de coelhos. O uso de membrana colágena de origem porcina não foi capaz de promover maior regeneração óssea do que o uso células-tronco associadas ao enxerto xenógeno.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

O enxerto de osso autólogo pode ser obtido principalmente, mas não somente, da crista do osso ilíaco, costelas e calvária. Ocorre que, infelizmente, o acesso a este tecido é limitado e associado a alguma morbidade como, por exemplo, dor, hemorragia, infecção na região doadora, ou, ainda, a diversas outras complicações menos frequentes. Considerada a gravidade das consequências do enxerto autólogo, particularmente as relativas à obtenção do material, outras formas de tratamento dos defeitos ósseos críticos devem ser pesquisadas (JENSEN *et al.* 2012). Os enxertos ósseos homólogos, xenólogos e aloplásticos não são tão efetivos quanto os autólogos, em parte por suas características físicas e químicas (KESSLER *et al.* 2007), mas, principalmente, pelo fato de serem acelulares (PELEGRINE *et al.* 2010). Todavia, em que pese ser o osso autólogo o padrão ouro em enxertia óssea (EO), GRANT *et al.* (2004), sustentaram que reconstrução das falhas ósseas cranianas em crianças com a utilização de osso autólogo é associada a altas taxas de reabsorção óssea e que, este método deve ser reavaliado porque acaba por gerar uma alta taxa de reoperação na população pediátrica.

Como em defeitos ósseos críticos a utilização de substitutos ósseos repercute em déficit celular no interior

da falha óssea, uma alternativa plausível seria a incorporação de células com potencial osteogênico. O sucesso de um enxerto depende da presença de células no enxerto, particularmente do subconjunto de células-tronco e progenitoras que tenham capacidade de gerar novos tecidos (MUSCHLER & MIDURA 2002). Neste sentido, a escolha da fonte celular que poderia mais eficientemente se diferenciar em tecido ósseo seria o primeiro e mais importante passo para a terapia de regeneração das grandes falhas ósseas. Muitos tipos celulares possuem potencial para ser utilizados como componentes celulares em EO e dentre eles estão os osteoblastos, células-tronco embrionárias (CTE) e, células-tronco mesenquimais (CTM). As CTM possuem algumas características que as tornam apropriadas para o uso em EO como, por exemplo, facilidade de obtenção do tecido *in vivo* e facilidade de isolamento e expansão *ex vivo*.

É grande o potencial das Células-Tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo (CTM-Adp). A facilidade de coleta e a grande quantidade de células que podem ser obtidas, de 100 até 1000 vezes mais do que a quantidade obtida da medula óssea, pelo menos em teoria, permite imaginar que, para uso corrente, não seria necessária cultivo para expansão celular – ao contrário do que obrigatoriamente teria que ocorrer com células da Medula Óssea (MO) para alcançar-se um número de células satisfatório utilizável em alguma terapia. Assim sendo, futuramente, estas células poderiam ser utilizadas praticamente à beira



do leito (LENDECK *et al.* 2004; MOSELEY *et al.* 2006).

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) é um mecanismo terapêutico que visa impedir a invasão celular na região de perda óssea que necessita ser cicatrizada utilizando-se uma membrana para este fim. O fundamento teórico reside no princípio de que a área de interesse deve ser protegida da invasão de populações celulares não osteogênicas (particularmente fibroblastos), permitindo que a população celular osteogênica invada, a partir das paredes ósseas, a região a ser ossificada (RETZEPI & DONUS, 2010).

Um estudo envolvendo a associação de CTM-Adp a biomateriais substitutos de enxertos autólogos poderia contribuir para uma maior eficiência da terapia quando utilizados em defeitos ósseos críticos porque, mesmo com importantes avanços na EO, um substituto ideal para o osso autólogo ainda não está disponível e desta forma, a utilização de modelos animais para que se continue a busca por um substituto adequado é plenamente justificável.

## **2. OBJETIVO**

## **2. OBJETIVO**

Avaliar a regeneração óssea guiada da calvária de coelhos com uso de hidroxiapatita e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo autólogo.

### **3. LITERATURA**

### 3. LITERATURA

BECMEUR *et al.* (1990) numa revisão da história do politetrafluoretileno (e-PTFE), lembraram que sua descoberta ocorreu em 1938, porém os estudos de biocompatibilidade só tiveram início em 1950. O Teflon® tem diversas propriedades que o tornam ideal para uso biológico: ele é quimicamente inerte, têm resistência a quase todos os produtos químicos (é utilizado para transportar ácido sulfúrico), é biologicamente inerte (resiste a ataques microbianos e enzimáticos), tem grande estabilidade térmica (podendo ser esterilizado) e se decompõe em temperaturas acima de 450°C. O e-PTFE tem um coeficiente de fricção muito baixo, equivalente a dois cubos de gelo passando um sobre o outro. Por outro lado é pouco resistente à radiação ionizante que pode transformá-lo em pasta ou líquido. Por estes motivos, até a última década do século XX, o e-PTFE era o material mais utilizado como membrana em Regeneração Óssea Guiada (ROG).

LUNDGREN *et al.* (1992) num estudo piloto com dois coelhos, conseguiram uma completa cicatrização óssea de defeitos na calvária, utilizando trepanações de 8mm num período observacional de seis semanas. Utilizaram duas membranas biodegradáveis, não porosas, de ácido polilático (PLA),

uma cobrindo a face interna da falha óssea e outra cobrindo a face externa, sem que nenhum material fosse enxertado no local. Em outra trepanação nenhuma membrana foi utilizada e o defeito ósseo foi totalmente preenchido apenas por tecido mole fibrocicatricial enquanto na última trepanação de cada animal foi utilizada apenas membrana externa e houve preenchimento parcial a partir das bordas do defeito sem que o centro fosse preenchido. Foi o primeiro estudo em ROG que não utilizou e-PTFE e relataram que as principais vantagens seria a ausência de colapso do e-PTFE para dentro do defeito ósseo e a desnecessidade de uma segunda intervenção cirúrgica.

HÄMMERLE *et al.* (1992) avaliaram a ROG na calvária de coelhos. Os autores demonstraram num estudo piloto que havia melhora na regeneração óssea da calvária de coelhos utilizando e-PTFE (GORE-Tex®) em um defeito de 8mm comparativamente ao uso apenas do periósteo para cobertura da falha óssea de mesma medida no outro animal, preservando a dura-máter de ambos num período observacional de três meses. A região de perda óssea protegida pela membrana cicatrizou completamente o que levou os autores a inferirem que a dura-máter devesse ter um papel na regeneração óssea porque verificaram a formação de ilhotas de osso *novo* lamelar.

SCHMID *et al.* (1994) defenderam que a permeabilidade da membrana não é pré-requisito para a ROG. Utilizando um *drill*, desgastaram a calvárias de coelhos até expor a *diploe* implantando neste local cilindros de titânio que foram

fechados com tampa de titânio (grupo controle) ou apenas cobertos com e-PTFE em 4 diferentes configurações de porosidades (grupo experimento). Após oito meses todos os cilindros estavam igualmente preenchidos por osso além de medula óssea e vasos sanguíneos.

HÄMMERLE *et al.* (1995) avaliaram em quatro coelhos a dinâmica temporal da regeneração óssea, também com e-PTFE, realizando experimentos em defeitos de 15mm, com manutenção da dura-máter e exclusão do periósteo. Relataram que uma falha óssea se regenera inicialmente pelas bordas ósseas e posteriormente se formam ilhotas ósseas no centro do defeito. Os autores atribuíram esta formação ao coágulo que preenche o espaço protegido pela membrana de e-PTFE e, como isolaram o periósteo, defenderam que este não tem papel relevante na Regeneração Óssea (RO). Também asseguraram que o conceito de que um defeito de 15mm é incapaz de se regenerar sozinho (defeito crítico) na calvária de coelhos, não se aplica aos casos em que se utiliza a técnica de ROG.

PIATELLI *et al.* (1999) realizaram biópsias de 20 pacientes que haviam sido submetidos à expansão óssea para implante dentários, sendo que oito pacientes foram biopsiados após seis meses do implante; seis após nove meses; três após 18 meses e três após 4 anos. Após seis meses ainda se distinguiu claramente as partículas de Bio-Oss® do osso neoformado,

com presença de alguns capilares sem um *gap* entre as partículas de Bio-Oss® e o osso neoformado. Aos nove meses os achados eram similares, mas já com presença de células mesenquimais. Aos 18 meses havia menor quantidade de Bio-Oss® sem infiltrado inflamatório com todos os canais de Harvers formados por *osso novo*. Nos espécimes avaliados após quatro anos, havia osteoclastos em processo de reabsorção das partículas de hidroxiapatita e células gigantes multinucleadas circundando as partículas. Os autores concluíram que o Bio-Oss® é bastante biocompatível, além de bom osteocondutor e se integra facilmente e totalmente ao osso neoformado. Afirmaram já àquela ocasião, que o produto havia sido testado em mais de 15 ensaios randomizados registrados na Cochrane Library sendo então um dos mais bem documentados materiais. Ainda segundo os autores, o que motivou o estudo foi a existência de controvérsias quanto à capacidade de reabsorção, ou, mais precisamente, se o enxerto mineralizado é verdadeiramente absorvido.

DODDE II *et al.* (2000) provocaram falhas ósseas de cinco, dez e 15mm em calvárias de coelhos e num estudo observacional de nove meses concluíram que apenas o defeito de 15mm pode ser considerado crítico.



ZUK *et al.* (2001) pela primeira vez, isolaram células-tronco do tecido adiposo, demonstrando ser este tecido rica fonte de células-tronco, na época denominadas de células do processado lipospirado. O protocolo para isolamento de Células-Tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-Adp) consistia basicamente em fragmentação do tecido adiposo, lavagem com Tampão Fosfato Salino (PBS; do inglês *Phosphate Buffered Saline*) para remover células sanguíneas e anestésico local, digestão com Colagenase a 0,075% em temperatura de 37°C por 30 minutos. A seguir a Colagenase era inativada utilizando-se igual volume de Meio de Eagle modificado por Dullbecco (DMEM; do inglês *Dullbecco's modified Eagle medium*) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e centrifugado a 1200g por 10min para obtenção de uma Fração Vascular Estromal (FVE) de alta densidade. O infranadante é centrifugado a 250g por 10min para obtenção de um *pellet* de alta densidade. O *pellet* era ressuspendido em 160mM de NH<sub>4</sub>Cl e incubado em temperatura ambiente por 10min e depois filtrado num filtro de nylon com poros de 100µm para remover os debris celulares. A seguir era adicionado meio DMEM suplementado com SFB, antibióticos e antimicótico a 1% e colocado em placas de cultura de 100mm contendo 1x10<sup>6</sup> células. Estas células eram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% em temperatura de 37°C por uma noite. Depois os frascos eram extensivamente lavados com água destilada para retirada de células não aderentes ao plástico e as células aderidas ao plástico tinham morfologia de fibroblastos

e potencial de diferenciação em diversas linhagens. Este grupo celular foi denominado pelos autores de Células do Processado Lipoaspirado (PLA). Estas células foram cultivadas até a 13ª passagem (cerca de 165 dias). Já na primeira passagem as células foram submetidas à diferenciação; a) Adipogênica, com uso de 0,5mM de isobutyl-methylxanthine, 1µM de dexametasona, 10 µM de insulina, 200µM de indometacina e 1% de antibióticos; b) Osteogênica, com uso de 0,1µM de dexametasona, 50µM de ácido ascórbico, 10µM de betaglicerofosfato e 1% de antibióticos; c) Condrogênica, com uso de 6,25µg/ml de insulina, 10ng/ml de TGF- β1, 50nM de ácido ascórbico e 1% de antibióticos; d) Miogênica, com uso de 0,1µM de dexametasona, 50 µM de hidrocortisona e 1% de antibióticos.

ZUK *et al.* (2002), após o trabalho pioneiro demonstrando a presença de CT no tecido adiposo em 2001, compararam a expressão antigênica das CTMO com aquelas do, denominado à época, “Células do Processado Lipoaspirado”, obtidas a partir do processamento de células obtidas de lipoaspirados. Os autores testaram não apenas as CTM-Adp comparativamente às CTMO como também induziram as células à diferenciação osteogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica e neurogênica. Consideraram grande a similaridade fenotípica entre elas, e advogaram seu uso em substituição às CTMO.

De UGARTE *et al.* (2003) avaliaram o tecido adiposo (TA) e a medula óssea (MO) coletados de cinco pacientes que foram submetidos à artroplastia de quadril com idades variando entre 7-71 anos (média de 50 anos). Os autores observaram que a quantidade de células estromais aderentes ao plástico era semelhante, todavia, alertaram que a experiência com grandes quantidades de MO envolvidas em transplante de MO revelou que há uma grande contaminação por células do sangue total, ou seja, 1000ml de MO contém pelo menos 100 vezes menos CTM do que 10ml, enquanto as células do PLA não sofriam este efeito de diluição. As CTM-Adp têm maior capacidade proliferativa do que as CTMO e a mesma capacidade de diferenciação mediante estímulos apropriados. Esta grande diferença pode ser observada numa situação em que, para se obter a confluência no frasco num período de 5-7 dias, é preciso uma quantidade que varia entre 20.000 até 400.000 células frescas da medula óssea por centímetro quadrado. Esta mesma confluência podia ser obtida no mesmo prazo, utilizando-se apenas 3500 células do tecido adiposo.

HÄMMERLE & JUNG (2003) sustentaram que as membranas colágenas se mostraram bastante eficientes na RO e são de fácil manipulação comparativamente ao e-PTFE porque este não permanecia com o formato desejado e se deslocava muito facilmente do local de reparação óssea, além, é claro, da necessidade de um segundo ato operatório para retirar a membrana. Por outro lado, as membranas colágenas tinham o

problema da rápida degradação e perda da resistência, muitas vezes antes que ocorresse a regeneração óssea completa, dificultando a regeneração, pois as células indesejadas passavam a invadir o local da lesão. Isto porque, quando colocados num ambiente aquoso como num organismo vivo, os polímeros biodegradáveis passam por quatro fases: 1) hidratação; 2) perda da resistência mecânica; 3) perda integridade estrutural e, 4) solubilização pelos fagócitos. A duração de cada fase depende da natureza do polímero, do pH, da temperatura, e do volume utilizado. Neste sentido, consideraram que a grande variabilidade na duração da absorção das membranas utilizadas em ROG, leva a que o processo de RO não possa ser estritamente controlado, uma vez que velocidades diferentes de reabsorção acabam por interferir na regeneração óssea. Os autores advertiram que e-PTFE vem perdendo espaço na clínica diária, porém, considerados os problemas de absorção inconstante relativo às membranas absorvíveis, o e-PTFE ainda deveria ser considerado o padrão ouro com o qual os resultados dos demais procedimentos devam ser comparados.

HICOK *et al.* (2004) coletaram tecido adiposo de três voluntárias (abdome e coxas) e após processamento, submeteram as CTM-Adp à cultura e avaliaram em três, sete e 14 dias a expressão da Fosfatase Alcalina (FA) bem como a impregnação por Alizarina Vermelha. Depois semearam estas células em

cubos de Hidroxiapatita (HA), Beta-Tricálcio Fosfato ( $\beta$ -TCP) ou em cola de fibrina e implantaram do dorso de camundongos. Implantaram também arcabouços acelulares (para controle) e arcabouços com *human fetal derived osteoblasts* (FOB 1.19). Após seis semanas avaliaram os enxertos e concluíram que: a) nenhum tecido osteóide se formou no grupo controle; b) No grupo que utilizou FOB 1.19 100% das células geraram osteóide; c) houve importante formação de osteóide no grupo enxertado com CTM-Adp, particularmente no grupo HA e  $\beta$ -TCP (80%), enquanto no grupo que utilizou *Collagraft*® houve pouca formação (20%). As células com diferenciação osteogênica, foram avaliadas quanto aos marcadores de superfície e demonstraram ter características de células humanas. Para tanto utilizaram um anticorpo monoclonal (MAB1281), um *anti human nuclear antigen*. O potencial de diferenciação osteoblástica *in vitro* estava bem definido àquela época, porém, os autores demonstraram este potencial *in vivo* quando as células eram carregadas num arcabouço de HA e  $\beta$ -TCP. Todavia, o mais importante foi a demonstração de que as CTM-Adp de origem humana, eram responsáveis elas mesmas pela formação do osteóide, afastando a hipótese de que as CTM-Adp tivessem um papel meramente “regulador” do recrutamento das células osteogênicas dos roedores.

LENDECK *et al.* (2004) diante de um quadro grave de perda óssea pós traumatismo cranioencefálico (TCE) em uma criança de sete anos, sendo impossível obter osso autólogo suficiente, retiraram osso da crista ilíaca e o associaram a cola de fibrina (autóloga) e Células do Processado Lipoaspirado (PLA) da região glútea da própria paciente. No mesmo ato foi colhido o enxerto ósseo autólogo da crista ilíaca e o tecido gorduroso que foi processado para obtenção do PLA contendo células-tronco (CT) a partir do protocolo proposto por Zuk e colegas (2001), cujo preparo despendeu aproximadamente duas horas. A seguir foram implantados nas diversas lesões e, em seis semanas, havia formação óssea suficiente para liberar a criança do uso do capacete que havia utilizado ao longo do último ano, demonstrando a factibilidade do procedimento com tecido adiposo, o que, segundo os autores, teria sido difícil de conseguir com células derivadas da medula óssea (MO) pela escassez das mesmas na MO, considerado o grande defeito a ser coberto (120 cm<sup>2</sup>).

STREM *et al.* (2005) revisando a literatura, lembram que o tecido adiposo (TA) branco em adultos tem capacidade de expandir-se e encolher por toda a vida de um indivíduo e que, esta capacidade é mediada pela presença neste tecido de células vasculares e não vasculares que fornecem um *pool* de células progenitoras e CT com potencial de regeneração “único”. Esta população celular compartilha diversas características daquelas que se obtém da MO: potencial de grande e fácil expansão

*in vitro* e habilidade em se diferenciar em células de multilinhagens. Lembraram ainda que as CTM-Adp têm habilidade para se diferenciar em células de linhagem mesenquimal, porém, não apenas em tecidos de linhagem mesenquimal (osso, cartilagem, gordura e músculos), mas, também, em tecidos de linhagem não mesenquimal como nervos e vasos sanguíneos, fenômeno este definido como transdiferenciação. Anotaram ainda os autores, que a quantidade de CT obtidas da medula óssea é, na maioria das vezes, algo entre 1:25.000 a 1:100.000 células, ou seja, na prática, num ser humano em condições de anestesia local consegue-se no máximo 40ml de MO, o que gera cerca de  $1,2 \times 10^9$  células nucleadas e, destas, se consegue aproximadamente  $2,4 \times 10^4$  CT. Num adulto, também sob anestesia local, consegue-se facilmente 200ml de TA, com resultado de  $2 \times 10^8$  células nucleadas para cada 100ml de tecido aspirado. Nesta linha, 200ml de tecido adiposo aspirado, resultam em  $1 \times 10^6$  CT, uma diferença de 40 vezes em favor do TA. Além disto, considerado justamente o fato de que a coleta da MO tem limitações em volume, para obter-se um determinado número de células em condições terapêuticas (CTMO), é preciso aumentar o tempo de cultura.

