

MARCELO MELO SOARES

**CÉLULAS MESENQUIMAIS ADULTAS
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA
DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA DA MANDÍBULA
EM COELHOS PÓS RADIAÇÃO IONIZANTE**

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

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

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

COORDENADOR: Prof. Dr. MIGUEL SABINO NETO

MARCELO MELO SOARES

**CÉLULAS MESENQUIMAIS ADULTAS
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO NA
DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA DA MANDÍBULA
EM COELHOS PÓS RADIAÇÃO IONIZANTE**

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

ORIENTADORA: Profa. Dra. LYDIA MASAKO FERREIRA

CO-ORIENTADORES: Prof. ANTONIO CARLOS ALOISE

Profa. SILVANA FRANÇA GAIBA

São Paulo

2016

Melo Soares, Marcelo

Células-tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo na distração osteogênica da mandíbula em coelhos pós radiação ionizante . /
Marcelo Melo Soares. – São Paulo, 2016.

xiv, f.109

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

Título em Inglês: **Adipose Derived Stem Cell on the Regeneration of Irradiated Adult Rabbit Mandibule Submitted to Distraction Osteogenesis.**

1. Células-Tronco, Osteogênese por Distração, Células Mesenquimais Estromais, Transplante de Células-tronco

Aquilo que se faz por amor está
sempre além do bem e do mal.

Friedrich Nietzsche

DEDICATÓRIA

*À minha esposa Claudia e meus filhos Artur e Érico
por serem o alicerce que sustentam meu caminho*

AGRADECIMENTOS

À PROF^a. DR^a. LYDIA MASAKO FERREIRA, TITULAR DA DISCIPLINA DE CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP), orientadora desta Tese, pela sua seriedade e comprometimento científico sempre presente e pronta a incentivar e ajudar em todos os passos desta jornada. Muitas pessoas ensinam pelas palavras, a professora Lydia nos ensina pelo seu exemplo e inspiração de uma busca incansável pela conhecer.

Ao PROF. Dr. MIGUEL SABINO NETO, PROFESSOR LIVRE DOCENTE, COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA TRANSLACIONAL DA UNIFESP, pela sua dedicação e disponibilidade, um exemplo de dedicação, ética e profissionalismo como professor e pesquisador.

Ao PROF. ANTÔNIO CARLOS ALOISE, PROFESSOR AFILIADO DEPARTAMENTO de CIRURGIA da ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO e ORIENTADOR DO MESTRADO PROFISSIONAL UNIFESP, co-orientador da presente Tese, pelo acolhimento, excelência do seu trabalho, profundo conhecimento do tema, por sua dedicação e à forma serena e sempre presente no desenvolvimento deste trabalho.

À PROF^a. 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.

À PROF^a. DR^a. HELENA REGINA SEGRETO, PROFESSORA ADJUNTA DO SETOR RADIOTERAPIA DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pela simpatia e imediato acolhimento dentro do setor de radioterapia, mais um exemplo de compromisso com a ciência que tive o privilégio de conhecer neste trabalho.

AO FÍSICO ANDRE ,FÍSICO RESPONSÁVEL DO SETOR DE RADIOTERAPIA DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO, pelo seu engajamento no trabalho, sempre disponível a executar e ajudar na orientação e na aplicação da radioterapia e seus efeitos físicos.

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

AOS PROFS NEIL FONSECA NOVO E PROF^a. YARA JULIANO PROFESSORES TITULARES DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE SANTO AMARO e os PROFESSORES COLABOLADORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA CURURGIA TRANSLACIONAL UNIFESP pela orientação execução, apoio e esclarecimentos relativos a estatística enviada neste trabalho

AO DR. ROBERTO MANSINI, PROPRIETÁRIO DA CADO RADIOLOGIA, por ceder o tomógrafo para a realização dos exames de tomografia nos coelhos estudados

AOS COLEGAS PÓS-GRADUANDOS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA PLÁSTICA DA UNIFESP, pelas dicas sugestões e orientações e companheirismo durante nossa jornada.

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 amizade, atenção, consideração e profissionalismo.

AO “JUNIOR” TÉCNICO E DEMAIS FUNCIONÁRIOS DO BIOTÉRIO, pelo auxílio no cuidado com os animais envolvidos neste experimento.

Em um trabalho translacional, obrigatoriamente muitas áreas do conhecimento estão envolvida, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a execução e conclusão da presente Tese.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	vi
LISTAS DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	7
3. LITERATURA	9
4. MÉTODOS	38
5. RESULTADOS	69
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO	89
8. REFERÊNCIA	91
NORMAS ADOTADAS	100
ABSTRACT	102
ANEXOS	104
FONTES CONSULTADAS	107

LISTA DE FIGURAS	Página
Figura.1. Remoção tecido adiposo	43
Figura.2. Fixação e homogenização da area irradiada	44
Figura.3. Calibragem da área irradiada	45
Figura.4. Escopia da área irradiada	45
Figura.5. Radiação ionizante	46
Figura.6. Demarcação das referências anatomicas	48
Figura.7. Foramen mentoal e borda inferior da mandíbula	49
Figura.8. Osteotomia e distrator instalado	50
Figura.9. Sutura e distrator exteriorizado	51
Figura.10. Esquema da area de Injeção	53
Figura.11. Diferenciação adipogênica	58
Figura.12. Diferenciação osteogênica	60
Figura.13. Diferenciação condrogênica	62
Figura.14. Zonas fibro vasculares avaliadas	65
Figura.15 Histomorfometria	67
Figura.16. Laterognatia	70
Figura.17. Osso neo-formado	71

LISTA DE TABELAS	Página
Tabela 1 Imunofenotipagem	72
Tabela 2 Escala de Hounfield/Zona lateral	73
Tabela 3 Escala de Hounfield/Zona central	73
Tabela 4 Histomorfometria zona fibro Vascular lateral anterior	74
Tabela 5 Histomorfometria zona Fibro Vascular lateral posterior	75
Tabela 6 Histomorfometria zona Fibro Vascular lateral posterior	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AINH	Antiinflamatório não hormonal
ANA	Analgésico
ATB	Antibiótico
BC	Bifosfato de cálcio
BMP	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CT	Células-tronco
CTM	Células-tronco mesenquimais
CTM-Adp	Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
DO	Distração osteogênica
DP	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium + nutrient F12 mixture</i>
GC	Grupo controle
GE	Grupo experimento
Ho	Hipótese nula
IM	Intra muscular

INCA	Instituto Nacional do Câncer
IV	Intra venoso
OII	Óbito indolor induzido
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PRP	Plasma rico em plaquetas
SF	Soro fisiológico
SFB	Soro fetal bovino
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
TA	Tecido adiposo
VEGF	<i>Vascular endothelia growth factor</i>
SDF	<i>Stromal derived factor</i>
VO	Via oral
UI	Unidades internacionais
ZFVC	Zona fibro vascular central
ZFVD	Zona fibro vascular distal
ZFVL	Zona fibro vascular lateral
ZFCM	Zona fibro vascular mesial

RESUMO

Introdução: A radioterapia induz a diversas alterações na regeneração do tecido ósseo quando submetido a distração osteogênica (DO). As células-troco tem demonstrado a capacidade de incrementar a mineralização em mandíbula não irradiadas submetidas a DO. **Objetivo:** Avaliar o efeito da administração de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo em mandíbulas de coelhos irradiadas, submetidas à distração osteogênica. **Métodos:** Foram selecionados 10 coelhos adultos machos (raça Neo Zelandês). O panículo adiposo dorsal dos animais foi removido para coleta de células tronco e os animais foram submetidos à irradiação ionizante com dose única de 20Gy na mandíbula. Após 30 dias os animais foram submetidos a cirurgia de alongamento do corpo de mandíbula por distração osteogênica com cinco dias de latência e alongamento ao ritmo de 2mm/dia por cinco dias. Ao fim do período de alongamento, os animais foram randomicamente divididos em dois grupos: no grupo de estudo foram injetadas (após cultura e testes de diferenciação e caracterizações) células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. No grupo controle, foi injetada solução de soro fisiológico a 0,9%. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e as peças de estudo removidas para avaliações tomográficas e histomorfométricas. **Resultados:** A tomografia mostrou significativa melhora na escala de Hounsfield (ZFVL no GC 114,5 e no GE 148 $p= 0.0,0045^*$, e na ZFVC, controle 37, no GC para 96 GE, $p=0.0045^*$). A avaliação por histomorfometria demonstrou aumento da porcentagem de tecido mineralizado nas três áreas estudadas, (ZFVD 37,5% no GC para 75.9% para GE $p=0.0002^*$, na ZFVM 39,1% no GC para 79,1% no GE $p=0,0001^*$ ZFVC, 31,3% no GC para 61,2% no GE $p= 0.045^*$). **Conclusão:** A adição de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo podem aumentar a maturação do tecido ósseo neoformado na distração osteogênica mandibular em coelhos irradiados.

Palavras Chave: mandible distraction osteogenesis, Stem cell, radiotherapy

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A radioterapia é uma técnica de ampla utilização no tratamento de diversos tumores, aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes portadores de câncer. O câncer de boca é o quarto mais comum no Brasil. Segundo informações do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa oficial é de 15490 casos dos quais 11140 em homens e 4350 em mulheres para o ano de 2016 (inca.gov.br). A irradiação ionizante pode diretamente ou indiretamente alterar a cadeia de DNA das células, acarretando na sua apoptose (CHANDRA *et al.*, 2015). Apesar deste efeito ser desejado nas células tumorais, inevitavelmente as células não tumorais vizinhas ao foco da irradiação serão afetadas, dando início a uma cascata de eventos que irão produzir efeitos colaterais indesejados a médio e longo prazo (JERECZEK & ORECCHIA, 2002). Altas doses de radioterapia em mandíbulas pode produzir pseudoartrose no tecido ósseo e até o surgimento de necrose óssea (HEE-KYUN *et al.*, 2009).