DOMICINI *et al.* (2006) relataram os critérios que a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs para definir as CTM: Aderência ao plástico em cultura de células isoladas, expressão de CD105, CD73 e CD90 em mais de 95% da cultura e a perda de expressão dos marcadores CD34, CD45,

CD14 ou CD11b, CD79 $\alpha$  ou CD19 e HLA Classe II (não mais que 2% da cultura) e, ainda, capacidade de diferenciação *in vitro* das CTM em osteoblasto, condroblasto e adipoblasto em condições de cultura padronizadas. A diferenciação osteoblástica pode ser demonstrada com coloração por Alizarina Vermelha ou corante de von Kossa, a adipoblástica por *Oil Red O*. E, a condroblástica pela coloração com Azul de Alcian. Os autores afirmaram na ocasião que futuramente novos marcadores poderiam ser recomendados. Além da positividade dos marcadores sugeridos, mais importante foi considerar a obrigatória negatividade de alguns marcadores particularmente de origem hematopoiética como CD45 (um marcador panleucocitário), CD34 (que marca células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais) CD14 ou CD11b (que se expressam em monócitos e macrófagos) e CD79 ou CD19 $\alpha$  (que se expressam nas células B). Relativamente aos marcadores de macrófagos e células B, a SITC considera como suficiente a testagem de apenas um dos marcadores.

PEPTAN *et al.* (2006) investigaram o potencial osteogênico de células estromais derivadas de diferentes regiões de TA de seis coelhos da raça Nova Zelândia. O material foi colhido através de uma incisão na região epigástrica a partir da qual foi colhido TA subcutâneo (outros *loci* não foram avaliados) e, por esta abertura foi colhida gordura visceral. Anotaram que há uma maior capacidade de multiplicação das células do tecido adiposo subcutâneo e, em contrapartida, estas tem



menor potencial osteogênico, o que foi avaliado pela expressão de FA, osteocalcina e, também, pela quantidade de matriz mineral depositada (utilizaram como corante a tintura de von Kossa). Atribuem este fato à maior vascularização da gordura visceral (que facilitaria de algum modo a diferenciação osteogênica) e explicaram o menor potencial osteogênico das células do tecido subcutâneo pelo fato de existir aí, grande quantidade de fibroblastos que atuariam como “inibidores” da osteodiferenciação. Interessante neste trabalho foi a demonstração de que a partir do 28º dia em cultura, as células oriundas da gordura visceral ainda apresentavam importante atividade osteogênica ao passo que aquelas cultivadas a partir da gordura do subcutâneo praticamente não apresentavam mais esta atividade.

NIEMEYER *et al.* (2007) compararam as propriedades imunológicas das CTMO e CTM-Adp antes e após a diferenciação osteogênica. Avaliaram os principais marcadores de superfície (entre eles CD13, CD29, CD44, CD73, Cd90, CD105 e CD166) além dos complexos de histocompatibilidade classe I e classe II (HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 e CD40 entre outros). As células foram cultivadas em dois grupos para cada tipo de CT: um grupo submetido à diferenciação osteogênica e outro mantido apenas em cultura. Posteriormente foram cocultivadas com células da fração mononuclear do sangue periférico. Concluíram que as propriedades fenotípicas e moleculares são bastante semelhantes entre ambas e que

mesmo após a diferenciação a expressão imunológica não se altera e, ainda, que o efeito de proliferação-inibição sobre os linfócitos persiste, pelo menos até o 14º dia de diferenciação quando começa a ser produzida a matriz extracelular (MEC). Os autores relatam que as propriedades imunossupressoras das CTMO já eram conhecidas e que não dependem de contato célula-célula com os linfócitos, propondo que algum solúvel seja o responsável por esta inibição (talvez uma prostaglandina como IL-10, interferon gamma ou fator de crescimento de hepatócitos e expressão da indoleamina 2,3-deioigenase). Há uma relação celular para que ocorra esta inibição, sendo de uma CT para cada 10 células mononucleares. Os autores concluíram que as CTM-Adp também são imunoprivilegiadas e podem ser utilizadas para terapias em pacientes com HLA incompatível, tanto antes quanto depois da diferenciação celular (osteogênica). Alertaram, todavia, que este estudo precisa ser confirmado previamente *in vivo*, embora no tocante às CTMO isto já tenha sido feito e bem demonstrado que são células imunoprivilegiadas. Os autores definem como imunoprivilegiadas as células que têm efeito supressor sobre linfócitos maximamente estimulados por efeitos alogênico.

TAPP *et al.* (2009) comparando CTM-Adp e CTMO, não encontraram nenhuma diferença importante entre elas avaliando os 29 marcadores de superfície mais citados na literatura. Ressaltam que é importante lembrar que até o momento, não há

nenhum marcador capaz de discriminar de modo determinante estas células ou de promover uma diferenciação entre CT oriundas da gordura, da medula ou fibroblastos. Não obstante, afirmaram os autores que, ainda que exista muita semelhança entre estes três tipos de células, como diversos marcadores de superfície em comum e mesmo alguma capacidade de diferenciação dos fibroblastos, estes podem ser caracterizados mediante extensiva avaliação que revelaria diversas diferenças funcionais entre os fibroblastos e as CTM-Adp ou CTMO.

BOHNENBLUST *et al.* (2009), utilizaram tecido adiposo colhido da região inguinal de ratos buscando verificar se a utilização de osso cadavérico (alógeno) associado a CTM-Adp era mais eficaz do que a simples utilização do osso. Acreditando na necessidade de colocar uma população de células osteogênicas no enxerto, colheram o tecido adiposo dos ratos e imediatamente após retiraram o fragmento ósseo da calvária dos ratos (8mm), processando o tecido adiposo para obtenção de CT que foram cultivadas e submetidas à diferenciação osteogênica. Concomitantemente o fragmento ósseo retirado foi submetido à esterilização e descelularização por três semanas. As células diferenciadas foram cultivadas no arcabouço dos “ossos cadavéricos” por seis dias e reimplantadas com e sem utilização de cola de fibrina nas calvárias, sendo que cada animal recebeu suas próprias CTM-Adp cultivadas num osso cadavérico randomicamente escolhido. Um grupo controle recebeu apenas

“osso cadavérico” e outro grupo recebeu cola de fibrina com as células diferenciadas sem osso. Em dois animais os defeitos não foram preenchidos. Os cinco grupos (OC, OC+CTM-AdpOD, OC+CTM-AdpOD+CF, CTM-AdpOD+CF e defeitos ósseos vazios) foram avaliados após seis semanas por avaliação histológica com corante de von Kossa e microtomografias. Os grupos OC e OC+CTM-AdpOD tiveram neoformação óssea bem superior, com densidade verificada por tomografia comparativamente aos demais grupos, todavia, sem diferença entre eles. Não obstante tenha o “osso cadavérico” sido associado às CTM-Adp já com diferenciação osteogênica, não houve diferença entre o uso deste arcabouço celularizado ou de um arcabouço sozinho. Os autores atribuíram este fato a um eventual curto período observacional (seis semanas) ou a uma quantidade baixa de CTM-AdpOD, sugerindo que novos estudos devam ser feitos para elucidar esta ausência de diferença.

KIM *et al.* (2009) estudaram a absorção óssea em calvária de coelhos e utilizaram 36 animais, avaliados em três fases diferentes (dois, quatro e seis meses) sendo 12 animais em cada fase que foram divididos em três grupos de quatro animais para avaliação. Utilizaram uma membrana dupla no enxerto autólogo (Bio-Gide® - Geistlich, Switzerland) como forma de diminuir a reabsorção óssea. Realizaram craniectomias com trefina de 5,25mm de diâmetro interno e normalizaram estes fragmentos para 1,5mm de espessura. A seguir fixaram com parafuso este fragmento retirado de um osso parietal (direito) no

osso parietal esquerdo com ou sem interposição de uma ou duas membranas conforme o grupo avaliado (C, M1 e M2). Avaliaram o resultado em dois, quatro e seis meses e concluíram que a utilização de uma camada dupla de membrana colágena é mais eficaz do que a camada simples, isto porque, a membrana frequentemente degenera antes da completa reparação óssea e permite que as células indesejadas, ainda que tardiamente, invadam a região da lesão e dificultem o reparo ósseo. Também concluíram que a eficácia de um enxerto autólogo pode ser melhorada com o uso de membrana dupla, uma vez que nos grupos com membrana (particularmente no de membrana dupla) houve completa incorporação do enxerto ósseo.

PELEGRINE *et al.* (2010) demonstraram que a utilização de células hematopoiéticas sem um substrato é ineficaz na regeneração óssea, provando ser inútil a técnica (à época empírica) de utilizar-se coágulo sanguíneo para promover regeneração óssea.

MAZZETTI *et al.* (2010) avaliaram a região dorso-cervical de coelho como fonte de CTM-Adp. Obtiveram um rendimento celular total de  $1,62 \times 10^6$  células/ml com 98% de viabilidade (avaliada pelo azul de Trypan). Após 20 dias de cultivo, na primeira passagem foram quantificadas  $2,88 \times 10^6$  células/ml e na segunda passagem (após mais 20 dias)  $4,28 \times 10^6$  células/ml foram obtidas, levando os autores a concluírem que a coleta de tecido por explante desta região é uma excelente

alternativa para obtenção de CTM-Adp em coelhos Nova Zelândia.

NIEMEYER *et al.* (2010) avaliaram a neosteogênese em defeitos críticos em tíbia de ovelhas, comparando CTMO com CTM-Adp e CTM-Adp associadas a Plasma Rico em Plaquetas (PRP). Relataram que nenhuma diferença foi observada entre o grupo controle (vazio) e o grupo que utilizou CTM-Adp em contraste com grande quantidade de *osso novo* verificada no grupo que utilizou CTMO. No grupo em que as CTM-Adp foram associadas ao PRP houve diferença significativa na formação de osso, embora com resultados inferiores aos obtidos com as CTMO. Notaram também que diversas CTM-Adp se diferenciaram espontaneamente em adipócitos, inferindo que estas células têm a adipogênese como “destino” enquanto as CTMO têm a osteogênese. Os autores não questionaram se o PRP “estimula” as CTM-Adp ou se o efeito obtido foi apenas pelo uso do PRP. Concluíram que as CTM-Adp são inferiores às CTMO relativamente ao potencial osteogênico. Para minimizar esta diferença, o acréscimo de PRP ao *pool* de CTM-Adp foi mais eficaz e, inferiram que, desse modo, a regeneração óssea era equivalente, ou seja, que esta diferença de resultados poderia ser compensada pela simples adição de PRP às CTM-Adp. Com um *n* de cinco animais em cada grupo, as ovelhas foram avaliadas radiologicamente a cada duas semanas por 26 semanas e ao final os espécimes foram submetidos à avaliação histomorfométrica. Os autores afirmaram ainda que há na literatura muita

controvérsia acerca da eficácia ou não do uso de PRP em RO. Não obstante, criticaram trabalhos feitos em outros modelos de animais “menores” - particularmente em coelhos - afirmando que estes animais têm uma grande capacidade de RO o que, na opinião dos autores, faz com que os defeitos ósseos estudados não sejam na verdade “críticos”, mas apenas “defeitos parciais”.

ZINS *et al.* (2010) lembraram que logo no início de 1980 ficou demonstrado que o osso do crânio (membranoso) mantinha seu volume significativamente maior do que ossos de costela ou crista ilíaca (endocondral) quando utilizados em cranioplastias. Os autores fizeram diversas cranioplastias utilizando “fatias” do próprio crânio para a cranioplastia ou material aloplástico principalmente  $\beta$ TCP. Os autores advertiram que quando utilizaram materiais como  $\beta$ TCP as taxas de complicações foram maiores e por isto acreditam que este material não deva ser utilizado em grandes cranioplastias. Nesta situação, sugeriram que se deva utilizar osso autólogo do próprio crânio do paciente.

SOHN *et al.* (2010) buscaram determinar a medida mínima para que um defeito na calvária de coelhos pudesse ser considerado crítico. Para tanto utilizaram 32 coelhos da raça Nova Zelândia divididos em dois grupos, um com craniectomias de 6mm, 8mm e 11mm em cada crânio e outro com craniectomias (única) de 15mm. Estes animais foram avaliados numa evolução de duas, quatro, oito e 12 semanas. Os autores concluíram que o tamanho do defeito a ser utilizado depende da proposta do experimento. Um período de duas a quatro semanas

pode ser utilizado para avaliar as fases precoces de regeneração óssea, a estabilidade de materiais e a reação enxerto-hospedeiro, enquanto um período de oito semanas seria mais adequado para avaliar a regeneração tardia como a incorporação do enxerto ao osso, a reabsorção de material de enxerto a remodelação óssea e a quantidade de regeneração óssea. Para ser considerado crítico, um defeito não pode sofrer regeneração espontânea sem qualquer tipo de tratamento ou, menos de 10% de regeneração pode ser vista ao longo da vida do animal. O defeito de 15mm não cicatrizou espontaneamente num período observacional de 12 semanas. Não obstante, os autores encontraram neste prazo uma regeneração óssea superior a 20%, o que impediu que este defeito, por não atender os critérios de “defeito crítico”, pudesse ser considerado como tal. Neste estudo, a área de *osso novo* após 12 semanas não diferiu significativamente entre as falhas ósseas de 11mm e 15mm. Sugeriram que diversos tipos de estudo possam utilizar dois defeitos simétricos de 11mm em cada lado da cabeça que poderiam atender diversos modelos experimentais com a vantagem comparativa de duas situações no mesmo animal. Advertiram ainda os autores que neste tipo de craniectomia a dura-máter pode ser muito facilmente lesada. Consequentemente optaram por remover a dura-máter de todos os defeitos de modo a obter resultados consistentes. O perióstio por outro lado, foi consistentemente suturado para impedir a entrada de tecidos moles adjacentes. Recomendaram que cada defeito seja escolhido



em acordo com o experimento que se pretende e que o manejo de perióstio e dura-máter sejam padronizados.

LEVI *et al.* (2011) demonstraram que as CTM-Adp só são capazes de promover a RO num relativamente curto período após a agressão óssea. Para tanto, injetaram CTM-Adp humanas e de camundongos, cultivadas até a segunda passagem em defeitos de 4mm criados na calvária de camundongos imediatamente após as craniectomias e, em outro grupo, repetiram o procedimento após oito semanas das craniectomias, mantendo um grupo controle. No grupo em que as CTM-Adp foram imediatamente injetadas, houve maciça regeneração óssea enquanto no grupo controle (vazio) nenhuma regeneração foi observada. Após oito semanas, o grupo vazio foi submetido à reoperação e retirados os tecidos moles (as trepanações mantiveram o mesmo diâmetro de 4mm) e injetaram as CTM-Adp. Após mais oito semanas quase nenhuma formação óssea pôde ser observada. Os autores concluíram que é de suma importância este conhecimento porque frequentemente em cirurgia plástica e reconstrutiva, os pacientes são recebidos para correções ósseas meses após um trauma ou retirada de um câncer. Como substrato para as CTM-Adp foi utilizado o PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid). As avaliações foram feitas com microtomografias sequenciais e análises histológicas, além da avaliação cromossômica para certificação de que as células no local tinham um cariótipo XX humano (o tecido adiposo foi colhido de doadoras). Foram avaliadas as expressões de BMP-2, BMP-4 e BMP-7 tanto nos casos agudos como nos “crônicos”

e estas expressões estavam acentuadamente reduzidas nos casos “crônicos”. Na quarta semana esta expressão já estava acentuadamente reduzida. Mesmo quando uma “reagressão” local foi testada, estas BMPs não voltaram a ter expressão significativa pelo que deduziram que para que ocorra regeneração óssea mediada por CTM-Adp é preciso que exista a via sinalizatória e que esta via, só é desencadeada nas fases agudas da agressão.

SMITH *et al*, (2011) testaram CTM-Adp oriundas de tecido adiposo colhido da região interescapular de coelhos Nova Zelândia na reparação óssea de calvária de coelhos em defeitos de 15x15mm. Realizaram o estudo com cinco grupos: craniectomia vazia; preenchida por esponja de colágeno acelular (derivada de tendão de Aquiles bovino); BMP2 e esponja de colágeno; CTM-Adp com a mesma esponja de colágeno e CTM-Adp já osteoinduzidas na esponja de colágeno. Os autores afirmaram que houve diferença apenas no grupo em que a BMP2 foi utilizada e que as CTM-Adp ainda não provaram sua eficácia. Comentaram ainda que em grandes defeitos, apenas a BMP-2 é eficaz, todavia seriam necessárias enormes quantidades da mesma o que inviabilizaria economicamente o procedimento. Afirmaram finalmente que a dura-máter perde seu potencial osteogênico em humanos por volta dos dois anos de idade e este fato justifica a busca por novos métodos de cranioplastia.

ROKN *et al.* (2011) utilizaram quatro trepanações de 6,5mm na calvária de coelhos, buscando comparar as propriedades osteogênicas de três substitutos ósseos comumente utilizados e compararam o uso de HA (Bio-Oss® com partículas entre 250µM e 1000µM) com um fosfato bifásico de cálcio (Straumann Bone Ceramic® - SBC). Utilizaram um grupo com Bio Oss®, outro com L-SBC (*large* SBC) com partículas entre 500µM e 1000µM, outro com S-SBC (*small* SBC) com partículas entre 400µM e 700µM e, numa avaliação histomorfométrica, após quatro e oito semanas não encontraram diferenças estatísticas na quantidade de osso regenerado. Referiram apenas que há uma maior reação inflamatória no grupo L-SBC.

ROKN *et al.* (2012) avaliaram comparativamente HA (Bio Oss®) e βTCP. Para tanto, utilizaram seis animais e realizaram três trepanações de 6mm em cada animal, utilizando a seguir enxertos em dois dos defeitos com os materiais testados, deixando o terceiro defeito da calvária dos coelhos sem preenchimento. Após 30 dias avaliaram resultados por histomorfometria quanto à quantidade de osso novo e material residual e não encontraram diferenças estatísticas nem na quantidade de osso novo presente nem na quantidade de material residual, num ou noutro grupo. Relataram, todavia que havia uma maior quantidade de infiltrado inflamatório no grupo βTCP.

CHEN *et al.* (2012) avaliaram as CTM-Adp obtidas de três diferentes regiões em coelhos Nova Zelândia: tecido

adiposo subcutâneo dorso-cervical, inguinal e tecido adiposo retroperitoneal perinefrético. Os autores criticaram os diversos estudos existentes em humanos quanto à ausência de metodologias adequadamente padronizadas para que se pudesse investigar melhor o comportamento das CTM-Adp oriundas de diferentes locais em humanos. Encontraram uma maior taxa de proliferação celular e potencial de diferenciação osteogênica nas células obtidas do tecido subcutâneo inguinal ou dorsal com superioridade estatística em favor do tecido subcutâneo da região inguinal. Verificaram também, que há uma diferença comportamental das células oriundas de diferentes locais de mesmo indivíduo e, também, entre diferentes indivíduos quando avaliados os mesmos locais de coleta. Sugeriram que isto se deva a diferentes origens embrionárias, particularmente relativamente ao tecido adiposo subcutâneo cuja origem é mesodérmica e o retroperitoneal que tem origem em diversas camadas embrionárias.

GAIBA *et al.* (2012) publicaram um protocolo de cultura, isolamento e cultivo de CTM-Adp a partir de tecido gorduroso humano de doadores saudáveis. Também provocaram a diferenciação celular (adipogênica, condrogênica e osteogênica) e utilizaram a imunofenotipagem para caracterização das CTM-Adp. Neste estudo não foi avaliado o CD14 substituído pelo CD16.

TIRKKONEN *et al.* (2013) avaliaram a diferenciação osteogênica a partir de CTM-Adp humanas em modelos 3D.