Dentre os vários fatores deletérios da radioterapia, um deles a osteoradionecrose pode ocorrer devido à hipóxia, hipovascularização e hipocelularidade nos tecidos locais. Estas complicações da radioterapia são

Introdução

consideradas como sendo os fatores que mais interferem na regeneração tecidual (REUTHER *et al.*, 2003).

Tanto o tecido ósseo nativo quanto enxertos ósseos, após a radioterapia, estão sujeitos ao processo de apoptose das células osteoprogenitoras, osteócitos, osteoblastos e células endoteliais que leva à hialinização e fibrose progressiva do espaço medular. Conseqüentemente reduz a vascularização no tecido ósseo, o que pode ser causa de muitas complicações como a osteoradionecrose (NABIL & SAMMAN, 2011).

As reparações das sequelas decorrentes das cirurgias ablativas em pacientes portadores de tumores ósseos submetidos à radioterapia têm sido grande desafio à cirurgia. Enxertos ósseos autógenos e retalhos microcirúrgicos são amplamente utilizados na reparação destes defeitos, sendo que nos últimos anos, os retalhos microcirúrgicos de fíbula, ilíaco e escápula têm substituído os enxertos ósseos oferecendo resultados estéticos e funcionais superiores (HAYDEN *et al.*, 2012).

Apesar de sua ampla utilização, a reconstrução óssea utilizando substitutos ósseos tem apresentado limitações quanto à cobertura mucosa e cutânea devido à alta incidência de infecção, necrose óssea, morbidade e limitação dos leitos doadores, o que pode limitar a sua aplicação (CHRCANOVIC *et al.*, 2010; LOPES ARCAZ *et al.*, 2010).

A osteoradionecrose é a maior complicação decorrente da radioterapia no tratamento de tumores que afetam a mandíbula podendo ocorrer de 4% a 30% dos

Introdução

casos, podendo se manifestar por meio de ulceração da mucosa, exposição do tecido ósseo necrótico, dor, trismo e supuração na área afetada (REUTHER *et al.*, 2003). A progressão da osteoradionecrose pode resultar na formação de fístulas e fratura patológica da mandíbula, requerendo tratamento por oxigenoterapia hiperbárica e extensivas cirurgias de debridamento (HEE-KYUN *et al.*, 2009; CHRCANOVIC *et al.*, 2010).

As complicações decorrentes dos enxertos e retalhos na reconstrução mandibular pós-radioterapia têm gerado busca por outras alternativas na reconstrução óssea mandibular (REUTHER *et al.*, 2003; HEE KYUN *et al.*, 2009; NABIL & SAMMAM 2011).

A distração osteogênica é uma técnica que consiste no alongamento progressivo de um segmento ósseo osteotomizado, sendo aplicada na correção de deformidades crânio faciais congênitas como microssomias hemifaciais, fissuras palatinas, ou adquiridas por sequelas da anquilose da articulação têmporo mandibular na infância, sequelas de trauma e correções de atrofia do rebordo alveolar. Apresenta como grande vantagem a capacidade de gerar osso neoformado na zona de alongamento ou zona fibrovascular com a capacidade de alongar os tecidos moles adjacentes, através de cirurgias de baixa morbidade (RACHIMEL *et al.*, 2012). A distração osteogênica pode ser uma alternativa aos enxertos, reduzindo a morbidade ao eliminar leitos doadores e reduzindo o acesso, preservando assim o leito vascular. (GONZALES-GARCIA & NAVAL-GUIAS., 2010; HAYDEN *et al.*, 2012). Em grandes perdas segmentares de mandíbula, a distração osteogênica

Introdução

tem sido aplicada através do transporte de um segmento mandibular ou, de forma secundária na correção da altura do rebordo nos retalhos microcirúrgicos de tibia prévio à instalação de implantes osseointegráveis(GONZALES&GARCIA, NAVAL&GUIAS., 2010, ANDRADE *et al.*, 2011, PICHEMAYER, ZEMANN., 2012, WATANABE *et al.*, 2012).

Apesar dos bons resultados relatados, sua aplicação no tratamento de sequelas de cirurgias ablativas, pós radioterapia, ainda é controverso. A radiação ionizante pode reduzir a osteogênese na zona de regeneração óssea, produzindo ilhas de cartilagem e fibrose no interior do osso alongado, reduzindo a qualidade e quantidade de osso neoformado(TSUCHIYA *et al.*, 2005). Estudos em modelos animais e clínicos tem mostrado que a radioterapia pode prejudicar a regeneração óssea reduzindo a qualidade do osso neoformado na distração osteogênica, causando necrose e formação de sequestros durante tal procedimento (TSUCHIYA *et al.*, 2005; HIBI *et al.*, 2006).