Compararam a utilização de meio osteogênico padrão (dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato e o meio de manutenção celular (DMEN/F12 suplementado com SFB, L-glutamina e antibióticos) isoladamente ou associados a BMP-2, BMP-7 e VEGF em arcabouços de Vidro Bioativo (VB) - (BioRestore®) e grânulos de Bifosfato de Cálcio (BC; BoneCeramic®). Concluíram que a utilização de BMP-2 e VEGF em nada melhora a capacidade de diferenciação osteogênica no modelo 3D e, pior, que a BMP-7 consistentemente inibe a diferenciação osteogênica. Os autores propõem que a utilização isolada do meio osteogênico ainda é muito superior e que a literatura há algum tempo vem questionando a eficácia das BMPs. O meio osteogênico isolado foi capaz de render um maior número de células com VB, em contrapartida, no experimento com BC houve uma maior quantidade de colágeno produzido. A maior indução do meio osteogênico foi verificada pela grande expressão da FA. Este achado, na opinião dos autores, contradisse frontalmente a crença de que BMPs devam ser associadas às CTM-Adps ou utilizadas isoladamente nos arcabouços utilizados, até porque, têm meia-vida curta, são caras e necessárias em grandes doses, com consequências ainda desconhecidas, pois, dependendo da dose utilizada, podem simplesmente promover efeitos indesejados como induzir a reabsorção óssea ou provocar ossificação heterotópica.

PENTEADO *et al.* (2013) testaram o uso de VB - uma cerâmica com óxido de silício associado a PRP na calvária de

10 coelhos. Os láparos foram separados em dois grupos e trepanações de 8mm foram realizadas em cada osso parietal com posterior preenchimento com coágulo ou VB num grupo e PRP ou VB associado a PRP no outro. Realizaram controles radiológicos semanais e, histológico após 12 semanas de cicatrização dos defeitos criados. Ao final deste período, nenhum defeito preenchido com coágulo estava totalmente preenchido e por este motivo estes defeitos foram considerados críticos. Quanto aos demais grupos, houve um aumento na regeneração óssea dos grupos tratados com PRP (sem diferença entre eles), sugerindo que o PRP carreando fatores de crescimento como PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, IGF-I entre outros seja de fundamental importância para estimular a diferenciação osteogênica local. Outra constatação deste trabalho foi a de que o VB sozinho foi incapaz de promover qualquer tipo de regeneração óssea provavelmente pela ausência de células ou dos fatores de crescimento.

OLIVEIRA *et al.* (2013) utilizaram apenas gordura em defeitos críticos na calvária de coelhos (15mm). Os animais foram divididos em dois grupos (com ou sem utilização de gordura) e em três subgrupos que foram induzidos a óbito em sete, 14 e 40 dias após o procedimento cirúrgico. Nenhuma diferença quanto ao depósito de tecido mineral foi observada com sete dias. Todavia aos 15 e 40 dias, o grupo controle apresentava grande infiltração de fibroblastos com depósito de colágeno e aos 40 dias havia uma reação inflamatória crônica.

Nenhuma falha óssea foi completamente preenchida, mas, podia-se observar alguma deposição óssea nas margens destas. Por outro lado, no grupo em que as falhas ósseas foram preenchidas com gordura, após 14 dias havia uma quantidade de *osso novo* significativamente maior e, embora nenhuma falha houvesse sido completamente preenchida após 40 dias, a quantidade de *osso novo* era significativamente maior com áreas de depósito de matriz osteóide, fragmentos de *osso novo* já maduro e, também, em alguns espécimes, foi observada matriz óssea formando os canais de Harvesian. Os autores levantaram a hipótese de que não apenas as CT presentes no TA pudessem ter sofrido diferenciação osteogênica, mas, também, que os próprios adipócitos pudessem ter sofrido uma transdiferenciação. Afirmaram ser interessante o fato de que se possa utilizar apenas gordura na cicatrização óssea sem nenhum tipo de processamento.

PELEGRINE *et al.* (2014) observaram que a associação de células, tanto da MO fresca como da fração mononuclear da medula, (esta com melhores resultados), foi capaz de melhorar a formação de osso em defeitos críticos na calvária de coelhos (utilizaram duas trepanações parietais de 12mm em cada animal), comparativamente ao uso de arcabouço acelular (HA). Este achado corroborou a hipótese de que qualquer arcabouço utilizado em RO necessita de células para uma cicatrização eficaz. Os autores também utilizaram membrana biodegradável para proteger um dos lados dos defeitos criados e relataram que

o uso de membrana tem um efeito sinérgico na neoformação óssea. Os autores também demonstraram que um defeito de 12mm na calvária de coelhos da raça Nova Zelândia é considerado crítico após uma observação de oito semanas, ou seja, neste prazo, sem nenhum tratamento adjuvante, o defeito é incapaz de regenerar sozinho.

LINERO & CHAPARRO (2014) propuseram que os efeitos parácrinos das CTM-Adp sejam tão ou mais relevantes do que as próprias CTM-Adp na regeneração óssea. Realizaram um experimento em mandíbulas de coelhos avaliando radiograficamente os efeitos de um hidrogel preparado a partir de plasma humano associado a CTM-Adp humanas cultivadas, ou, a um meio condicionado. Este meio foi preparado a partir da sexta passagem da cultura de células que foram lavadas com PBS e submetidas à centrifugação, após o que o conteúdo acelular foi filtrado em um filtro de 220nm numa seringa. Este meio foi testado quanto à presença de 43 proteínas humanas (incluindo citocinas, fatores de crescimento, proteases, etc) utilizando o *Human Angiogenesis Antibody Array*. Nas mandíbulas foram criados defeitos de 10mm e preenchidos com hidrogel ou, hidrogel associado a CTM-Adp, cuja avaliação radiográfica e histomorfométrica foi feita sucessivamente em 15, 30, 45 e 60 dias. Concluíram que a regeneração óssea obtida entre os grupos foi similar. Além disto, alguns animais foram sacrificados nos dias terceiro, sexto, 9º e 12º do experimento para que as células implantadas pudessem ter sua quantidade mensurada. Isto



foi feito com anticorpos contra  $\beta 2$  microglobulina. Nos primeiros três dias, as CTM-Adp permaneciam no local de implante, mas já no sexto dia a quantidade caiu drasticamente e no 12º dia nenhuma CTM-Adp foi detectada, corroborando a hipótese da importância dos efeitos parácrinos das mesmas.

GU *et al.* (2014), colheram TA de coelhos e promoveram a cultura das CTM-Adp com posterior diferenciação osteogênica. As células foram avaliadas por citometria de fluxo e quanto à sua capacidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Depois disto implantaram as células na ulna de coelhos, ( $n=10$  divididos em dois grupos de cinco cada) em arcabouços de matriz óssea desmineralizada produzido a partir de ossos de coelhos, em defeitos de 15mm de extensão.

Concomitantemente avaliaram a resposta imunogênica dos animais comparando a relação em sangue periférico dos CD4/CD8 nos dias zero (que serviu de avaliação basal), primeiro, terceiro, quinto, sétimo e 14º. Também dosaram o conteúdo sérico da Interleucina 2 (IL-2), Interleucina 4 (IL-4) e Interferon Lambda (INF- $\lambda$ ). Nenhuma atividade imunológica foi detectada nos animais após o implante. Paralelamente, mantiveram em cultura as CTM-Adp pelo mesmo prazo em que avaliaram a diferenciação osteogênica (14 dias) e, utilizando uma avaliação por MLR (Mixed Lymphocyte Reaction Assays), associaram estas células à células mononucleares do sangue periférico dos animais. Isto foi feito em várias concentrações de CTM-Adp e de CTM-Adp já sob diferenciação osteogênica (avaliada

por Fostatase Alcalina e coloração por Alizarina Vermelha). Utilizaram em diversos poços concentrações que variavam de  $10^2$  até  $10^5$  células de cada grupo e encontraram uma relação direta entre a quantidade de células e a inibição da multiplicação das células mononucleares. Este trabalho demonstrou que as células quando ainda em incompleta diferenciação, mantém o mesmo comportamento imunológico das CTM-Adp, antevendo que no futuro estas células possam estar à disposição para uso clínico sem necessidade de coleta do material do próprio paciente, cujo processamento é dispendioso e consome um elevado tempo intraoperatório.

ALOISE *et al.* (2015) compararam a RO em calvária de coelhos utilizando a técnica de ROG. Utilizaram três grupos de seis coelhos cada, o primeiro grupo (Grupo Teste - GT) com a utilização de HA bovina concomitantemente a CTMO cultivadas, o segundo grupo com osso autólogo puro (Grupo Controle Positivo - GCP) e o terceiro grupo, com apenas HA (Grupo Controle Negativo; GCN) utilizando em todos os animais, de forma randômica, uma membrana colágena em um dos lados das craniectomias realizadas (cada animal teve duas craniectomias de 12mm, uma em cada osso parietal). Encontraram igualdade estatística na quantidade de tecido mineralizado nos grupos GT e GCP e, considerado o fato de que a utilização de osso autólogo ainda é o padrão ouro em regeneração óssea, atribuíram o resultado às CTMO cultivadas. Além disto, demonstraram que no grupo em que as CTMO foram utilizadas, o uso de

barreira mecânica não propiciou uma maior quantidade de tecido mineralizado vital ou não vital na calvária dos coelhos, inferindo que este efeito se deva ao fato de que as CTMO exerçam um papel de “barreira” contra as células indesejadas; todavia não uma barreira física e sim uma barreira fisiológica. Desta forma, sugeriram que mais estudos fossem realizados para elucidar o papel das CT atuando como barreiras.

KIM *et al.* (2015) testaram em calvária de coelhos o Fosfato Bifásico de Cálcio sozinho ou associado a BMP-2, ou, a uma associação de ambos mais CTMO. Os resultados foram avaliados por microtomografia e histologia em quatro e oito semanas. Encontraram importante diferença em favor do último grupo sugerindo que as CTMO necessitem da BMP-2 para promover uma melhor regeneração óssea, particularmente nas fases mais precoces.

## **4. MÉTODOS**

## 4. MÉTODOS

### 4.1 - DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente estudo é primário, intervencional, experimental, prospectivo, analítico, controlado, aleatorizado e realizado em centro único.

### 4.2 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo sob número 314/12 em 29 de novembro de 2012 (**Anexo 1**).

### 4.3 AMOSTRA

Foram utilizados 12 coelhos machos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia. Os animais, oriundos do biotério central da UNIFESP, tiveram um período de adaptação de 21 dias, sendo acompanhados por veterinário responsável. As dependências do biotério estão de acordo com as normas da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008.

Uma vez recebidos, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais numeradas de 1 a 12 e alocadas em sala com temperatura controlada, mantida em 20°C, ciclo luminoso de 12 horas, foram alimentados com ração comercial peletizada própria para coelhos (Ração Coelhoão, Sítio Guabi, Além Paraíba, Minas Gerais, Brasil) e tiveram à disposição água *ad libitum*.

Neste estudo, cada animal recebeu uma numeração idêntica à da gaiola em que foi acondicionado.

#### 4.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Coelhos machos, adultos, com peso entre 3,5 e 4,0 Kg e idade entre 10 a 12 meses, da Raça Nova Zelândia, considerados saudáveis pelo veterinário responsável.

#### 4.3.2 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Presença de qualquer doença ou distúrbio de comportamento que pudesse acarretar risco ao animal como anorexia ou agitação psicomotora detectável no período de adaptação.

#### 4.3.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Infecção detectável de qualquer etiologia, incluso o sítio operatório, distúrbio do comportamento capaz de comprometer o

processo de cicatrização como por exemplo anorexia ou traumatismos por agitação psicomotora ou, morte do animal antes da conclusão do experimento.

#### **4.4 MATERIAIS**

Foram utilizados neste estudo, os seguintes materiais:

- 1)** Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Substituto ósseo xenógeno particulado. Origem bovina (**Figura 1; Anexo 2**)
- 2)** Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Membrana de Colágeno. Origem porcina (**Figura 2; Anexo 3**).



**Figura 1.** Bio-Oss (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Hidroxiapatita de origem bovina. Foto: Material de Divulgação Bio-Oss.



**Figura 2.** Bio-Gide (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Membrana de Colágeno de origem porcina. Foto: Material de Divulgação Bio-Gide.



## 4.5 PROCEDIMENTOS

### 4.5.1 RETIRADA DO TECIDO ADIPOSEO

Após o período de adaptação, a retirada de tecido gorduroso de cada animal foi feita por meio de uma incisão na região dorsal.

Os animais foram anestesiados, via intramuscular (IM), com uso de Quetamina 40mg/kg, (Dopalen<sup>®</sup> Laboratório Ceva, Paulinia, Brasil) mais Citrato de Fentanila 0,8µg/kg (Fentanest<sup>®</sup> Laboratório Cristália, Itapira, Brasil) e Midazolam 2mg/kg (Dormire<sup>®</sup> Laboratório Cristália, Itapira, Brasil).

Todos os animais foram mantidos com máscara facial e oxigênio com fluxo de 2l/min. Além disto, Isoflurano (Forane<sup>®</sup> Laboratório Abbott, Belo Horizonte, Brasil) estava disponível em vaporizador universal para utilização através da máscara facial caso o procedimento cirúrgico se estendesse e fosse necessária a utilização de anestesia além do previsto (**Figura 3**).

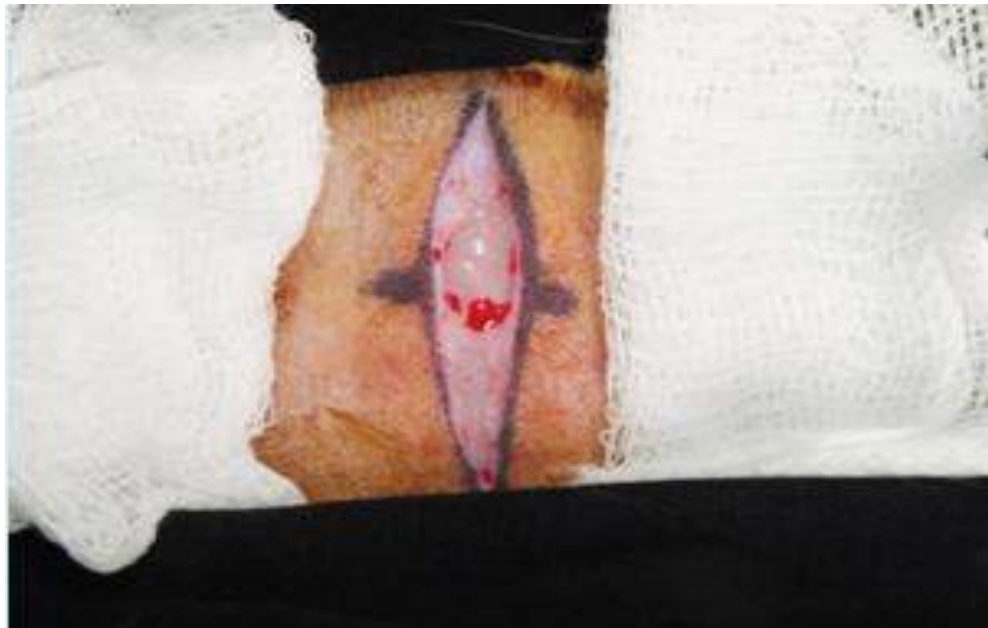


**Figura 3.** Procedimento anestésico.

Após a anestesia foi realizada uma tricotomia com lâmina 1 (3mm) com tricótomo elétrico Wahl® (Johannesburg, África do Sul) no dorso dos animais desde a região nucal até uma região cerca de 2cm abaixo de uma linha que une os ângulos inferiores das escápulas dos animais. Em seguida, foi feita a marcação de dois pontos de referência na linha média entre as escápulas, limitados superiormente pelo encontro de uma linha unindo os ângulos superiores das escápulas e inferiormente por uma linha unindo os ângulos inferiores das mesmas, delimitando o local de uma incisão na linha média com aproximadamente 3cm de extensão.

Foi feita uma limpeza da região com álcool 70% seguida de antissepsia com Iodopovidona Solução Degermante 10% e Iodopovidona Solução Alcoólica 10% (Laboratório Natulab, Curitiba, Brasil).

A incisão foi realizada com bisturi lâmina 11 (**Figura 4**) e, em seguida realizada a divulsão dos tecidos até expor o Tecido Adiposo (TA) subjacente (**Figura 5**) que foi dissecado e cortado.



**Figura 4.** Incisão cutânea para abordagem da gordura interescapular.



**Figura 5.** Exposição do Tecido Adiposo.



**Figura 6.** Fragmento de tecido adiposo a ser acondicionado no frasco para transporte ao laboratório.

Quando necessária, a hemostasia foi realizada no leito cirúrgico com a utilização apenas de compressão com gaze embebida em Soro Fisiológico (SF). A síntese da incisão cirúrgica foi feita por sutura simples com cinco pontos separados em um plano apenas, utilizando-se mononylon 4-0 Ethicon® (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil). A ferida operatória foi então higienizada com SF e um curativo simples com gaze embebida em Iodopovidona Alcoólica 10% foi feito em cada animal.

Cada fragmento de TA retirado foi pesado e, em média, pesaram entre 2g a 3g (Balança Marte AS1000C São Paulo Brasil), tendo sido acondicionados a seguir em um tubo Falcon BD de 15ml estéril (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA) que foi numerado especificamente para cada animal no biotério. O meio utilizado para transporte do fragmento até o laboratório foi o PBS (**Figura 6**).

No laboratório, cada fragmento foi processado para posterior cultivo das CTM-Adp. O processamento do tecido e a cultura celular foram realizados no Laboratório de Células da disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo coordenado pela Prof<sup>a</sup> Lydia Masako Ferreira.

Os animais foram então reencaminhados às suas gaiolas individuais e medicados com anti-inflamatórios, analgésicos e antibióticos. Neste estudo foi utilizado no período pós-operatório Cefazolina Sódica 30mg/kg (Kefazol<sup>®</sup>, Laboratório ABL,

Cosmópolis, Brasil) de 12 em 12 horas IM por três dias; Flunixin Metaglumina (1mg/kg) (Bananime Pet<sup>®</sup>, Laboratório MSD, Cruzeiro, Brasil) de 24 em 24 horas por três dias IM; Cloridrato de Tramadol 2mg/kg (Tramal<sup>®</sup>, Laboratório Pfizer, Guarulhos, Brasil) de oito em oito horas IM por 24 horas. Cada ferida cirúrgica foi higienizada duas vezes ao dia com SF 0,9% e Iodopovidona Alcoólica por três dias.

Os animais receberam ração peletizada e água *ad libitum* até a realização das craniectomias. Os pontos de sutura foram retirados no sétimo dia de pós-operatório.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo próprio pesquisador.

#### 4.5.2 – ISOLAMENTO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO.

O tecido adiposo foi processado em cabine de fluxo laminar (Class IIA B3, Forma Scientific Modelo Pa400 Pachane Biotecnologia, Piracicaba, Brasil), na qual o tubo contendo a gordura foi aberto e o conteúdo transferido para um outro tubo cônico Falcon<sup>®</sup> de 15ml , (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA) com auxílio de uma pinça, procedendo-se a lavagem com 8ml de solução tamponada salina PBS acrescida de solução antibiótica e fungicida (A5955, Sigma Aldrich Co, Missouri, USA). A solução utilizada, própria para cultura celular, contém em cada ml, 10.000UI de Penicilina, 10mg de Estreptomicina, 25µg de Anfotericina B e é solubilizada em

um tampão citrato (pH 6,0). O processo de lavagem manual com auxílio de uma pinça, foi repetido por seis vezes.

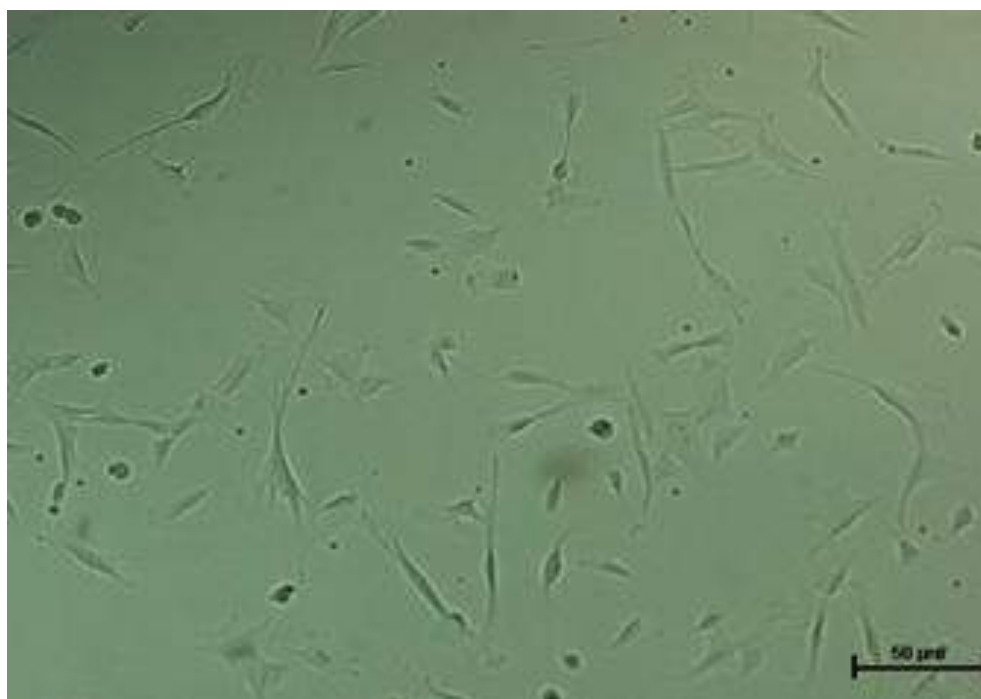
A peça de gordura foi então fragmentada com o auxílio de tesoura de Metzenbaum curva e pinça Adson serrilhada em uma placa de Petri de 60 mm. A seguir os fragmentos de gordura foram transferidos da placa de Petri para outro tubo cônico tipo Falcon<sup>®</sup> BD, de 15 ml e uma solução de Colagenase II (17101-015 - GIBCO, Life Technologies, USA) na concentração de 1mg/ml com aproximadamente duas vezes o volume dos fragmentos foi acrescida ao tubo. O tubo então foi levado a um vórtex (Agitador Orbital Tecnal TE 420) a 37°C por 30min. Após isto, o tubo foi centrifugado a 300g (Centrífuga modelo 206BL, Fanem, São Paulo, Brasil) por 10min. O sobrenadante (adipócitos maduros) foi desprezado e o *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado em 15ml de meio de cultura M/F12 (D2906 - Sigma Aldrich Co, Missouri, USA) com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, Brasil). O total da solução foi inserido em frasco de cultura de células (Frasco de Roux de 75cm<sup>2</sup> - Corning Inc., USA) e levado a incubadora a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até 80% da confluência de cada frasco de cultura, quando então foi realizada a primeira passagem e assim sucessivamente. O período médio de cultivo foi de 18 dias, e as células utilizadas estavam entre a terceira e quarta passagem.

Foram utilizadas  $1,0 \times 10^6$  células em cada animal. Estas foram tripsinizadas, contadas e acondicionadas em 1ml em tubos

Eppendorf® (Eppendorf, Hamburgo, Germany).

#### 4.5.3 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO

As células cultivadas (**Figura 7**) foram submetidas a ensaios de diferenciação e imunofenotipagem com o objetivo de verificar se atendiam os requisitos propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC).



**Figura 7.** Cultura Primária de Células-Tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo (CTM-Adp).



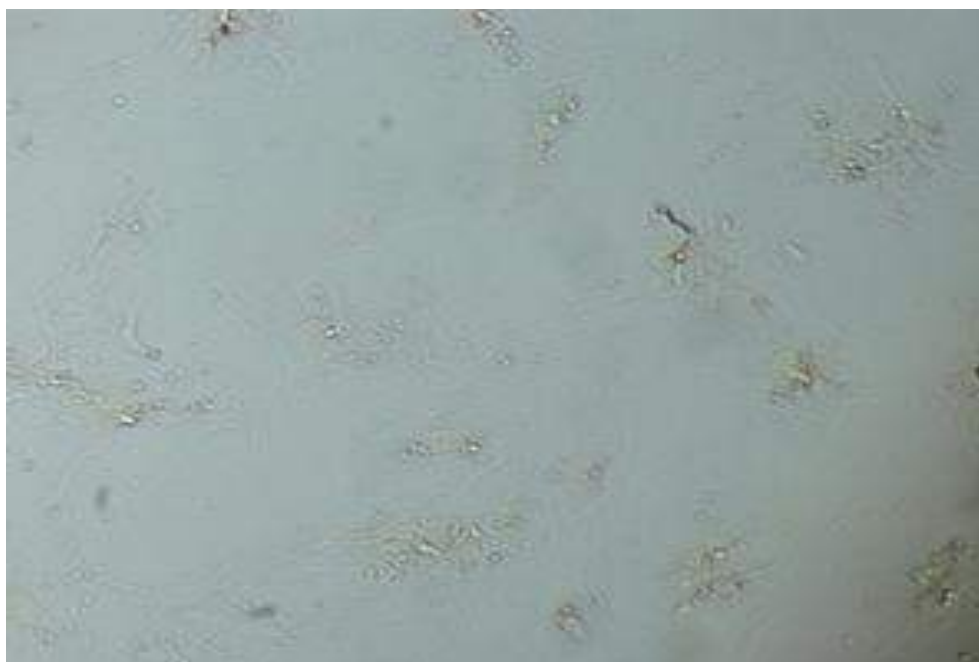
Para realizar os ensaios de diferenciação, as células foram cultivadas em placas de cultura de poliestireno de alta transparência com seis poços. (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schaffhausen, Switzerland).

#### 4.5.3.a DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Para promover a diferenciação adipogênica, as células foram subcultivadas em placas de seis poços com 2ml de DMEM/F12 suplementado com 10 $\mu$ M insulina humana regular recombinante (HUMULIN<sup>®</sup> R; Lilly France, Fegersheim, France) e 1 $\mu$ M de Dexametasona (Biossintética-Aché, São Paulo, Brasil) por 15 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida (Forma Scientific CO Water Jacketed Incubator Series II) a 37°C numa atmosfera com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio utilizado foi trocado a cada três dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após, foram utilizados 2ml de uma solução fixadora de Paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania, USA). Depois de mais 30min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS sendo que na primeira vez foram lavadas em PBS contendo 0,1mol/L de glicina por 10min e nas duas vezes seguintes apenas em PBS por 2min.

Posteriormente, as células foram incubadas com corante *Oil Red O* 0,5% (Sigma Aldrich, Missouri, USA) em

temperatura ambiente por 30min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2ml e as células na placa foram lavadas cinco vezes com 2ml de água destilada para retirar o corante não ligado. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio óptico Nikon Ti-U e fotografada (**Figura 8**) com a utilização do Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, New York, EUA).



**Figura 8.** Diferenciação Adipogênica das CTM-Adp – Coloração Oil Red.

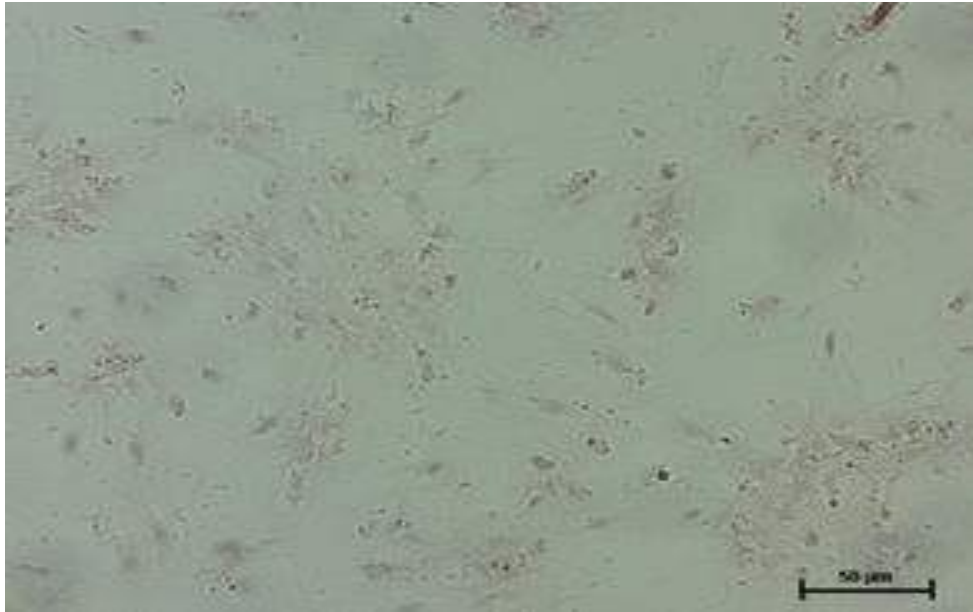
#### 4.5.3.b DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

Para promover a diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em placas de seis poços com 2ml de

DMEM/F12 suplementado com 50 $\mu$ M de ácido Ascórbico (Sigma Aldrich, St. Louis Missouri, EUA), 0,1 $\mu$ M de Dexametasona (Biossintética-Aché, São Paulo, Brasil) e 10 $\mu$ M de  $\beta$  glicerofosfato (Mallinckrodt Baker Products, New Jersey, USA) por 21 dias, tendo sido durante este período mantidas em incubadora úmida (Forma Scientific CO Water Jacketed Incubator Series II) 37°C com 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada três dias.

Após este período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após, foram utilizados 2ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS. Após mais 30min, a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS sendo que na primeira vez, foram lavadas em PBS contendo 0,1mol/L de glicina por 10min e nas duas vezes seguintes apenas em PBS por 2min.

Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de Alizarina Vermelha Sódica (2g/100ml, pH 4.1) (Sigma Aldrich, Missouri, USA) em temperatura ambiente por 30min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2ml e as células na placa foram lavadas cinco vezes com 2ml de água corrente para retirar o corante não ligado. As células fixadas e coradas foram observadas no microscópio óptico Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (**Figura 9**).



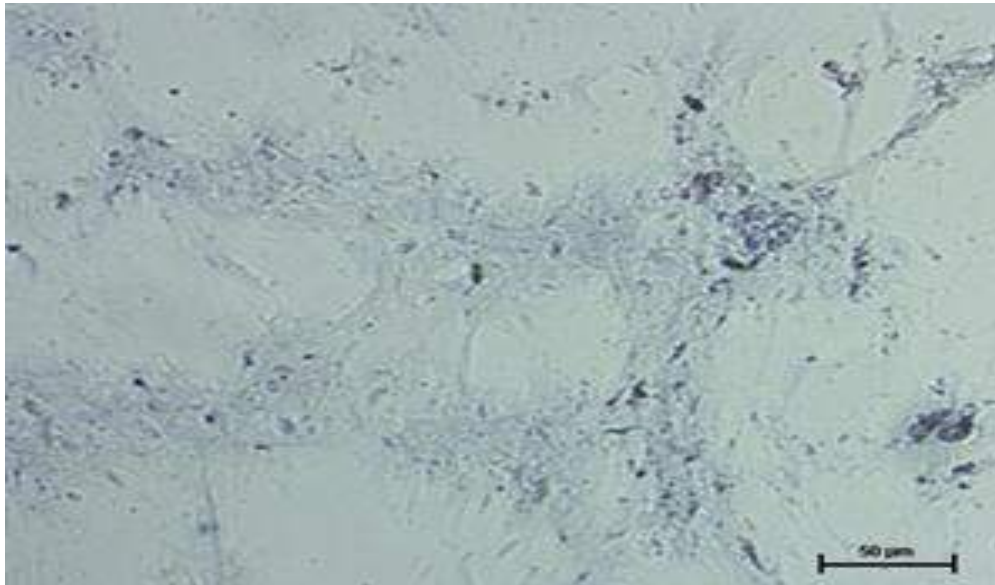
**Figura 9.** Diferenciação Osteogênica das CTM-Adp. Coloração Alizarina Vermelha.

#### 4.5.3.3 DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGÊNICA

Para promover a diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em poços com 2ml de DMEM/F12 suplementado com 10 $\mu$ M de insulina humana regular recombinante (HUMULIN<sup>®</sup> R – Lilly France, Fegersheim, France), 0,1 $\mu$ M de Dexametasona (Biossintética-Aché , São Paulo, Brasil), 50 $\mu$ M de ácido Ascórbico (Sigma Aldrich, Missouri, USA) e 10ng/ml de TGF- $\beta$ 1 (Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) por 21 dias, sendo mantidas em incubadora úmida a 37°C com 95% O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio

de cultura foi trocado a cada três dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foram utilizados 2ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS. Decorridos 30 minutos, a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS sendo que na primeira vez foram lavadas em PBS contendo 0,1mol/L de glicina por 10min e nas duas vezes seguintes apenas em PBS por 2min.

Posteriormente, as células foram incubadas em uma solução de 0,1% de Azul de Toluidina (Sigma Aldrich, St. Louis Missouri, EUA) em temperatura ambiente por 30min. A solução corante foi então removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2ml e as células foram lavadas cinco vezes com 2ml de água corrente para retirar o corante não ligado. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de óptico Nikon Ti-U e fotografada com a utilização do Software NIS-Elements – 3.2 (**Figura 10**).



**Figura 10.** Diferenciação Condrogênica das CTMs-Adp – Coloração Azul de Toluidina.

#### 4.5.4 IMUNOFENOTIPAGEM

As células da terceira passagem foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300g por 4min, tendo o sobrenadante sido descartado com subsequente adição de 1ml de PBS ao meio celular. Este procedimento, ou seja, a lavagem da suspensão de células foi repetida duas vezes. Após a segunda lavagem das células, foram adicionados os anticorpos conjugados com FITC (fluorescein isothiocyanate), APC (allophycocyanin)

ou PE (phycoerythrin): CD14-FITC; CD16-PE; CD31-FITC; CD34-APC; CD44; CD45-FITC; CD73-PE; CD90-APC; CD105-PE e CD117-APC (todos da Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA). Os tubos contendo as células foram incubados durante 20 minutos, em temperatura ambiente e protegidos da luz. As amostras foram submetidas à análise no citômetro de fluxo Guava easyCyte® para identificação dos canais de fluorescência específicos para cada anticorpo (**Tabela 1**).

**TABELA 1.** As células foram imunofenotipadas utilizando anticorpos específicos.

<b>Marcador</b>	<b>Expressão</b>
CD14	NEGATIVA
CD16	NEGATIVA
CD31	NEGATIVA
CD34	NEGATIVA
CD44	NEGATIVA
CD45	NEGATIVA
CD73	POSITIVA
CD90	POSITIVA
CD105	POSITIVA
CD117	NEGATIVA

Positiva: Expressão > 95% - Negativa: Expressão < 5%

#### 4.5.5. CRANIECTOMIAS

Nas datas planejadas para as craniectomias, os animais foram distribuídos de forma randomizada com a utilização do

software *Research Randomizer* (disponível em [www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)) em dois grupos com seis animais cada: Grupo Controle (GC) e Grupo Experimento (GE). Todos os animais foram operados pelo pesquisador. Apenas a responsável técnica pelo laboratório sabia quais animais pertenciam a cada grupo sendo informada do número de cada animal que estava sob procedimento e enviando o material de implante em acordo com a randomização.

Em todos os grupos foi utilizada a HA (grânulos de 0,25-1,0mm) em ambas as áreas de perda óssea para preenchimento e adequado contorno da área. Em cada animal, uma das áreas de perda óssea foi coberta pela membrana colágena sempre com o lado a ser coberto devidamente aleatorizado com envelopes fechados utilizando-se o mesmo software, *Research Randomizer*. O lado áspero da membrana foi colocado em contato com a HA conforme instruções do fabricante.

O cirurgião recebeu, para utilizar em todos os animais, dois tubos Eppendorf ambos com 1ml de PBS e HA ou 1ml de PBS contendo as CTM-Adp e HA dependendo da randomização. O animal sorteado como número 1 recebeu seus respectivos Eppendorfs; o número dois de mesmo modo e sucessivamente até o 12º animal.

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com o mesmo procedimento utilizado para a primeira anestesia (Lipectomia). A temperatura retal foi monitorada em todos os procedimentos (**Figura 11**)

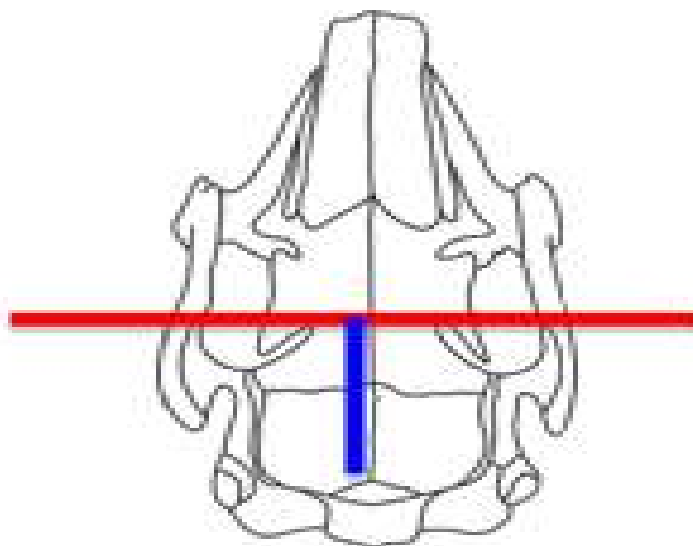


com termômetro digital e cada animal foi mantido aquecido com uso de manta térmica elétrica de 40x30cm (Bioterm® Porto Alegre, Brasil).



**Figura 11.** Monitorização da temperatura retal dos animais.

Attingido o plano anestésico, foi realizada uma tricotomia com lâmina 1 (3mm) com tricótomo elétrico Wahl® (Johannesburg, África do Sul) na cabeça do animal, desde a região frontal até a região posterior do pescoço e, em seguida, foi feita a marcação de dois pontos de referência na linha média o mais cranial representado por uma linha que une os 2 processos orbitários superiores (linha vermelha) e, daí, seguindo-se pela linha média, o segundo ponto foi marcado a 5cm em sentido caudal, (linha azul) delimitando o local e tamanho da incisão (**Figura 12**).



**Figura 12.** Referências para incisão na cabeça do animal.

Foi feita uma limpeza da região com Álcool 70% e, a seguir, antissepsia com Iodopovidona Solução Degermante 10%, e Iodopovidona Solução Alcoólica 10%, (Laboratório Natulab, Curitiba, Brasil). Colocados campos estéreis, foi realizada infiltração com 1ml de Lidocaína (Laboratório Geyer, Porto Alegre, Brasil) com epinefrina 2% (1:100.000) para facilitar a hemostasia.

A incisão foi realizada com bisturi lâmina 11 e, em seguida realizada a divulsão dos tecidos com utilização de uma pinça Kelly e Rugina até expor o periósteo com visualização das suturas sagital (interparietal) e coronal bilateralmente (**Figura 13**), colocando-se neste ponto um afastador auto-estático de Adson. A hemostasia foi feita apenas por pressão mecânica utilizando-se gaze embebida em SF.