Células-tronco derivadas do tecido adiposo têm se tornado uma opção em terapias regenerativas, devido a população de células multipotentes, sendo aceitas como uma alternativa ao uso de células-tronco mesenquimais adultas derivadas de medula óssea uma vez que ambas apresentam similaridades fenotípicas (ZHU *et al.*, 2012).

O tecido adiposo se constitui em uma fonte abundante de células autólogas para uso em Engenharia Tecidual (ET), que se utiliza de ; fonte celular, fatores de crescimento celular e arcabouço (MOILI *et al.*, 2008; JUNG *et al.*, 2015). A união

Introdução

Entre célula, fatores de crescimento e arcabouço constitui um *construct* sendo que aqueles que utilizam células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo têm minimizado os seus problemas de imunogenicidade. Outra característica destas células é o seu cultivo padronizado para uma expansão *ex vivo* (MAZZETTI *et al.*, 2010; GAIBA *et al.*, 2012).

Devido ao grande potencial clínico no tratamento de diversas deformidades, as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo têm sido amplamente estudadas na regeneração de tecidos moles e ósseos (AIMAITI *et al.*, 2011), no entanto nenhum estudo avaliando a ação das células tronco em mandíbulas irradiadas e submetidas a distração foi encontrado na literatura estudada.

OBJETIVO

2-OBJETIVO

Avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, na regeneração do tecido ósseo neoformado por distração osteogênica em mandíbula irradiada de coelhos.

LITERATURA

3. LITERATURA

TSUBOTA *et al.* (1999) estudaram os efeitos do transplante de células tipo *osteoblast-like* no calo ósseo neoformado na distração osteogênica. Neste estudo, os autores cultivaram células tipo osteoblásticas derivadas do perióstio de coelhos. Realizou-se osteotomia e alongamento da tíbia do coelho e enxertaram as células cultivadas após o término do alongamento. Duas e quatro semanas depois do enxerto a área transaxial do osso neoformado foi avaliada quanto à densidade mineral e à resistência mecânica. A densidade mineral mostrou-se significativamente maior nos grupos que receberam enxerto celular nas duas avaliações, de duas e quatro semanas. A resistência mecânica, no entanto, apesar de superior no grupo enxertado não apresentou diferenças significativas.

JERECZEK & ORECCHIA (2002) revisaram as complicações relatadas na literatura referentes a radioterapia em mandíbula e concluíram que este é o osso mais acometido por osteorradionecrose, sendo reportadas incidências de 4 a 56% dos casos. Segundo os autores, a incidência é maior nos três primeiros anos pós irradiação, no entanto o término do risco é indefinido. O tratamento da osteorradionecrose inclui oxigenoterapia, sequestrotomia e em casos extremos hemimandibulectomia.

PACICCA *et al.* (2003) investigaram a ação da distração na formação de vasos sanguíneos no osso neoregenerado. Os autores realizaram alongamento por distração

osteogênica e fraturas, sendo avaliado por imunohistoquímico no limite da zona de alongamento, a expressão dos fatores angiogênicos angioproteína 1 e 2, *vascular endothelial growth factor-A* (VEGF-A), *neuropiline* *bone morphogenic protein* (BMP). O estudo demonstrou que tanto a zona de fratura quanto a distração osteogênica apresentam a expressão dos genes estudados, no entanto a expressão dos fatores é máxima na fase ativa da distração osteogênica. O estudo sugeriu que a distração osteogênica fosse acompanhada pela indução na expressão dos fatores associados a angiogênese.

CAMPISI *et al.* (2003) estudaram a expressão das proteínas ósseas morfogenéticas durante a distração osteogênica em mandíbulas de coelhos. Este estudo foi realizado por meio de alongamento de mandíbulas (0,5mm /15 dias), em 14 coelhos. Os animais foram sacrificados em pares a cada semana após a cirurgia, sendo as peças avaliadas através de estudos histológico e imunohistoquímico. A expressão das proteínas ósseas morfogenéticas 2, 4 e 7 foram mensuradas. Os autores relataram um aumento na expressão das proteínas ósseas morfogenéticas 2 e 4 na atividade osteoblástica durante as fases iniciais da distração osteogênica, e em condrócitos no período de consolidação. A proteína óssea morfogenética 7 demonstrou uma expressão em osteoblastos relativamente menor. Todas as proteínas ósseas morfogenéticas estudadas foram fortemente expressas nos tecidos conectivos vasculares durante a distração osteogênica. Os resultados encontrados pelos autores

indicaram que as proteínas estudadas participaram da transdução de estímulos mecânicos em resposta biológica durante a distração osteogênica.

MIZUMOTO *et al.* (2003) estudaram a reparação óssea induzida por BMP 7 em tíbias de ratos submetidas a osteotomia em comparação a distração osteogênica associada a BMP 7. As avaliações foram realizadas através de exames radiográficos e testes de fadiga biomecânica. Os autores demonstraram aumento na densidade mineral da área alongada, nos testes biomecânicos houve um aumento significativo no torque de fratura para grupo submetido à distração osteogênica.