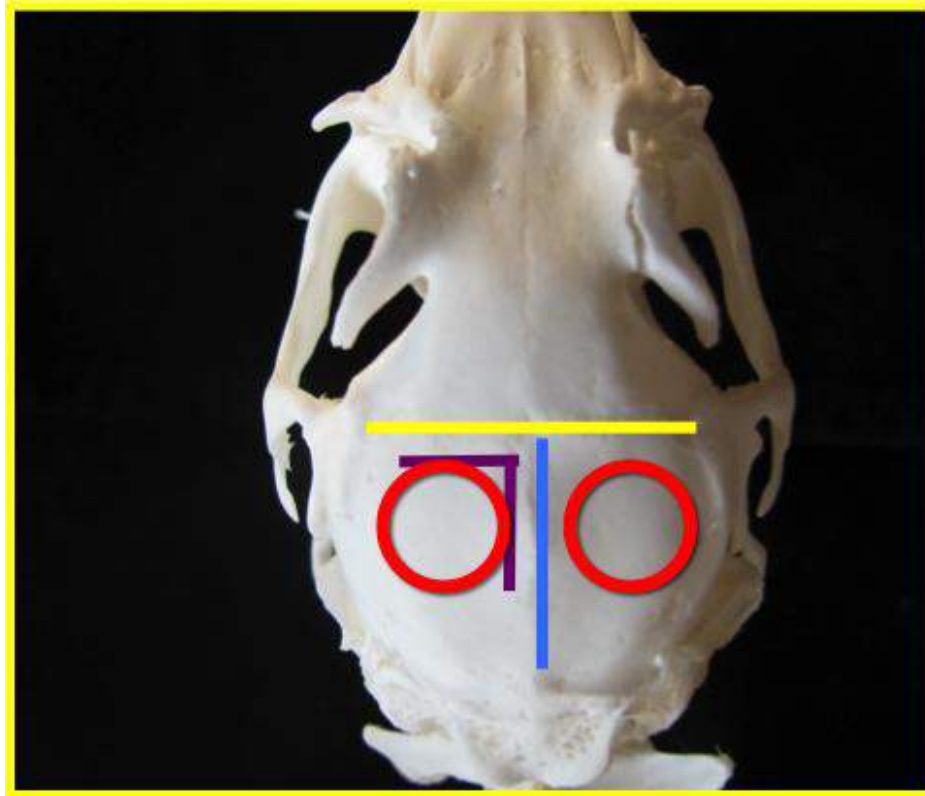
**Figura 13.** Incisão com exposição do periósteo.

O periósteo foi incisado com bisturi lâmina 11 e descolado lateralmente a partir da linha média expondo o crânio do animal (**Figura 14**).



**Figura 14.** Incisão do periósteo e exposição do crânio.

Foi então determinada uma área em cada osso parietal a partir de uma linha 2mm paralela e lateral à sutura sagital (linha azul) e 2mm paralela e posterior à sutura coronal (linha amarela) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Referências utilizadas para as craniectomias.

Utilizando-se uma trefina de aço inox com 10mm de luz e parede de 1mm, acopladas a um motor elétrico e contra-ângulo redutor de 16:1 (Driller, São Paulo, Brasil) (**Figura 16**) foram feitas, sob irrigação com soro fisiológico, as craniectomias com 12mm de diâmetro, de tal forma que o trépano tangenciasse as linhas roxas (**Figuras 15 a 17**). Cada fragmento circular de osso parietal foi cuidadosamente descolado e retirado. Nos casos em que houve fragmento de dura-máter persistente, este foi descolado com micro-descolador de Penfield, tendo sido removidos e desprezados (**Figuras 18 e 19**). Em nenhum animal houve lesão encefálica.



**Figura 16.** Início da craniectomia com trefina 10mm acoplada a contra-ângulo e motor elétrico.



**Figura 17.** Craniectomia.



**Figura 18.** Fragmentos prontos para retirada preservando as suturas.



**Figura 19.** Craniectomias após retirada da dura-máter e exposição do cérebro.

Nos animais do grupo GC, ambas as áreas de perda óssea foram totalmente preenchidas com HA mais PBS, enquanto nos animais do grupo GE, as áreas de perda óssea foram totalmente preenchidas com uma associação de HA e CTM-Adp cultivadas a partir do tecido adiposo do próprio animal. Cada área foi preenchida com 0,25g de HA (partículas de 0,25-1mm), volume este que propiciou um total preenchimento de cada área de perda óssea (**Figura 20**).





**Figura 20.** Áreas de perda óssea preenchidas com hidroxapatita mais CTM-Adp.

Nos 12 animais, uma das áreas de perda óssea foi coberta por uma membrana de colágeno de origem porcina de 25x25mm (**Figura 21**), sendo a escolha do lado - esquerdo ou direito - realizada de forma randomizada, utilizando-se de mesmo modo o software *Research Randomizer* e, a ordem de cada lado a ser coberto por membrana foi mantida em envelope lacrado até o momento do procedimento. Considerando-se que o último animal tinha o lado conhecido previamente, esta divisão foi definida como *quasi* aleatória.



**Figura 21.** Área de perda óssea coberta com membrana colágena.

Após o preenchimento das duas áreas de perda óssea e colocação das membranas colágenas, em cada animal foi feita a síntese da ferida operatória por planos utilizando-se fio Vicryl 6-0 Ethicon® (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) para periósteo (cinco pontos) e Mononylon 4-0 Ethicon® (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) para pele (seis pontos simples). A ferida operatória foi então higienizada com SF 0,9% e Iodopovidona Alcoólica. Os animais foram então reencaminhados às suas gaiolas individuais e medicados com anti-inflamatórios, analgésicos e antibióticos. Neste estudo foi utilizado no período pós-operatório Cefazolina Sódica 30mg/kg (Kefazol® Laboratório ABL, Cosmópolis, Brasil) de 12 em 12

horas IM por três dias; Flunixin Metaglumina (1mg/kg) (Bananime Pet<sup>®</sup>, Laboratório MSD, Cruzeiro, Brasil) de 24 em 24 horas por três dias IM; Cloridrato de Tramadol 2mg/kg (Tramal<sup>®</sup>, Laboratório Pfizer, Guarulhos, Brasil) de 8 em 8 horas IM por 24 horas. Cada ferida cirúrgica foi higienizada duas vezes ao dia com SF 0,9% e Iodopovidona Alcoólica por três dias.

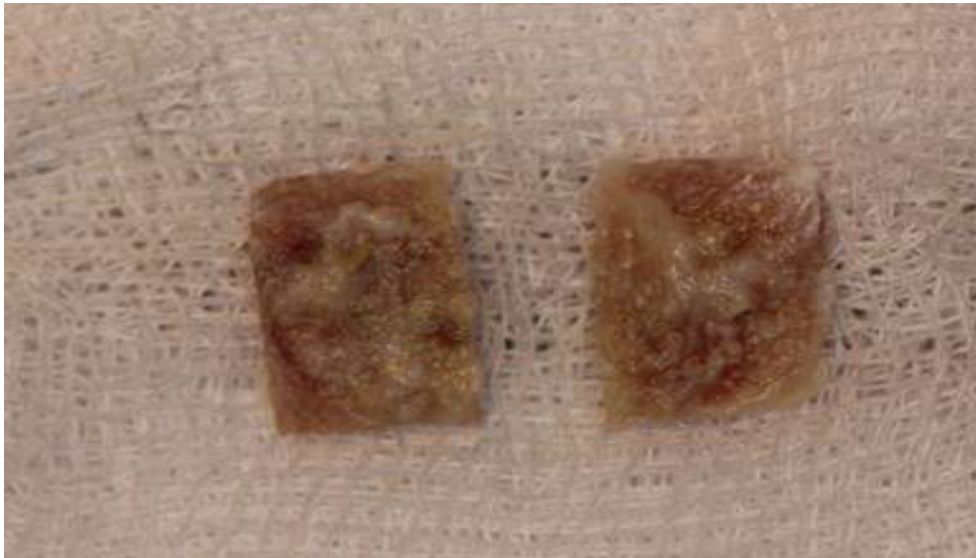
Os pontos de sutura foram retirados no 7º dia de pós-operatório. Os animais receberam ração peletizada e água *ad libitum* até a realização do óbito indolor induzido (OII).

#### 4.5.6. ÓBITO INDOLOR INDUZIDO

Oito semanas após as craniectomias com enxertia, foi realizado o óbito indolor induzido (OII) dos animais por sobredose endovenosa de Tiopental Sódico 100mg/kg (Laboratório Cristália, Itapira, Brasil) injetado na veia auricular após aplicação prévia de Quetamina 40mg/kg (Dopalen<sup>®</sup>, Laboratório Ceva, Paulínia, Brasil) por via intramuscular, em acordo com a Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária e, atendendo aos ditames da Lei 11.794 de 08/10/2008, art. 3º inciso IV.

#### 4.5.7 PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES

Após o OII, cada animal foi submetido a um descolamento do escalpo na área da craniectomia e com auxílio de uma serra acoplada a motor elétrico (Driller, São Paulo, Brasil), fragmentos de aproximadamente 20x25mm (**Figura 22**) englobando toda a área de perda óssea e implante foram retirados para análise. Estes fragmentos foram imersos em frascos identificados quanto ao número e lado, com formol tamponado 10% por 72h e depois imersos em tubos cônicos Falcon® com álcool 70% (aproximadamente 10 vezes seu volume) por mais 24h. Na sequência, os fragmentos foram removidos para outros tubos cônicos Falcon® com EDTA onde ficaram imersos por dez dias para descalcificação.



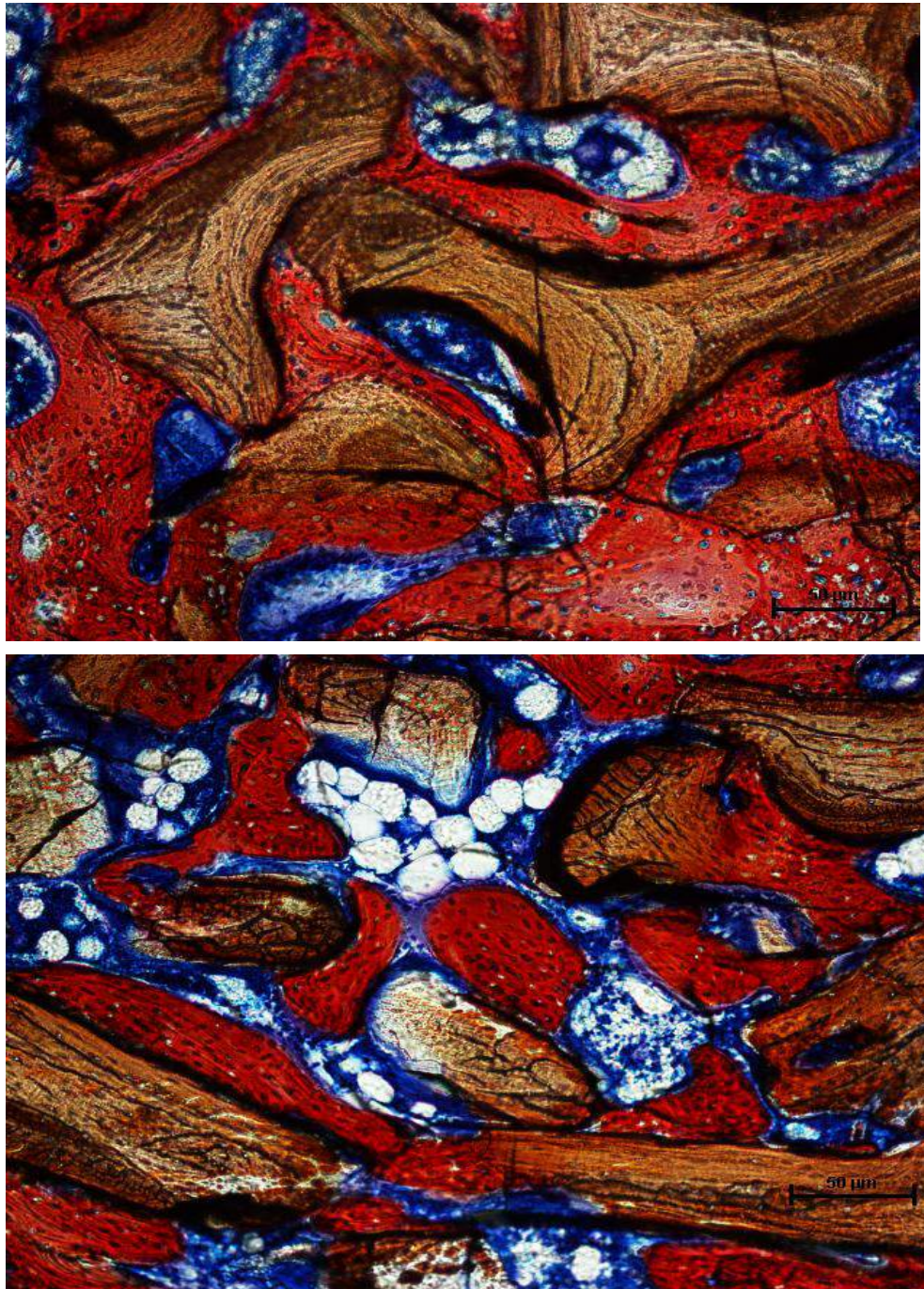
**Figura 22.** Fragmentos (espécimes) de aproximadamente 20X25mm incluindo todo o defeito ósseo de cada osso parietal .

Com os espécimes descalcificados, estes foram embebidos em parafina formando blocos e, seções de  $7\mu\text{m}$  a partir do centro dos defeitos foram cortadas, sendo duas em direção lateral e duas em direção medial, que foram então coradas com *Stevenel's Blue* e Tricrômio de Mallory, perfazendo um total de 96 lâminas para análise. Cada lâmina teve seis seções avaliadas a partir do centro (superior anterior, superior medial, superior posterior, inferior anterior, inferior medial e inferior posterior) num total de 576 seções avaliadas.

#### 4.5.8 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

As imagens das lâminas foram capturadas por uma câmera digital CCD (RT Color; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) adaptada ao microscópio Nikon Eclipse CI e avaliadas com o uso do *Software Infinity Analyze* por dois examinadores cegos previamente calibrados. A média entre os resultados obtidos pelos dois avaliadores foi utilizada para análise estatística. O teste utilizado para testar a concordância entre os examinadores foi o Teste de Friedman.

Parâmetros de tecido mineralizado vital (TMV), tecido mineralizado não vital (TMNV) e tecido não mineralizado (TNM) foram mensurados em  $\mu\text{m}^2$  e, relativamente a cada defeito, foi calculada a média das percentagens da área total do defeito na comparação de 24 seções oriundas de quatro lâminas de cada lado da região de perda óssea. Nas fotos obtidas (**Figura 23**), pode-se notar o TMV em vermelho, o TMNV em ocre e o TNM em azul. As áreas foram delimitadas e tiveram sua área calculada em porcentagem do total da área avaliada.



**Figura 23.** Histomorfometria. Aumento de 100x. Em azul as áreas de tecido não mineralizado; em ocre, áreas de tecido mineralizado não vital e em vermelho, áreas de tecido mineralizado vital.

## 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos em porcentagem de área de TMV, TMNV e TNM foram analisados com a utilização do teste de médias de Wilcoxon Mann-Withney U Test. Trata-se de um teste não-paramétrico utilizado quando não há normalidade nos dados obtidos, (teste baseado na soma dos ranks das variáveis).

Em todos os testes, a hipótese nula ( $H_0$ ) sendo testada é de que a média entre os Grupos Controle e Experimento são iguais ( $média_1 = média_2$ ). O nível de significância assumido para decidir sobre todos os testes foi de 5%, ou seja, de 95% de confiança.



## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

Em nenhum caso foi necessária a utilização do gás anestésico, todos os procedimentos foram realizados no tempo previsto, inferior a dez minutos para lipectomias e a 20 minutos para craniectomias.

Todos os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 2**.

### 5.1. ANÁLISE GRUPO CONTROLE vs GRUPO EXPERIMENTO

Os resultados apresentados na **Tabela 3** indicam que há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ : igualdade entre as médias) das médias observadas entre os Grupos GC e GE para as medidas Tecido Mineralizado Vital (TMV) ( $p$ -valor = 0,0270), Tecido Mineralizado Não Vital (TMNV) ( $p$ -valor  $\leq$  0,0001) e Tecido Não Mineralizado (TNM) ( $p$ -valor = 0,0001), ou seja, há no GE uma quantidade maior estatisticamente significativa de TMV e TMNV e, menor de TNM.

**Tabela 2.** Resultados obtidos para os tecidos analisados em relação aos grupos controle e experimento.

RESULTADOS EM % DE CADA TECIDO						
<i>GRUPO CONTROLE</i>			<i>GRUPO EXPERIMENTO</i>			
A	C/M	S/M	A	C/M	S/M	
2	7,86	16,15	1	28,15	26,31	
6	14,69	12,34	3	27,44	30,36	
7	16,11	10,89	4	16,56	18,37	
9	15,55	13,05	5	28,08	23,19	
11	14,07	12,93	8	27,33	26,68	
12	12,85	13,11	10	26,13	32,73	
<b><i>TMNV</i></b>						
<b>MÉDIA</b>		<b>13,52</b>	<b>13,08</b>	<b>25,61</b>	<b>26,27</b>	
<b>DP</b>		<b>3,00</b>	<b>1,72</b>	<b>4,50</b>	<b>5,11</b>	
2	10,32	8,25	1	12,07	18,07	
6	6,83	4,64	3	28,19	19,90	
7	22,3	6,45	4	9,25	23,55	
9	11,12	6,2	5	17,90	11,34	
11	13,45	7,3	8	15,38	18,66	
12	14,33	6,5	10	16,77	13,21	
<b><i>TMV</i></b>						
<b>MÉDIA</b>		<b>13,06</b>	<b>6,56</b>	<b>16,59</b>	<b>17,46</b>	
<b>DP</b>		<b>5,24</b>	<b>1,20</b>	<b>6,51</b>	<b>4,48</b>	
2	81,73	75,6	1	59,78	55,62	
6	78,49	83,01	3	44,37	49,74	
7	61,59	82,67	4	74,19	58,08	
9	73,33	80,75	5	54,02	65,47	
11	72,48	79,77	8	57,29	54,66	
12	72,82	80,39	10	57,1	54,06	
<b><i>TNM</i></b>						
<b>MÉDIA</b>		<b>73,41</b>	<b>80,37</b>	<b>57,79</b>	<b>56,27</b>	
<b>DP</b>		<b>6,87</b>	<b>2,67</b>	<b>9,67</b>	<b>5,26</b>	

TMNV: Tecido Mineralizado Não Vital; TMV: Tecido Mineralizado Vital; TNM: Tecido Não Mineralizado; M, Média; DP, Desvio Padrão; C/M, Com Membrana; S/M, Sem Membrana; A, Número do Animal.

**Tabela 3.** Resultados alcançados nos testes estatísticos realizados, comparando-se a média dos achados de ambos os grupos entre si:

	<b>Medidas de Histomorfometria (%)</b>			<b>N</b>
	<b>M ±DP</b>			
	<b>TMV</b>	<b>TMNV</b>	<b>TNM</b>	
Grupo Controle	9,8±5,0	13,3±2,3	76,9±6,2	12
Grupo Experimento	17,0±5,3	25,9±4,6	57,0±7,5	12
<b>p*</b>	<b>0,0270</b>	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,0001</b>	

TMNV: Tecido Mineralizado Não Vital; TMV: Tecido Mineralizado Vital; TNM: Tecido Não Mineralizado; N: Craniectomias; M, Média; DP, Desvio Padrão. \*, valores obtidos por meio do Teste de Wilcoxon.

## **5.2 ANÁLISE GRUPOS ‘COM MEMBRANA’ vs ‘SEM MEMBRANA’**

Para o Grupo Controle (GC), os resultados apresentados nas **Tabelas 4 e 5** indicam que há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula ( $H_0$ : igualdade entre as médias) das médias observadas entre os Grupos “C/M” vs “S/M” para

as medidas TMV (p-valor = 0,0104) e TNM (p-valor = 0,0374), ou seja, apenas neste grupo houve diferença estatisticamente significativa quanto ao uso da membrana para promover a ROG.

**Tabela 4.** Avaliação intragrupo com membrana e sem membrana no grupo controle.

Grupo 'GC'	Medidas de Histomorfometria (em %)			N
	M±DP			
	TMV	TMNV	TNM	
Grupo 'C/M'	13,1±5,2	13,5±3,0	73,4±6,9	6
Grupo 'S/M'	6,6±1,2	13,1±1,7	80,4±2,7	6
<b>p*</b>	<b>0,0104</b>	<b>0,5218</b>	<b>0,0374</b>	

TMNV: Tecido Mineralizado Não Vital; TMV: Tecido Mineralizado Vital; TNM: Tecido Não Mineralizado; M, Média; DP, Desvio Padrão; C/M, Com Membrana; S/M, Sem Membrana. \*, valores obtidos por meio do Teste de Wilcoxon.

**Tabela 5.** Avaliação intragrupo com membrana e sem membrana no grupo experimento.

Grupo 'GE'	Medidas de Histomorfometria (em %)			N
	M±DP			
	TMV	TMNV	TNM	
Grupo 'C/M'	16,6 ± 6,5	25,6±4,5	57,8±9,7	6
Grupo 'S/M'	17,5±4,5	26,3±5,1	56,3±5,3	6
<b>p*</b>	<b>0,4233</b>	<b>1,0000</b>	<b>0,7488</b>	

TMNV: Tecido Mineralizado Não Vital; TMV: Tecido Mineralizado Vital; TNM: Tecido Não Mineralizado; M, Média; DP, Desvio Padrão; C/M, Com Membrana; S/M, Sem Membrana. \*, valores obtidos por meio do Teste de Wilcoxon.

Para todos os demais testes, não foram encontradas evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula, ou seja, no GE, a utilização de membrana não foi capaz de produzir mais TMV do que a simples utilização das CTM-Adp.

## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado o modelo de regeneração óssea (RO) em calvárias de coelhos com trepanações bilaterais. Este é um modelo de estudo de RO que – com pequenas variações – é frequentemente utilizado por diversos pesquisadores (LUNDGREN *et al.* 1992; HÄMMERLE *et al.* 1992; OLIVEIRA e SILVA *et al.* 2012; PELEGRINE *et al.* 2014; ALOISE *et al.* 2015) Além disto, há uma linha de pesquisa no Laboratório de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lydia Masako Ferreira em RO com a utilização de diversos tipos celulares associados a substratos na calvária de coelhos que utiliza o mesmo modelo animal. Não obstante, NIEMEYER *et al.* (2010) não concordam com o uso de animais de pequeno porte para estudo em RO - particularmente coelhos - afirmando que estes animais têm uma grande capacidade de RO o que, na opinião dos autores, faz com que os defeitos ósseos estudados não sejam na verdade “críticos” mas apenas “defeitos parciais”.

Não há consenso na literatura acerca do tamanho de uma área de perda óssea na calvária de coelhos que possa ser considerada como “defeito crítico”. Segundo SOHN *et al.* (2010) para ser considerado crítico, um defeito não pode sofrer regeneração espontânea sem qualquer tipo de tratamento



ou, menos de 10% de regeneração pode ser vista ao longo da vida do animal. LUNDGREN *et al.*, em 1992 utilizaram áreas de perda óssea na calvária de coelhos com oito milímetros de diâmetro num período observacional de seis semanas – áreas estas que foram consideradas como “defeito crítico” pelos autores. Em sentido contrário, HÄMMERLE *et al.* também em 1992 utilizaram em seus estudos defeitos de, também, oito milímetros, considerados por eles como não críticos e, posteriormente em 1995 utilizaram áreas de perda óssea de 15mm avaliados à época como “defeitos críticos”. Ambos os trabalhos tiveram um período observacional de cinco semanas. Em 2000 DODDE II *et al.* consideraram que apenas defeitos de 15mm podem ser considerados críticos num período observacional de nove meses. DUPOIRIEUX *et al.* (2001), demonstraram que uma área de perda óssea pode – sem a utilização de nenhum substrato – deixar de ser crítica pela simples utilização de uma membrana.

PENTEADO *et al.* (2013) utilizaram defeitos de oito milímetros na calvária de coelhos num período de 12 semanas e consideraram este defeito como crítico. SOHN *et al.* (2010) investigaram tamanhos diferentes de craniectomias em coelhos e, também, períodos observacionais diferentes, concluindo que um defeito para ser considerado crítico, deve ser avaliado não apenas quanto ao tamanho da lesão, mas, também, quanto ao período observacional. Inferem a partir destes dados, que um período

de oito semanas seria mais adequado para avaliar a regeneração tardia como a incorporação do enxerto ao osso, a reabsorção do material de enxerto, a remodelação óssea e a quantidade de regeneração óssea. O defeito de 15mm – segundo os autores - não cicatriza espontaneamente num período observacional de 12 semanas. Não obstante os autores encontraram neste prazo uma RO superior a 20%, o que impediu que estas áreas de perda óssea – por não atender os critérios de “defeito crítico” – pudessem ser consideradas como tal. Sugerem os autores que, diversos tipos de estudo possam utilizar duas áreas de perda óssea simétricas de 11mm em cada lado da cabeça, estudos estes que poderiam atender diversos modelos experimentais com a vantagem comparativa de duas situações no mesmo animal. Neste sentido, PELEGRINE *et al.* (2014), demonstraram de modo inequívoco, que uma área de perda óssea de 12mm de diâmetro na calvária de coelhos da raça Nova Zelândia não cicatriza espontaneamente após um período observacional de oito semanas.

Os animais foram devidamente ambientados de modo padronizado. Esta padronização encontra recomendação na literatura nos dizeres de FERREIRA LM, HOCHMAN B, & BARBOSA MVJ (2005), pois os animais utilizados em experimentos devem ter a maior uniformidade possível em relação as questões ambientais, genéticas e experimentais, uma vez que são “reagentes ambientais” e, quanto maior a uniformidade, menor será a quantidade amostral mínima.

Na região da incisão, foi realizada apenas uma tricotomia com lâmina número um (evitando contato da lâmina com a pele). A opção por não realizar uma tricotomia rente (depilação) ou uma epilação, fundou-se no trabalho de SEBASTIAN publicado em 2012 que encontrou fortes evidências de que, ao contrário do senso comum, tricotomias pré-operatórias não diminuem as taxas de infecção, ao contrário, paradoxalmente, aumentam as taxas de infecção em craniotomias.

Na técnica operatória, optamos pela retirada da dura-máter de todos os animais. Isto porque PETRIE *et al.* (2008) demonstraram que a dura-máter tem importante papel na regulação da osteogênese na região da calvária e que, as células-tronco da dura-máter (CTDM) têm habilidade para transformar-se nos dois tipos de tecido com os quais mantém contato: tecido ósseo e tecido nervoso - dada sua origem a crista neural - o que caracterizaria suas células como multipotentes. SOHN *et al.* (2010) afirmaram que a regeneração óssea ocorre a partir da borda dos defeitos e, também, do centro, a partir de ilhas ósseas que se formam no perióstio e dura-máter. Do perióstio viriam o osso cortical e o suprimento sanguíneo e a dura-máter atuaria na reossificação pelo seu potencial osteogênico. HÄMMERLE *et al.* (1995) avaliaram a dinâmica temporal da regeneração óssea com manutenção da dura-máter e exclusão do perióstio. Anotaram que o defeito se fecha inicialmente pelas bordas ósseas e posteriormente se formam ilhotas ósseas no centro do defeito.

Os autores atribuíram esta formação ao coágulo que preenche o espaço protegido pela membrana, não fazendo referência a uma possível atuação da dura-máter.

Não obstante, outros autores (SOHN *et al.* 2010), alertam que neste tipo de craniectomia em coelhos, a dura-máter pode ser muito facilmente lesada motivo pelo qual, removeram completamente a dura-máter de todos os defeitos de modo a uniformizar o método e obter resultados mais consistentes .

Incluímos em cada grupo deste estudo apenas seis animais (Grupo Controle; GC e Grupo Experimento; GE), número semelhante ao utilizado por diversos autores e inclusive superior ao de outros estudos. DAHLIN *et al.* (1988), estudaram a ROG em ratos utilizando grupos de apenas 3 animais. Também KIM *et al.* (2009), em seus estudos, avaliaram a absorção óssea em calvária de coelhos e utilizaram 4 animais em cada grupo. A avaliação estatística neste caso foi feita com o Teste de Kruskal-Wallis e o Teste de Mann-Whitney. OLIVEIRA e SILVA *et al.* (2012) também a avaliaram a ROG com grupos de 5 animais (GE e GC) utilizando o teste de ANOVA para comparação entre os grupos. NIEMEYER *et al.* em 2010, trabalhando com ovelhas utilizaram um *n* de cinco animais em cada grupo. PENTEADO *et al.* (2013) utilizaram grupos de 5 animais (coelhos).

Grupos de seis coelhos Nova Zelândia foram utilizados em diversas publicações valendo-se de testes estatísticos não paramétricos (PELEGRINE *et al.*, 2014; ALOISE *et al.* 2015).

Este estudo objetivou avaliar as Células-Tronco Mesenquimais derivadas do Tecido Adiposo (CTM-Adp) autólogo de coelhos associadas a HA na Regeneração Óssea Guiada (ROG). BOHNENBLUST *et al.* (2009), também utilizaram tecido adiposo autólogo colhido da região inguinal de ratos buscando verificar se a utilização de osso cadavérico (alógeno) associado a CTM-Adp era mais eficaz do que a simples utilização do osso. Não obstante, diversos estudos apontam para uma superioridade das Células-Tronco derivadas da Medula Óssea (CTMO) em RO. NIEMEYER *et al.* (2010), acreditam que a neosteogênese comparando CTMO com CTM-Adp é tão mais eficaz com CTMO que não se justificaria o uso de CTM-Adp.

Não seria prudente despender recursos e tempo pesquisando algo que está bem definido na literatura pertinente. Todavia não é o que se percebe a partir de uma análise de estudos que se dedicaram ao tema. D'IPPOLITO *et al.* em 1999, demonstraram que a quantidade de CTMO com potencial osteogênico depende da idade do doador, tendo as CTMO obtidas de jovens maior potencial osteogênico. Por outro lado, a idade do doador não afeta o comportamento das CTM-Adp (SHI

*et al.* 2012). ZUK *et al.* em 2002, após o trabalho pioneiro demonstrando a existência de Células-Tronco (CT) no tecido adiposo, compararam a expressão antigênica das CTMO com as CTM-Adp e consideraram que é grande a similaridade fenotípica entre elas propondo que estas fossem utilizadas em engenharia tecidual substituindo aquelas. DE UGARTE *et al.* (2003) compararam a quantidade de Células-Tronco Mesenquimais (CTM) que podiam ser obtidas da medula óssea (MO) com células processadas a partir de um lipoaspirado, realizando a coleta de ambos (medula e gordura) do mesmo paciente (n=5). Os autores encontraram grande diferença entre a quantidade de CTM obtidas da MO e a quantidade de células que obteve pelo simples processamento do tecido adiposo.

TAPP *et al.* (2009) comparando CTM-Adp e CTMO, não encontraram nenhuma diferença importante entre elas avaliando os 29 marcadores de superfície mais citados na literatura. MAROLT *et al.* (2010) afirmaram que o TA é uma fonte atrativa de material para bioengenharia óssea porque grandes quantidades de tecido adiposo podem ser colhidas e as CT representam cerca de 1 a 5% das células nucleadas isoladas enquanto as CTMO representam 0,001 a 0,01% das células nucleadas. Alguns autores defendem a desnecessidade do uso de CT cultivadas para que ocorra regeneração óssea. SHI *et al.* (2012) propõem o uso apenas da fração estromal vascular (FEV) do TA associado a um arcabouço de matriz óssea desmineralizada. MUSCARI *et al.* (2013) consideram que a grande vantagem da utilização das

CTM-Adp sobre as CTMO é que a partir do tecido adiposo a quantidade de CT que pode ser obtida é muito superior e pode ser utilizada a partir de simples processamento, todavia, por outro lado, a quantidade de CTMO que pode ser obtida é baixa e necessita invariavelmente de procedimentos de expansão celular caros e que demandam tempo.

Diante da similaridade relatada em diversos estudos e inclusive da perspectiva futura de utilização das CTM-Adp pelo simples processamento do TA, optamos por investigar os efeitos destas células associadas ao substrato de Hidroxiapatita (HA) na Regeneração Óssea Guiada (ROG). Não localizamos na literatura, estudos em que a Regeneração Óssea com a utilização de um substrato (autólogo, alógeno, xenógeno ou aloplástico) associado à CTM-Adp houvesse sido avaliada em coelhos com a utilização de uma membrana protetora – em última análise, a técnica da ROG neste modelo, aparentemente ainda não foi testada até esta data.

O arcabouço escolhido foi a HA xenógena de origem bovina. Outros substratos além da HA foram exaustivamente estudados. JENSEN *et al.* (2012), numa revisão sistemática, afirmam que o uso de osso autólogo na regeneração óssea ainda é o “padrão ouro”, todavia sua coleta carrega riscos e morbidade.

Não obstante seja o uso de osso autólogo considerado o “padrão ouro” na literatura para enxertia óssea, PELEGRINE

*et al.* (2010) não encontraram diferenças entre o osso autólogo e osso homólogo fresco congelado associados ou não à medula óssea em coelhos. Testando na calvária de coelhos e a neoformação óssea fundada na utilização de material de enxertia (osso autólogo e osso homólogo) relatam que não há diferença entre o uso de um ou outro substrato. Por outro lado, asseveram que o uso de MO sozinha é ineficaz quanto ao potencial de regeneração óssea, aproximando-se do uso (aparentemente inútil) de um simples coágulo sanguíneo, pelo que, os autores insistem na necessidade de uso de um substrato (arcabouço) no qual as células possam se fixar. Por este motivo diversos substitutos têm sido estudados, entre eles a HA de origem bovina utilizada neste experimento.

PIATELLI *et al.*, em 1999, num estudo retrospectivo do uso de Bio-Oss® relataram que até aquela data, o produto havia sido testado em mais de 15 ensaios randomizados registrados na Cochrane Library sendo então – já àquela época - um dos mais bem documentados materiais.

HICOK *et al.* (2004), em seus estudos com CTM-Adp humanas implantadas em ratos, utilizaram como arcabouço, cubos de HA,  $\beta$ -TCP ou Collagraft® e implantaram no subcutâneo do dorso de camundongos. Demonstraram que uso de cola de fibrina como arcabouço dificulta a diferenciação osteogênica. LENDECK *et al.*, por outro lado, no mesmo ano, utilizaram cola de fibrina (autóloga) como arcabouço para uma cranioplastia com osso autólogo mais CTM-Adp autóloga



e entenderam ser seu uso, benéfico. KHOJASTEH *et al.* (2008) comparando HA (Bio-Oss®) com  $\beta$ TCP (Kasios®), ambos associados a Plasma Rico em Plaquetas (PRP) ou CTMO, relataram nítida superioridade nos grupos que utilizaram CTMO e particularmente no grupo em que o arcabouço utilizado foi o  $\beta$ TCP. ROKN *et al.* (2012) também avaliaram comparativamente HA e  $\beta$ TCP e não encontram diferenças estatísticas na quantidade de osso novo presente.

Outros substratos aloplásticos foram tentados. ROKN *et al.* (2011) compararam em craniectomias de coelhos, HA com um fosfato bifásico de cálcio (Straumann Bone Ceramic®) e não encontraram diferenças na quantidade de osso regenerado. PENTEADO *et al.* (2013) utilizaram vidro bioativo (VB) - uma cerâmica com óxido de silício - associado a PRP na calvária de coelhos. TIRKKONEN *et al.* (2013) defenderam o uso de cerâmicas sintéticas em engenharia tecidual óssea afirmando que elas estão encaixadas entre os mais promissores materiais para este fim.

A gordura neste experimento foi colhida do tecido subcutâneo da região dorsal alta dos coelhos. PEPTAN *et al.* em 2006. Investigaram o potencial osteogênico das CT derivadas do subcutâneo da região epigástrica *versus* o potencial das células colhidas da gordura visceral e concluíram que as células

oriundas da gordura subcutânea têm uma capacidade de proliferação maior. Em contrapartida, aquelas advindas da gordura visceral tinham um maior potencial de diferenciação osteogênica. PRUNET-MARCASSUS *et al.*, também em 2006, encontraram uma maior taxa de proliferação nas células colhidas do TA subcutâneo comparativamente aos resultados obtidos com as células da gordura visceral. De mesmo modo, também a capacidade de diferenciação osteogênica foi maior entre as células na gordura visceral do que naquelas retiradas e cultivadas da gordura subcutânea.

PELEGRINE *et al.* (2010) observaram que a associação de células, tanto da MO fresca como da fração mononuclear da medula foi capaz de melhorar a formação de osso em defeitos críticos na calvária de coelhos, corroborando a hipótese de que, todo e qualquer arcabouço utilizado em RO necessita de células para uma cicatrização eficaz. PENTEADO *et al.* (2013) testaram o uso de VB utilizando coágulo sanguíneo e PRP e também observaram um aumento na RO dos grupos tratados com PRP, sem que alguma RO significativa fosse anotada nos grupos “acelulares”, inferindo que a ausência de células no arcabouço tenha sido responsável por este resultado. Portanto, não apenas o tipo celular mais apropriado à RO deve ser pesquisado, mas, também, o arcabouço mais propício, uma vez que um não prescinde do outro quando se busca regenerar tecido ósseo. SHI *et al.* (2012) propuseram o uso apenas da fração estromal

vascular (FEV) do TA associada a um arcabouço de matriz óssea desmineralizada argumentando que não é possível ocorrer regeneração óssea sem uma base celular. Objetivando definir o tipo celular mais apropriado, este trabalho teve como foco testar as CTM-Adp.

Buscamos na literatura substrato para a escolha da membrana a ser utilizada – particularmente porque este é um ponto em que ainda não há unanimidade entre os pesquisadores. Em 1990, BECMEUR *et al.*, numa interessante revisão histórica do e-PTFE, afirmaram que até o início da última década do século XX, membranas de e-PTFE eram as mais utilizadas nos estudos de ROG. Em 1992, LUNDGREN *et al.* testaram pela primeira vez o uso de uma membrana em ROG que não o e-PTFE, substituindo-o por PLA e defenderam que o PLA tinha a vantagem de não colapsar para dentro do defeito e não necessitava de uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do mesmo, ao contrário do que ocorria com o e-PTFE. Em 1998, o prejuízo causado pelo colapso da membrana foi bem demonstrado por LUNDGREN *et al.*, que demonstraram que ocorria uma redução na quantidade de osso neoformado quando isto ocorria. HÄMMERLE & JUNG (2003), comparando as membranas, alertaram para as vantagens e desvantagens de cada tipo de membrana (biodegradáveis *versus* não degradáveis).

Nesta pesquisa optamos assim como PELEGRINE *et al.* (2014) e ALOISE *et al.* (2015), pela utilização de uma

membrana de origem porcina (Bio-Guide®) almejando realizar o experimento sem a necessidade de uma terceira intervenção cirúrgica – a retirada do e-PTFE - e, principalmente, buscando manter o espaço em que o enxerto na calota craniana foi colocado íntegro – com um volume constante sem o risco de colapso da membrana para seu interior. O Bio-Guide® é uma membrana colágena de origem porcina, com utilização já amplamente descrita na literatura. OLIVEIRA e SILVA *et al.* (2012) demonstraram que a utilização desta membrana de origem porcina é eficaz em melhorar a regeneração óssea.