KNIPPENBERG *et al.* (2005) estudaram a resposta de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo quando estimuladas por stress mecânico induzido por fluxo líquido pulsante na sua diferenciação em células osteoprogenitoras *in vitro*. Os autores encontraram a diferenciação das células-tronco em células osteoprogenitoras como resposta aos estímulos por fluxo pulsátil após, a estimulação por 1,25 dihidroxivitamina D3. O fluxo de líquido pulsante aumentou a produção de óxido nítrico e de ciclooxigenase-2, mas não foi encontrado aumento em ciclooxigenase-1. Os dados encontrados sugerem que as células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo diferenciam-se em células osteoprogenitoras através de estímulos por fluxo de líquido pulsante em 1,25 dihidroxivitamina D3.

TSUCHIYA *et al.* (2005) investigaram os efeitos da irradiação pré operatória na formação do calo ósseo durante a distração osteogênica. Irradiou-se a pata de coelhos (dose única) e realizaram o alongamento da tíbia por quatro semanas (ritmo

de 0,5mm/dia). O osso neoformado foi avaliado radiográfica e histologicamente. A avaliação radiográfica mostrou pouca maturação óssea no grupo irradiado, com falhas no calo ósseo e neoformação óssea incompleta e falha no centro da área alongada, que foi preenchida com tecido conectivo. Após quatro semanas do alongamento, a maior parte da área radiolúcida consistia de tecido cartilaginoso. A ossificação encontrada foi do tipo endocondral e a avaliação por imuno-histoquímica revelou que os níveis de expressão dos fatores endoteliais de crescimento vascular nos osteoblastos estavam elevados, porém a microangiografia revelou redução na vascularização da área alongada. Segundo os autores, a irradiação pode causar a redução na angiogênese o que resulta em pobre neoformação óssea durante o processo de distração osteogênica.

HIBI *et al.* (2006) relataram a associação de distração osteogênica e engenharia tecidual na reabilitação da mandíbula de paciente submetido à reconstrução mandibular por pedículo microcirúrgico de fíbula e radioterapia. O retalho da fíbula foi expandido de 10 a 25mm em altura a fim de receber implantes, sendo infiltrado com uma combinação de células-tronco mesenquimais derivadas de medula e plasma rico em plaquetas (PRP) na área de alongamento e interface de consolidação entre o osso nativo e o retalho. Apesar de uma laceração no tecido mole relatada pelos autores, seis implantes foram instalados e obtiveram sucesso na sua osteointegração, recebendo reabilitação protética.

DOMICINI *et al.* (2006) relataram os critérios que a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs para definir as células-tronco mesenquimais (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 α 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 α (que se expressam nas células B). Relativamente aos marcadores de macrófagos e células B, a SITC considera como suficiente o teste de apenas um dos marcadores.

SHAO *et al.*(2006) estudaram o efeito da injeção de células-tronco mesenquimais derivadas de medula na neo-formação óssea durante a distração osteogênica.Os autores realizaram distração osteogênica bilateral em 15 coelhos

adultos com sete dias de latência e alongamento de 2mm/dia por cinco dias. As células-tronco mesenquimais foram coletadas da medula do íliaco e cultivadas a uma população de 10^6 em 0.5ml e então transplantadas unilateralmente na área de alongamento. Os animais foram sacrificados em duas, quatro e seis semanas e realizadas avaliações histológicas, radiografias histomorfométricas e análise por microscopia eletrônica de varredura. A densidade mineral foi avaliada por absorção de radiografia de dupla energia. Os resultados relatados mostraram um significativo aumento na densidade radiográfica no calo ósseo injetado com células tronco. Estes achados foram semelhantes aos observados na avaliação histológica, onde foram visualizadas ilhas de cartilagem no grupo controle e maior formação e organização do tecido ósseo no grupo com células-tronco mesenquimais derivadas de medula. Segundo os autores, o método promoveu maior maturação do tecido na regeneração óssea durante a distração osteogênica.

CLARCK *et al.* (2006) avaliaram os efeitos da oxigenoterapia por câmara hiperbárica na regeneração óssea durante a distração osteogênica de mandíbulas irradiadas de coelhos. Os autores utilizaram vinte coelhos (adultos Nova Zelândia), que foram submetidos a corticotomia e instalação de distrator e aplicado protocolo de alongamento ósseo com três dias de latência e ritmo de 1mm/dia de alongamento por 14 dias. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle, radioterapia pré operatória, oxigenoterapia por câmara hiperbárica pré e pós-operatória e radioterapia pré-operatória e oxigenoterapia por câmara hiperbárica pré e

pós-operatória. Após 30 dias, os animais foram eutanasiados e avaliados por radiografias e histomorfometricamente. A avaliação histomorfométrica demonstrou aumento na neoformação óssea no grupo submetido a oxigenoterapia por câmara hiperbárica.