O protocolo de cultura dos adipócitos e da diferenciação celular (adipogênica, condrogênica e osteogênica) utilizado neste trabalho, foi o mesmo ao utilizado por GAIBA *et al.* (2012) e, embora os autores tivessem realizado o procedimento a partir de tecido adiposo humano, verificamos produtividade celular similar bem como coincidência relativamente aos marcadores de superfície expressos e não expressos.

O painel de imunofenotipagem utilizado neste trabalho incluiu os seguintes marcadores de superfície: CD14, CD16, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105 e CD117, os mesmos utilizados por ALOISE *et al.* (2015). A expressão dos marcadores CD73, CD90 e CD105 atende aos critérios propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) para CTM. No mesmo sentido, a ausência de expressão dos marcadores CD14, CD34 e CD45 se verificou (DOMICINI

*et al.* 2006), diferenciando as células testadas de células de linhagem hematopoiética. Ainda em acordo com o proposto pela SITC, as células foram submetidas à diferenciação adipoblástica (verificada pela coloração com *Oil Red O*), condroblástica (verificada pela coloração com Azul de Alcian) e Osteoblástica (verificada pela coloração com Alizarina Vermelha).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a associação de CTM-Adp com um substrato de HA é capaz de promover maior regeneração óssea do que a simples utilização do substrato. Também foi demonstrado que a utilização de uma proteção no local da lesão objetivando impedir que as células indesejadas invadam o local da lesão se mostrou eficaz – como de sorte já é consenso na literatura, (PELEGRINE *et al.* 2014, ALOISE *et al.* 2015).

O GE quando comparado ao GC apresentou superioridade estatística na quantidade de regeneração óssea bem como na quantidade de tecido mineralizado persistente no local. Infere-se, que a utilização de CTM-Adp é benéfica, capaz de melhorar a regeneração óssea, não apenas por propiciar a ocorrência de uma maior quantidade de *osso novo*, mas, também, por inibir em parte a reabsorção do material de EO. Surpreende o achado de que no GE, a utilização ou não de membrana não tenha apresentado diferença. Neste grupo, a presença das CTM-Adp, de

modo indubitável, melhora a RO comparativamente ao grupo em que apenas HA foi utilizado, todavia, a presença ou ausência de membrana não modificou os resultados.

Utilizando o mesmo modelo animal, PELEGRINE *et al.* (2014) avaliaram a associação do mesmo enxerto xenógeno (HA) com a adição de medula óssea fresca ou fração mononuclear da medula. Também em cada lado das craniectomias foi utilizada a mesma membrana de origem porcina. Com o mesmo tempo de evolução, os autores concluíram que a adição de medula óssea fresca ou, principalmente, da fração mononuclear da medula, aumentam a quantidade de tecido mineralizado vital. O uso da membrana também se revelou benéfico com superioridade estatística em ambos os casos e também no grupo controle. Estes achados corroboram nosso achado de que o uso de membrana propicia um aumento na quantidade de *osso novo*.

Por outro lado, ALOISE *et al.* (2015), utilizando o mesmo modelo animal, implantou células-tronco derivadas da medula óssea associadas a HA e comparou os resultados com o osso autólogo. O uso de membrana foi eficaz tanto no grupo em que osso autólogo foi utilizado como no grupo controle, no qual apenas HA foi utilizada. Todavia no grupo em que as CTMO foram adicionadas à HA, o uso de membrana não aumentou a quantidade de tecido mineralizado vital, achado muito semelhante ao aqui descrito embora as CTMs utilizadas tenham sido de outra origem. Não obstante, neste trabalho, os autores demonstraram que o uso de CTMO, do ponto de vista

de tecido mineralizado no local da lesão, pode ser tão efetivo quanto o uso de osso autólogo, achado também semelhante aos aqui descritos: de que a quantidade de tecido mineralizado, após oito semanas de evolução foi muito próxima da quantidade normal do animal (50%).

## **7. PERSPECTIVAS**



## 7. PERSPECTIVAS

- 1) Avaliar o papel das CTM relativamente ao comportamento de outras células (possivelmente fibroblastos) com vistas à elucidar o motivo pelo qual neste trabalho – assim como no de Aloise *et al.* (2015) a utilização ou não de membrana – quando na presença de CT – não foi capaz de melhorar ainda mais a regeneração óssea.
- 2) Elucidar os mecanismos pelos quais a utilização de CTM-Adp parece dificultar em algum grau a reabsorção do elemento xenógeno – se por efeito direto das CTM ou efeitos parácrinos como proposto por LINERO & CHAPARRO (2014).
- 3) Utilizar a CTM-Adp em terapia de regeneração tecidual “à beira do leito”, sem necessidade de cultivo das CTM, abordagem esta já utilizada por LENDECK em 2004 *in vivo*.

## **8. CONCLUSÃO**

## 8. CONCLUSÃO

A associação entre células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo autólogo de coelhos e hidroxiapatita de origem bovina foi capaz de promover maior regeneração óssea da calvária de coelhos. O uso de membrana colágena de origem porcina não foi capaz de promover maior regeneração óssea do que o uso apenas de células-tronco associadas ao enxerto xenógeno.

## **9. REFERÊNCIAS**

## 9. REFERÊNCIAS

Aloise AC, Pelegrine AA, Zimmermann A, Mello E Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stem cells or autogenous bone with or without collagen membrane: A histomorphometric study in rabbit calvária. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015; 30(1): 208-15.

Becmeur F, Geiss S, Laustriat S, Bientz J, Marcelli L, Sauvage P. History of Teflon. *Eur Urol*. 1990; 17(4): 299-300.

Bohnenblust ME, Steigelman MB, Wang Q, Walker JA, Wang HT. An experimental design to study adipocyte stem cell for reconstruction of craniofacial defects. *J Craniofacial Surgery*. 2009; 20(2): 340-44.

Chen L, Peng EJ, Zeng XY, Zhuang QY, Ye ZQ. Comparison of the Proliferation, Viability, and Differentiation Capacity of

Adipose-Derived Stem Cells from Different Anatomic Sites in Rabbits. *Cell Tissues Organs*. 2012; 196(1): 13-22.

D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(7):1115-22.

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast and Reconstr Surg*. 1988; 81(5): 672-76.

De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Gragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedric MH. Comparison of Multi-Lineage Cells from Human Adipose Tissue and Bone Marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003; 174(3): 101-9.

Dodde II R, Yavuzer R, Bier UC, Lakadri A, Jackson IT. Spontaneous bone healing in the rabbit. *J. Craniofac Surg*. 2000; 11(4): 346-9

Domicini M, Le Blank K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4): 315-7.

Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2001; 30(1): 58-62.

Ferreira LM, Hochman B, Barbosa MVJ. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir. Bras.* 2005; 20 Suppl 2: 28-34.

Gaiba S, de França LP, de França JP, Ferreira LM. Characterization of human adipose-derived stem cells. *Acta. Cir. Bras.* 2012; 27(7): 471-6.

Gomillion CT, Burg KJL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials.* 2006; 27(36): 6052-63

Grant GA, Matthew J, Ellenbogen RG, Roberts TS, Gruss JE, Loeser JD. Failure of autologous bone-assisted cranioplasty following decompressive craniectomy in children and adolescents. *J Neurosurg.* 2004; 100(2 Suppl Pediatrics): 163-68.

Gu H, Xiong Z, Yin X, Li B, Mei N, Li G, Wang C. Bone regeneration in a rabbit ulna defect model: use of allogenic adipose-derived stem cells with low immunogenicity. *Cell Tissue Res.* 2014; 358(2): 453-464.

Hammerle CHF, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontology*. 2000; 2003(33): 36-53.

Hammerle CHF, Schmid J, Lang NP, Olah AJ. Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 53(2): 167-74.

Hammerle CHF, Schmid J, Olah AJ, Lang NP. Osseous healing of experimentally created defects in the calvaria of rabbits using guided bone regeneration. *Clin Oral Impl Res*. 1992; 3(3): 144-7.

Hicok KC, DuLaney TV, Zhou YS, Halvorsen YDV, Hitt DC, Cooper LF, Gimble JM. Human Adipose-Derived Adult Stem Cells Produce Osteoid in Vivo. *Tissue Engineering*. 2004; 10(3-4): 371-80.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terhetden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone graft in animals: a systematic review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2012; 41(1): 114-20.

Kessler P, Bumiller L, Sshlegel A, Birkholtz T, Neukam FW, Wiltfang J. Dynamic periosteal elevation. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 45(4): 284-7.



Khojasteh A, Eslaminejad MB, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical defects more than platelete-rich plasma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 106(3): 356-62.

Kim B-S, Choi M-K, Yoon J-H, Lee J. Evaluation of bone regeneration with biphasic calcium phosphate substitute implanted with bone morphogenetic protein 2 and mesenchymal stem cells in a rabbit calvarial defect model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015; 120(1): 2-9.

Kim S-H, Kim D-Y, Kim K-H, Ku Y, Rhyu I-C, Lee Y-M. The efficacy of a double-layer collagen membrane technique for overlaying block grafts in a rabbit calvarium model. *Clin Oral Imp Res.* 2009; 20(10): 1124-32.

Lendeck S, Jodicke A, Christophis P, Heindinger K, Wolff J, FRASE, JK, Hedrick MH, Berthold K, Howaldt HP. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2004; 32(6): 370-3.

Levi B, James AW, Nelson ER, Peng M, Wan DC, Commons GW, Lee M, Wu B, Longaker MT. Acute skeletal injury is necessary for human adipose-derived stromal cell-mediated

calvarial regeneration. *Plast. Reconstr. Surg.* 2011; 127(3): 1118-29.

Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS ONE.* 2014; 9(9): e107001.

Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D. Guided jaw-bone regeneration using an experimental rabbit model. *Int J. Oral Maxillofac Surg.* 1998; 27(2): 135-40.

Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge B. Guided bone regeneration of cranial defects using biodegradable barriers: an experimental pilot study in the rabbit. *J Cranio Maxillo-Facial Surg.* 1992; 20(6): 257-60.

Marolt D, Knezevic M, Novakovic GV. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2010; 4;1(2):10

Mazzetti MPV, Oliveira IS, Miranda-Ferreira R, Fauaz G, Ibeiro CN, Gomes PO, Pontes P, FerreiraA AT, EÇA LP. Qualitative and Quantitative Analysis of Rabbit`s Fat Mesenchymal Stem Cells. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 2010; 25(1): 24-7.

Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-Derived Stem and Progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118(3 Suppl):121S-128S.

Muscari C, Bonafe F, Flumana E, Oranges CM, Pinto V, Caldarer CM, Guarnieri C, Morselli PG. Comparison between stem cells harvested from wet and dry lipoaspirates. *Connective Tissue Research.* 2013; 54(1): 34-40.

Muschler GF, Midura RJ. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; Feb;(395): 366-80.

Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials.* 2010; 31(13): 3572-9.

Niemeyer P, Kornacker M, Mehlhorn A, Seckinger A, Vohrer J, Schmal H, Kasten P, Eckstin V, Sudkamp NP, Krause U. Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stem cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Tissue Engineering.* 2007; 13(1): 111-21.

Oliveira e Silva M, Pelegrine AA, da Silva AAP, Manhães-Junior LR, Mello e Oliveira R, França SG, Aloise AC, Ferreira LM. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: A tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int. J. Biomaterials*. 2012; 2012: 1-7.

Oliveira LC, Giovani AF, Abuabara A, Klug LG, Gonzaga CC, Zielak JC, Urban CA, Deliberador TM. Fragmented adipose tissue graft for bone healing: Histological and histometric study in rabbit's calvaria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(3): e510-e515

Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin. Oral Impl. Res*. 2014; 25(5): 567-72

Pelegrine AA, Costa CESd, Sendyk WR, Gromatzky A. The comparative analysis of homologous fresh frozen bone and autogenous bone graft, associated or not with autogenous bone marrow, in rabbit calvaria: a clinical and histomorphometric study. *Cell Tissue Bank*. 2010; 12(3): 171-84.

Penteado LAM, Colombo CED, Penteado RAPM, Assis AO, Gurgel CV. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich

Plasma for bone healing in rabbit calvarial defects. *J Oral Science*. 2013; 55(3): 225-32.

Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117(5): 1462-70.

Petrie C, Tholpady S, Ogle R, Botcwey E. Proliferative capacity and osteogênic potential of novel dura mater stem cells on poly-lactic-co-glycolic-acid. *J Biomed Mater Res*. 2008; A85 (1): 61-71.

Piatelli M, Favero GA, Scranio A, Orsinic G, Piatelli A. Bone reaction to anorganic bovine bone (BioOss) used in sinus augmentation procedure: a histologic long term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(6): 835-40.

Prunet-Marcassus B, Cousin B, Caton D, Penicaus MAL, Casteilla L. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: Site-specific differences. *Exper Cell Res*. 2006; 1;312(6): 727-36.

.

Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin. Oral Impl. Res.* 2010; 21(6): 567-76.

Rokn AR, Khodadoostan MA, Reza Rasouli Ghahroudi AA, Motahary P, Kharrazi Fard MJ, Bruyn HD, Afzalifar R, Soolar E, Soolari A. Bone formation with two types of grafting materials: a histologic and histomorphometric study. *Open Dent J.* 2011; 5: 96-104.

Rokn AR, Moslemi N, Eslami B, Abadi HK, Paknejad M. Histologic Evaluation of Bone Healing Following Application of Anorganic Bovine Bone and Beta-Tricalcium Phosphate in Rabbit Calvária. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences.* 2012; 9(1): 35-40.

Schmid J, Hammerle CHF, Olah AJ, Lang NP. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. *Clin Oral Impl Res.* 1994; 5(3): 125-30.

Sebastian S. Does preoperative scalp shaving result in fewer postoperative wound infections when compared with no scalp shaving? A sistematic review. *J Neurosci Nurs.* 2012; 40(3): 149-56

Shi Y, Niedzinski BS, Samaniego A, Bodgansky S, Atkinson BL. Adipose-Derived Stem Cells Combined with a Demineralized Calcellous Bone Substrate for Bone Regeneration. *Tissue Engineering*. 2012; 18(13-14): 1313-21.

Sohn J-Y, Park J-C, Um Y-J, Jung U-W, Kim C-S, Cho K-S, Choi S-H. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci*. 2010; 40(4): 180-187.

Smith DM, Cooper GM, Afifi AM, Mooney MP, Gray J, Rubin JP, Marra KG, Losee JE. Regenerative Surgery in Cranioplasty Revisited: The Role of Adipose-Derived Stem Cells and BMP-2. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 128: 1053-60

Tapp H, Hanley EN, PattJr JC, Gruber HE. Adipose-Derived Stem Cells: Characterization and Current Application in Orthopaedic Tissue Repair. *Experimental Biology and Medicine*. 2009; 234(1): 1-9.

Tirkkonen L, Haimi S, Huttunen S, Wolff J, Pirhonen E, Sandor GK, Miettinen. Osteogenic medium is superior to growth factors in differentiation of human adipose stem cells towards bone-forming cells in 3D culture. *Europ Cells and Materials*. 2013; 30(25): 144-58.

Zins JE, Langevin CL, Nasil S. Controversies in Skull Reconstruction. *J Caniofac Surg.* 2010; 21(6): 1755-60.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huanh JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002; 13(12): 4279-95.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang JI, Futrell WJ, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7(2): 211-28.



## **NORMAS ADOTADAS**

## NORMAS ADOTADAS

- Ferreira LM, Goldenberg S, Nahas FX, Ely PB. Orientação Normativa para Elaboração e Apresentação de Teses. São Paulo: Editora CEDC; 2008. p.1-91.
- Ferreira, A.B.H. Dicionário Aurélio da Língua Portuguesa. 5ª. ed. Curitiba: Editora Positivo; 2010
- Reference/Bibliography Vancouver Style  
(<http://www.icmje.org/>)

## **ABSTRACT**

## ABSTRACT

**Introduction:** The biomaterials commonly used in bone regeneration lack osteoinductive and osteogenic potential despite these biomaterials possess osteoconductive potential. **Objective:** To evaluate the association of adult mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (MSC-dAT) with xenogenic bone graft in bone regeneration in rabbit calvaria. **Methods:** MSC-dAT from 12 animals were combined with hydroxyapatite and implanted in 12 mm bilateral bone defects created in the calvaria of six rabbits (experimental group - EG), whereas only hydroxyapatite was implanted in the defects created in another group of six animals (control group - CG). One of the grafted sides in each animal of both groups was covered by a collagen membrane. After eight weeks, the animals were sacrificed and the region of the bone defects was removed and evaluated by histomorphometry and immunohistochemistry. **Results:** Histomorphometrically, the EG showed higher amounts ( $p < 0.05$ ) of vital and non-vital mineralized tissue ( $28.24\% \pm 6.17\%$  and  $27.79\% \pm 2.72\%$ , respectively), compared to the CG ( $13.06\% \pm 5.24\%$  and  $13.52\% \pm 3.00\%$ , respectively). In EG, no difference was observed ( $p > 0.05$ ) in the amount of mineralized tissue between the side that was covered by the membrane versus the side without membrane coverage. On the other hand, a statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) was observed in the control group with regard to the amount of mineralized tissue between the sides with and without membrane coverage. **Conclusions:** These observations suggest that the association of MSC-dAT with a xenogenic bone graft was capable of promoting better bone regeneration compared to use of a xenograft alone. Use of a membrane did not produce an increase in the regenerative potential for the EG, in contrast to the CG.

**ANEXOS**

## ANEXOS

## ANEXO 1. ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 29 de novembro de 2012  
CEP Nº: 0314/12

Ilmo(a) Sr(a)  
Pesquisador(a): ALLAN ZIMMERMANN  
Disciplina/Departamento Cirurgia Plástica/Cirurgia  
Pesquisadores associados: Antonio Carlos Aloise, Andre 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:** Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo associadas a enxerto xenólogo na regeneração óssea da calvária de coelhos ;

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

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

**OBJETIVO DO ESTUDO:** Avaliar o efeito da associação de CTM-Adp ao enxerto ósseo xenólogo na regeneração óssea da calvária de coelhos.

**RESUMO:** Estudo com 12 coelhos, Nova Zelândia, machos, com 12 semanas. Anestésico: quetamina. Analgésico: citrato de fentanila. Eutanásia: tiopental sódico. Serão utilizados os seguintes materiais: 1-Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Substituto ósseo xenogeno particulado. Origem bovina. 2- Bio-Gide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça): Membrana de Colágeno de origem bovina. Os animais serão distribuídos de forma randomizada pelo software Random Allocation em dois grupos com seis animais cada: Grupo 1 (Controle) e Grupo 2 (Experimental). Em todos os 12 animais serão criados dois defeitos ósseos circulares, com 12mm de diâmetro, na parte posterior da calvaria, sendo separados pela sutura sagital. Nos animais do grupo 1, ambos os defeitos serão preenchidos com Bio-Oss®. Os animais do grupo 2 receberão a associação de Bio-Oss® com células tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo. Nos 12 animais, um dos defeitos será coberto por membrana Bio-Gide® sendo a escolha do lado realizada de forma randomizada por envelope lacrado. As análises clínica, histomorfométrica e tomográfica serão realizadas por avaliador cego. Será realizado o óbito induzido dos animais, em grupos de seis, ao final de oito semanas.