DJASIM *et al.* (2007) revisaram os estudos envolvendo modelos animais de distração osteogênica crânio-facial, a fim de determinar as recomendações e parâmetros para este modelo de estudo. Selecionaram-se os estudos publicados na base de dados Pubmed no período compreendido entre janeiro de 1973 a janeiro de 2007, avaliando os parâmetros e modelos utilizados. O período de latência poderia não ser necessário, sendo o ritmo de alongamento de 1mm o mais utilizado, preferencialmente em ritmo contínuo uniforme de 1mm dia. O período de consolidação mais adotado nos estudos foi o compreendido entre seis a oito semanas. Dentre os animais envolvidos nos estudos, os mais utilizados foram os coelhos seguidos por ratos e ovelhas.

MOIOLI *et al.* (2008) avaliaram a relação entre o cotransplante de células hematopoiéticas e células-tronco mesenquimais no incremento da angiogênese. Neste estudo, os autores utilizaram como modelo a cultura de células mesenquimais progenitoras colhidas de medula óssea de humanos. O material foi então enxertado no dorso de ratos imunodeprimidos. A avaliação histológica demonstrou um aumento em número e em diâmetro dos vasos no interior do enxerto. O estudo por imunohistoquímica revelou aumento na concentração de osteocalcina bem como

no fator endotelial de crescimento vascular, sugerindo que o transplante de células mesenquimais progenitoras hematopoiéticas pode incrementar a formação de vasos sanguíneos.

LEE *et al.* (2008) estudaram a capacidade de mobilização das células progenitoras endoteliais durante a reparação óssea em fratura e distração osteogênica. Comparou-se a proporção esplênica de células progenitoras endoteliais mensurando nas fraturas e características de linhagem endoteliais por marcadores celulares de superfície, sendo o RNA mensageiro analisado pela proteção de ribonuclease e pela reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (q-PCR). A distração osteogênica foi avaliada pela distribuição *ex vivo* e infusão intravenosa de células progenitoras endoteliais na mensuração do fluxo sanguíneo. Segundo os autores, a proporção de células progenitoras endoteliais aumentou de forma periférica e esplênica e atingiu pico no terceiro dia pós fratura, retomando a níveis basais na fase de cicatrização. A expressão de RNAm e citoquinas como fatores angiogênicos endoteliais e monócitos quimiotáticos permaneceram elevados na área de fratura, os níveis de fatores de crescimento vasculares endoteliais seguiram padrão de elevação, na proporção de células progenitoras endoteliais. No modelo de distração osteogênica, o padrão de comportamento das células progenitoras endoteliais se assemelhou ao encontrado nas fraturas, no entanto a proporção aumentou significativamente durante a distração no período de consolidação (ou maturação). A área fibrovascular se mostrou relativamente isquêmica na fase de alongamento,

porém houve uma profusão do fluxo sanguíneo na fase de consolidação. Os achados dos autores sugerem que a sinalização celular durante a reparação óssea mobiliza células progenitoras endoteliais da medula óssea para a circulação periférica contribuindo com a neovascularização e portanto com a cicatrização óssea.

HEE-KYUN *et al.* (2009) avaliaram sua experiência com pacientes portadores de osteorradionecrose e identificaram os fatores que contribuem para o progresso. Através da revisão de retrospectiva de 114 pacientes divididos em dois grupos: o primeiro que recebeu doses moderadas e tratamento conservador e outro grupo com pacientes que não responderam ao tratamento conservador e necessitaram de cirurgias mais agressivas de ressecção óssea. Houve grande influência de fatores como tabagismo e álcool nos pacientes que apresentaram mais frequência e maior gravidade nas complicações, representando alto risco à radioterapia.

GONZALES-GARCIA & NAVAL-GUIAS(2010) relataram estudo retrospectivo de 28 pacientes submetidos a diversos tipos de distração osteogênica bifocal na reconstrução e reabilitação dos ossos maxilares submetidos a cirurgias ablativas. Ocorreram bons resultados com alongamento, médio de 36.5mm e período médio de consolidação de 16,4 semanas. Houveram complicações em 12 pacientes e sucesso em 22 pacientes com 6 insucessos. Os autores concluíram que a distração osteogênica pode ser uma importante ferramenta na reabilitação de pacientes submetidos a cirurgias ablativas.

LEE *et al.* (2010) estudaram a mobilização de células endoteliais progenitoras em 24 pacientes consecutivos submetidos a alongamentos ósseos de tíbia. Para este estudo mediu-se a concentração dos níveis plasmáticos de leucócitos e proteína C reativa. Após o isolamento das células mononucleares, foram medidas as concentrações de marcadores de superfície celular, fatores endoteliais de crescimento vascular e mobilizadores de citocinas. Os resultados descritos pelos autores mostraram mobilização das células endoteliais progenitoras com aumento nos níveis plasmáticos das citocinas.