**FUNDAMENTOS E RACIONAL:** As opções terapêuticas para os problemas envolvendo o tecido ósseo podem ser definidas pela quantidade de tecido ósseo perdido ou comprometido. Em defeitos ósseos considerados menores, ou seja, nos quais existe a reparação espontânea do tecido, nenhuma estratégia específica é instituída, porém, em defeitos ou danos extensos (defeitos críticos) poderá haver a necessidade de uma cirurgia reconstrutiva e eventual transplante ósseo. Neste caso o tecido autólogo seria a melhor e mais segura opção para a reparação óssea. Como em defeitos ósseos críticos, a utilização de substitutos ósseos repercute em déficit celular no interior do defeito, uma alternativa plausível seria a incorporação de células com potencial osteogênico. A utilização de CTM do tecido adiposo é promissora devido à facilidade de acesso ao tecido adiposo e sua abundância no corpo humano. O tecido adiposo pode ser apropriado para substituir o tecido ósseo na medicina regenerativa e engenharia tecidual (ET). As células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-Adp) podem ser obtidas por lipectomia e lipossucção e são capazes de manter o seu potencial de proliferação mesmo em pessoas mais velhas. Um estudo envolvendo a associação de CTM-Adp a biomateriais substitutos de enxertos autólogos poderia contribuir para uma maior eficiência destes materiais quando utilizados nos defeitos ósseos críticos.

**MATERIAL E MÉTODO:** Estão descritos os procedimentos do estudo, estando o projeto inserido na linha de pesquisa do laboratório.

**TCLE:** Não se aplica

**DETALHAMENTO FINANCEIRO:** Sem financiamento externo

**CRONOGRAMA DO ESTUDO:** 24 meses

**PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA :** 24/11/2013 e 19/11/2014

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.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina


Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo


Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'J. O. Medina Pestana', is written over a horizontal line.

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

## ANEXO 2. BULA BIO-OSS

 Przechowywać w suchym miejscu w temperaturze pokojowej (15–25 °C).

 Produkt jest jadalny; jeśli opakowanie nie zostało otwarte ani uszkodzone. Produktu nie wolno używać, jeśli opakowanie jadalowego produktu zostało uszkodzone.

**Asortyment**

Granulat kości gąbczastej Geistlich Bio-Oss®:  
Wielkość granulki: 1 mm – 2 mm  
Fiolki zawierające 0,5 g i 2,0 g  
Wielkość granulki: 0,25 mm – 1 mm  
Fiolki zawierające 0,25 g, 0,5 g i 2,0 g

Geistlich Bio-Oss® Collagen:  
Podwójne opakowanie blisterowe zawierające 1 uształowany blok granulatu kości gąbczastej i kolagenu.  
Wielkości bloków: 100 mg, 250 mg, 500 mg

Opakowanie połączone PERIO System:  
1 Geistlich Bio-Gide® Perio, 16 mm x 22 mm  
+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (100 mg)  
+ jadalowe szablony wzorów

Combi-Kit Collagen:  
1 Geistlich Bio-Gide®, 16 mm x 22 mm  
+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (100 mg)

Blok kości gąbczastej Geistlich Bio-Oss®:  
Podwójne opakowanie blisterowe zawierające 1 blok  
Wielkość bloku: 1 cm x 1 cm x 2 cm

**Wytwórca**

Geistlich Pharma AG  
Bahnhofstrasse 40  
CH-6110 Wolhusen / Szwajcaria

Data opracowania tej informacji: 01/2020

139

Geistlich Bio-Oss® Collagen. A consistência esponjosa do material permite uma adaptação simples. O colágeno facilita a adaptação de Geistlich Bio-Oss® ao sítio do defeito. O colágeno é lentamente reabsorvido ao longo de várias semanas.

**Indicações**

Geistlich Bio-Oss® granulado é recomendado para o enchimento de defeitos ósseos e para o aumento ósseo, p. ex.

- > Aumento/reconstrução de cristas alveolares
- > Enchimento de cavidades de extração
- > Implantologia: preparação dos sítios do implante; enchimento de desconcências ósseas e aumentos do pavimento sinusal
- > Periodontologia: enchimento de defeitos ósseos, suporte da membrana durante a regeneração óssea guiada (GTR)

Geistlich Bio-Oss® Collagen é recomendado para a reconstrução de defeitos ósseos na cirurgia maxilofacial e na cirurgia dentária, p. ex.:

- > Aumento/reconstrução de cristas alveolares
- > Enchimento de cavidades de extração
- > Periodontologia: enchimento de defeitos ósseos, suporte da membrana durante a regeneração óssea guiada (GTR)
- Geistlich Bio-Oss® bloco de osso canceloso é recomendado para:
- > Enchimento de defeitos ósseos

**Instruções de utilização**

Ao utilizar Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen deve seguir os princípios gerais de manipulação estéril e de medicação do paciente.

- > Eliminação completa do tecido de granulação a seguir à exposição do defeito.
- > Mistura de Geistlich Bio-Oss® granulado com o sangue do paciente ou com solução salina fisiológica antes do implante.

140

ba deve ser evitada até várias semanas após a inserção de Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen. Por experiência, a carga mecânica (carga de compressão) das áreas aumentadas com Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen é possível após um prazo mínimo de 6 meses. Geralmente, a altura apropriada da inserção do implante depende do volume de osso local residual.

**Efeitos secundários**

Não podem ser totalmente excluídas reações de incompatibilidade ao Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen. Como Geistlich Bio-Oss® Collagen contém citrato, em casos muito raros podem ocorrer reações alérgicas.

**Gravidez / aleitamento**

Não estão disponíveis dados sobre a utilização do produto durante a gravidez ou o aleitamento.

144

Português

**Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen**

Mineral ósseo natural para próteses ósseas

**Composição**

Geistlich Bio-Oss® é um mineral ósseo natural de origem bovina. A estrutura mineral osteocondutora altamente purificada é produzida a partir de osso natural num processo de purificação multi-fases, cumprindo os regulamentos de segurança mais rigorosos. Geistlich Bio-Oss® está disponível na forma de granulado de osso canceloso e na forma de bloco de osso canceloso. Devido à sua origem natural, Geistlich Bio-Oss® é comparável tanto química como estruturalmente ao osso humano mineralizado (apatite natural nanocristalina). Geistlich Bio-Oss® Collagen é uma mistura de granulado de osso canceloso e 10% de fibras de colágeno porcino em forma de bloco. A esterilização de Geistlich Bio-Oss® e

Geistlich Bio-Oss® Collagen é efectuada por radiação gama 

**Características / efeitos**

Geistlich Bio-Oss®. A matriz óssea inorgânica de Geistlich Bio-Oss® possui uma estrutura macro- e microporosa similar ao osso canceloso humano. Devido ao grande volume dos poros de interligação e da composição natural, a formação e o crescimento de osso novo no local do implante são encorajados. Com o decorrer do tempo, Geistlich Bio-Oss® é parcialmente remodelado por osteoclastos e osteoblastos (remodelação fisiológica). Devido às suas propriedades, Geistlich Bio-Oss® é uma alternativa viável ao osso autólogo em defeitos adequados.

140

Para além do controlo da placa, o enchimento dos defeitos periodontais com Geistlich Bio-Oss® ou Geistlich Bio-Oss® Collagen requer um tratamento cuidadoso da lesão periodontal (aplacamento da raiz, desbridamento) antes do implante. O defeito deve ser coberto com uma membrana de colágeno (p. ex., Geistlich Bio-Gide®) para uma boa regeneração tecidual.

**Limitações de utilização / Precauções****Contra-indicações**

- > Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen não deve ser utilizado na presença de feridas infectadas.
- > Geistlich Bio-Oss® Collagen não deve ser utilizado em pacientes com uma alergia conhecida ao colágeno.

**Precauções**

Geistlich Bio-Oss® e Geistlich Bio-Oss® Collagen deve ser apenas utilizado por dentistas e cirurgiões formados.

Geistlich Bio-Oss® / Geistlich Bio-Oss® Collagen deve ser utilizado com precaução especial em pacientes com:

- > infecção aguda ou crónica (p. ex., osteomielite) no sítio cirúrgico
- > disfunções metabólicas não controladas, p. ex., diabetes, osteomalácia, disfunção da tireóide, insuficiência renal ou hepática grave
- > terapêutica prolongada com corticosteróides
- > doença auto-imune
- > radioterapia
- > tabagismo agudo

Para assegurar a regeneração do osso, Geistlich Bio-Oss® só deve ser implantado em tecido ósseo vital e em contacto directo com o osso hospedeiro (caso seja necessário com microfractura da superfície do osso). Para defeitos mais extensos, a adição de osso canceloso autólogo ou de medula óssea pode melhorar o processo de regeneração. Por experiência, a mobilidade por carga mecânica (carga de

143



O produto encontra-se estéril se a embalagem permanecer fechada e não danificada. O produto não deve ser utilizado no caso da embalagem estéril ter sido danificada.

**Apresentação**

Granulado de osso canceloso Geistlich Bio-Oss®:

Tamanho do grânulo: 1 mm – 2 mm  
Frascos de 0,5 g e 2,0 g  
Tamanho do grânulo: 0,25 mm – 1,0 mm  
Frascos de 0,25 g, 0,5 g e 2,0 g

Geistlich Bio-Oss® Collagen:  
Embalagem blister dupla com 1 bloco pré-formado de granulado de osso canceloso e colágeno.  
Tamanhos dos blocos: 100 mg, 250 mg, 500 mg

+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (100 mg)  
+ moldes de estêncil estreis

Combi-Kit Collagen:  
1 Geistlich Bio-Gide®, 16 mm x 22 mm  
+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (100 mg)

Bloco de osso canceloso Geistlich Bio-Oss®:  
Embalagem blister dupla com 1 bloco  
Tamanho do bloco: 1 cm x 1 cm x 2 cm

**Fabricante**

Geistlich Pharma AG  
Bahnhofstrasse 40  
CH-6110 Wolhusen / Suíça

Estado da informação: 01/2020

145



## ANEXO 3. BULA BIO-GIDE


Português

Geistlich Bio-Gide® /  
Geistlich Bio-Gide® Perio

Membrana de bicamada reabsorvível para a regeneração tecidual

## Composição

Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio é uma membrana de colágeno produzida através de um processo de produção padronizado e controlado. O colágeno é obtido a partir de peixes certificados por um veterinário e é cuidadosamente purificado para evitar reacções imunológicas. Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio possui uma estrutura de bicamada: A superfície porosa, virada para o osso, permite o crescimento das células de formação óssea. A superfície densa, virada para os tecidos moles, evita o crescimento do tecido fibroso para o interior do defeito ósseo. A membrana consiste em colágeno natural sem ligações cruzadas ou aditivos químicos adicionais. Geistlich Bio-

Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio é esterilizada em embalagens blister duplas por radiação gama γ. 

## Características / efeitos

A baixa antigenicidade e uma excelente biocompatibilidade favorecem a utilização de Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio na cirurgia. Dados experimentais demonstraram que a duração da função de barreira assegura um tempo de formação óssea suficiente para as indicações abaixo apresentadas. A microestrutura fibrosa de Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio é hidrófila. A membrana retém a sua integridade estrutural mesmo estando molhada. A adaptação aos contornos da parede óssea é facilmente

cação da pressão varia em função do grau da hemorragia. A aderência à superfície do osso é facilitada pelas propriedades hidrófilas da membrana.

- A penetração completa da membrana pelo sangue e pelos exsudados permite uma adaptação e uma aderência perfeita da membrana ao defeito e facilita a formação de um coágulo sanguíneo por baixo da membrana.
- Se necessário, a fixação da membrana é possível devido à sua elevada força de tensão. A fixação pode estar indicada para evitar o deslocamento da membrana devido a carga ou inibitização.
- O retalho do tecido mole é suturado sobre a membrana com segurança e sem tensão (p. ex., suturas únicas e sutura em U), se possível.
- Geralmente e sempre que possível, a incisão deve ser completamente encerrada para evitar uma possível reabsorção acele-

- O osso e o espaço criado com o uso de preenchimento de espaço tal como osso autógeno ou substituto do osso (e.g. Geistlich Bio-Oss®), sempre que possível.
- A membrana é adaptada ao tamanho necessário com uma tesoura. A utilização de um molde (p. ex. folha de alumínio estéril) pode ser útil. A embalagem de Geistlich Bio-Gide® Perio contém ainda moldes de estêncil estéréis em 4 formas periodontais básicas diferentes. A membrana deve sobrepor-se às paredes do defeito em, pelo menos, 2 mm para permitir o contacto total com o osso e para evitar a invasão do tecido conectivo da gengiva lateralmente ao material.
- A superfície densa (Geistlich Bio-Gide®; marcada com «UP») (para cima) na margem da membrana deve ficar virada para os tecidos moles e a superfície porosa deve ficar virada para o osso.
- A membrana é aplicada sobre o defeito e mantida no lugar com pressão moderada.

123

Devido à aderência ao tecido ósseo e devido à elasticidade de Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio, a utilização de material de aumento ósseo é recomendada para criar e nutrir o espaço para a regeneração óssea. No caso de exposição da membrana (p. ex., deslização dos tecidos moles) durante a fase de cicatrização, o tempo de reabsorção pode ser acelerado. Geistlich Bio-Gide® Perio: Não implante os moldes de estêncil! As suas perfurações possibilitam que estes sejam distinguidos da membrana.

## Efeitos secundários

Como a membrana é um produto de colágeno, em casos muito raros podem ocorrer reacções alérgicas. Devido às características físicas especiais e devido ao tempo de reabsorção prolongado, em casos muito raros pode ocorrer uma ligeira reacção inflamatória. Possíveis complicações podem ocorrer com qualquer cirurgia, incluindo inchaço no local cirúrgico, formação de crosta no retalho,

hemorragia, inflamação local, perda óssea, infecção ou dor.

## Gravidez / aleitamento

Não estão disponíveis dados sobre a utilização do produto durante a gravidez ou o aleitamento. Por motivos de segurança, mulheres grávidas ou a amamentarem não devem ser tratadas com Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio.

## Outras informações

O conteúdo das embalagens blister duplas destina-se à utilização única.

Não é possível reesterilizar. Eliminar qualquer material não utilizado. Em caso de reutilização, a esterilidade e o funcionamento deixam de ser garantidos.

Não utilizar após o prazo de validade indicado.

144

alcançada. É possível proceder à fixação com suturas ou pinos. Devido à origem natural do colágeno pode notar-se uma ligeira saliência e variações na espessura da membrana. Geistlich Bio-Gide® Perio tem uma superfície alisada e mais densa do que o Geistlich Bio-Gide®. Como isso prolonga a captação de água, o corte para a aplicação periodontal é facilitado.

## Indicações

Geistlich Bio-Gide® e Geistlich Bio-Gide® Perio destinam-se à utilização como membrana barreira na regeneração de defeitos ósseos. Geistlich Bio-Gide® é utilizada após procedimentos de prótese óssea e para aumentar a formação dos tecidos moles, p. ex., em

- Procedimentos de GBR (Guided Bone Regeneration - regeneração óssea guiada)
- Aumento imediato ou retardado à volta de implantes colocados em cavidades de extração

clínica demonstra uma cicatrização satisfatória na maioria dos casos, mesmo quando o encerramento completo da incisão não é possível.

## Instruções especiais para a utilização em periodontologia

- Um requisito básico para o tratamento periodontal bem sucedido inclui o controlo de qualquer infecção bacteriana, assim como uma higiene oral cuidadosa. Aconselha-se, por isso, que antes da intervenção cirúrgica haja uma fase de higiene que deve incluir o ensaio adequado do paciente. Uma fase de manutenção pós-operatória pode assegurar um sucesso terapêutico a longo prazo.
- Para evitar a formação de um epitélio de junção longo, Geistlich Bio-Gide® Perio deve ser adaptada junto ao dente (caso necessário com fixação adicional utilizando material de sutura).

- Reconstrução da crista alveolar
  - Enchimento de defeitos ósseos na área maxilofacial
  - Cirurgias de encerramento de fendas
- Geistlich Bio-Gide® Perio está especialmente indicada para defeitos ósseos periodontais. Devido à sua elasticidade, Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio deve ser utilizada em combinação com materiais de prótese óssea de enchimento de vazios, tais como osso autógeno ou substitutos de osso (p. ex. Geistlich Bio-Oss®), sempre que possível.

## Instruções de utilização

Ao utilizar Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio, deve seguir os princípios gerais de manipulação estéril e de medicação do paciente:

- Depois de exposto o defeito, são empregados procedimentos cirúrgicos habituais (curetagem, etc.).

## Contra-indicações

Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio não deve ser utilizada na presença de:

- feridas infectadas;
- alergia conhecida ao colágeno

## Precauções

- Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio deve ser apenas utilizada por dentistas e cirurgiões formados.
- Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio deve ser utilizada com precaução especial em pacientes com:
- infecção aguda ou crónica (p. ex., osteomielite) no sítio cirúrgico;
  - doenças metabólicas não controladas, p. ex., diabetes, osteomalácia, disfunção da tireóide;
  - terapêutica prolongada com corticosteróides;
  - doença auto-imune
  - radioterapia
  - tabagismo agudo

141

143

Conservar à temperatura ambiente (15–25 °C) em local seco.

O produto encontra-se estéril se a embalagem permanecer fechada e não danificada. O produto não deve ser utilizado no caso da embalagem estéril ter sido danificada.

## Apresentação

Geistlich Bio-Gide® / Geistlich Bio-Gide® Perio é embalado em embalagens blister duplas estéréis:

- Geistlich Bio-Gide®, 1 membrana, dimensões 25 mm x 25 mm
- Geistlich Bio-Gide®, 1 membrana, dimensões 30 mm x 40 mm
- Geistlich Bio-Gide® Perio, 1 membrana, dimensões 16 mm x 22 mm + moldes de estêncil estéréis

PERIO System Combi-pack  
1 Geistlich Bio-Gide® Perio, 16 mm x 22 mm  
+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (200 mg)  
+ moldes de estêncil estéréis

Combi-Kit Collagen:  
1 Geistlich Bio-Gide®, 16 mm x 22 mm  
+ 1 Geistlich Bio-Oss® Collagen (100 mg)

## Fabricante

Geistlich Pharma AG  
Bahnhofstrasse 40  
CH-6110 Wolfhusen / Suíça

Estado da informação 01/2010

145

## ANEXO 4. ACEITE DA REVISTA

**The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants - JOMI-2014-425/R1 - (4164): Accept**

**De:** The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants  
aca.orto@uol.com.br **Para:**

**Cópia:** seeckert@mayo.edu Cópia oculta:

**Assunto:** *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants - JOMI-2014-425/R1 - (4164): Accept* **Data:** 29/06/2015 18:27

Manuscript: JOMI-2014-425/R1 - (4164) - Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model

Dear Professor Aloise

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

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

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

Sincerely,

Steven Eckert, DDS, MS Editor in Chief IJOMI

## **FONTES CONSULTADAS**

**FONTES CONSULTADAS**

CYAGEN BIOSCIENCES/RODENTS Rabbit Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. Disponível em <http://www.cyagen.com/product/Rabbit+Adipose-Derived+Mesenchymal+Stem+Cells-289.html>

DeCS Descritores em Ciências da Saúde [base de dados na Internet]. São Paulo: BIREME; Disponível em: <http://decs.bvs.br/>

Guia Brasileiro de Boas Práticas para Eutanásia de Animais. CFMV. Disponível em [http://www.cfmv.gov.br/portal/\\_doc/guiabbp\\_eutan%C3%A1sia\\_animal.pdf](http://www.cfmv.gov.br/portal/_doc/guiabbp_eutan%C3%A1sia_animal.pdf)

Hochman B, Nahas FX, de Oliveira Filhos RS, Ferreira LM. Desenhos de Pesquisa. Acta Cir Bras v. 20 suppl 2 2005 ISSN 1678-2674 11p disponível em [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-86502005000800002&script=sci_arttext)

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Writing and editing for biomedical publication [text on the Internet]. Vancouver (CA); update 2004 Oct .Available from: <http://www.icmje.org/>

TORRES FC, “Panículo adiposo interescapular de coelho da espécie *Oryctolagus cuniculus* como fonte de células-tronco. Tese apresentada à Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor. São Paulo, S.P., 2009. 108p