MAZZETTI *et al.* (2010) apresentaram modelo de avaliação qualitativa e quantitativa de análise das células-tronco mesenquimais obtidas da gordura de coelhos por lipectomia do pâncreas adiposo dorsal. Os autores removeram o pâncreas adiposo de 10 coelhos Neozelandeses por lipectomia. O material obtido foi fragmentado, lavado e dissociado, sendo posteriormente incubado por 20 dias. Decorrido este período, foram realizadas análises quantitativas das primeiras e segundas passagens das células-tronco mesenquimais nas garrafas. Foram encontrados $1,66 \times 10^6$ cel/ml com 98% de viabilidade. Após o cultivo destas células (20 dias de cultivo), estas foram contadas sendo encontradas $2,88 \times 10^6$ cel/ml. Após 20 dias, o processo foi repetido e foram contadas $4,28 \times 10^6$ cel/ml após mais. A técnica de remoção do pâncreas gorduroso por lipectomia apresentou resultados bastante favoráveis na obtenção de células-tronco em avaliações quantitativas e qualitativas.

PEREZ-SAYANS *et al.* (2010) revisaram o mecanismo molecular relacionado à síntese óssea durante a distração osteogênica. Alisaram a influência do sistema RANK/RANK/OPG no processo de distração osteogênica, mostrando que através da interação destes mediadores celulares, o *stress* mecânico gerado na distração osteogênica estimula a neoformação óssea e inibiu a atividade osteoclástica.

HWANG & CHOI(2010) investigaram o uso de plasma rico em plaquetas puro e em combinação com células-tronco mesenquimais, na redução do período de consolidação do calo ósseo, na distração osteogênica. Realizou-se distração osteogênica mandibular bilateral (cinco dias de latência e alongamento de 6,3mm) em 38 coelhos. No primeiro dia de consolidação, foram injetados na área alongada, gel de plasma rico em plaquetas, com e sem células-tronco mesenquimais. Os animais foram avaliados radiograficamente, histologicamente e bio-mecanicamente em uma, duas e quatro semanas após a consolidação. O período de consolidação foi reduzido em 6,6 e 5,1 dias, sendo avaliados através de histomorfometria, radiodensidade (osso/osso, osso dente adjacente) e teste de microrresistência apresentaram resultados respectivamente superiores no grupo de plasma rico em plaquetas associada a células-tronco mesenquimais. Os resultados reportados sugeriram que a combinação de terapia por células tronco mesenquimais com plasma rico em plaquetas, pode reduzir o período de consolidação em distração osteogênica.

EGUCHI *et al.*(2011) estudaram a aceleração no ritmo de alongamento ósseo por distração osteogênica através da injeção de fator de crescimento no calo ósseo .

Foi realizada distração osteogênica na pata de coelhos e injetaram no grupo de estudo proteína morfogenética-2 com beta trifosfato de cálcio e polietileno glicol ,na área de dia. As avaliações radiográficas, histológicas e mecânicas demonstraram que o grupo injetado com fator de crescimento apresentou um calo ósseo adequado e consistente, com maior densidade mineral e resistência. Concluiu-se que a adição de fatores de crescimento pode acelerar a formação e maturação do calo ósseo na distração osteogênica.

ABUDUSAIMI *et al.*(2011) estudaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na regeneração da necrose vascular da cabeça do fêmur de coelhos. Neste estudo,a osteonecrose foi induzida pela injeção intramuscular de metil prednisolona e oclusão (por eletrocautério) da artéria femoral. Os animais foram divididos em três grupos: sem tratamento (A) descompressão por osteotomia (B) e injeção de 10^7 células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo diretamente na cabeça do fêmur (C). Após oito semanas os animais foram avaliados por microtomografias e histologicamente. As microtomografias mostraram maior volume e densidade óssea no grupo C.A avaliação histológica mostrou trabeculado com maior densidade e neo formação óssea no grupo C.

FUJIO *et al.*(2011)avaliaram a possibilidade de acelerar a neoformação óssea durante a distração osteogênica. Demonstraram que alongamentos em grande velocidade (ritmo de 2 mm/dia grupo de estudo e 1 mm/dia no grupo controle)podem levar ao insucesso no recrutamento das células endoteliais da medula óssea. Em um

terceiro grupo, foram introduzidos localmente fatores derivados de células mesenquimais-1 (*stromal-cell derived factor-1*) a fim de obter maior quimiotaxia às células endoteliais da medula óssea. Neste terceiro grupo, houve uma maior ossificação do calo ósseo com maturação dos vasos neoformados e aumento do fluxo sanguíneo. Concluiu-se que recrutamento ativo de células endoteliais, permite uma aceleração no ritmo de alongamento ósseo.

ZHAO *et al.*(2011) investigaram a ação da proteína de crescimento osteogênica na formação óssea durante a regeneração por distração osteogênica. Realizaram distração osteogênica na tíbia de 36 coelhos, sendo feitas injeções intravenosas de proteínas de crescimento ósseo no grupo de estudo e solução salina no grupo controle diariamente. Após 15 mm de alongamento, os animais foram sacrificados e avaliados por histologia, radiografias e biomecânica. Todas as avaliações mostraram aumento na formação resistência e mineralização do grupo de estudo.

ZHANG *et al.* (2011) avaliaram a expressão de proteínas morfogenéticas e fatores endoteliais vasculares e de crescimento fibroblástico em mandíbulas irradiadas submetidas a distração osteogênica. Utilizaram 24 coelhos. Submeteram o grupo de estudo (12 coelhos) a cinco sessões de radioterapia com dose de 9 Gy cada. Após um mês os animais do grupo de estudo foram submetidos à distração osteogênica com sete dias de período de latência. Os animais de cada grupo foram sacrificados com 7, 12 18 e 25 dias após a osteotomia ser realizada. Os espécimes

foram submetidos à avaliação histológica, imunohistoquímica e análise por *polymerase chain reaction* (PCR). As avaliações histológicas mostraram maior formação óssea no grupo sem radiação, porém a expressão de proteína morfogenética mostrou-se reduzida no início da fase de ativação, com aumento da expressão nas fase intermediária (12 dias) e finais da ativação, acompanhada de uma elevação na expressão dos fatores de crescimento endotéliais vasculares fibroblásticos nos períodos de sete, 12, 18 e 24 dias. Ocorreu redução na expressão do fator de crescimento fibroblástico no grupo submetido a radioterapia. O estudo demonstrou que a radioterapia pode alterar a expressão das proteínas estudadas durante a reparação óssea por distração osteogênica.

AIMAITI *et al.* (2011) avaliaram os efeitos terapêuticos das células tronco mesenquimais adiposas induzidas a osteogênese na cabeça do fêmur de coelhos, submetidos a necrose vascular induzida. A necrose foi induzida por privação vascular através da administração de metil prednisolona e da oclusão da artéria femoral. Após oito semanas, os animais foram divididos em três grupos: A, sem terapia, B, recebeu descompressão (perfurações cirúrgicas da cortical) e C, injeção de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. A formação de tecido ósseo e a micro estrutura foram avaliados por imunohistoquímica para expressão de osteocalcina, microtomografia e histologia. Avaliou-se da reparação e revascularização da cabeça do fêmur. O grupo C mostrou resultados superiores no volume de osso trabecular, densidade mineral, maior revascularização e neo formação óssea. A terapia por

células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo aumentou a osteogênese na cabeça do fêmur em presença de necrose vascular

ÇAKIR-ÖZKAN *et al.*(2011) compararam do ponto de vista histológico e imunohistoquímico, as reconstruções de mandíbula obtidas por enxertos autógenos e distração osteogênica. Realizaram a reconstrução de defeitos mandibulares na mandíbula de 14 ovelhas adultas, Em um grupo distração osteogênica e no outro através de enxerto autógeno de ilíaco. Após três meses da reconstrução, as ovelhas foram sacrificadas e avaliadas por histologia e pela expressão de *transforming growth factor beta 1*(TGFβ1) e *bone morphogenetic protein* dois e quarto (BMP-2 e BMP-4). Os autores relataram a presença dos fatores de crescimento em ambos os grupos, porém a expressão proteica foi significativamente maior no grupo submetido a distração osteogênica. Resaltou-se que, mesmo tardia, a distração osteogênica pode expressar maior quantidade dos transcritores celulares estudados.

MONACO *et al.*(2011) revisaram as estratégias de regeneração óssea com células mesenquimais derivadas de células adiposas adultas em porcos. Os autores relataram que apesar das células mesenquimais de medula óssea ser a escolha primária, segundo os autores, as células mesenquimais adiposas apresentam fenótipo e morfologia similares, potencial multilinhagem, comparável aos obtidos com as células-tronco mesenquimais de medula, sendo porém mais abundantes, acessíveis e sua colheita apresenta morbidade reduzida quando comparada as células de medula.

As células mesenquimais adiposas possuem habilidades imunossupressoras e de migrar ao local da lesão, demonstrando grande capacidade osteogênica *in vitro* e *in vivo*. Segundo os autores, esta revisão permitiu suporte científico para sua aplicação clínica.

JIANG *et al.* (2011) avaliaram a ação da injeção de adiponectina na velocidade de alongamento ósseo por distração osteogênica. Os 24 coelhos da raça Nova Zelandeses adultos foram divididos em 2 grupos, submeteu-se a mandíbula à distração osteogênica com ritmo de alongamento de 2mm/dia. Foraminjetado nos diasum , três e cinco de alongamento 2 µg rh-adiponectina no *gap* formado e solução fisiológico no grupo de controle. Após seis semanas, os animais foram sacrificados e avaliados por microtomografia, histologia e teste biomecânico. Encontrou-se osso imaturo no *gap* do grupo controle. No grupo de estudo observou-se presença de maior volume de osso com maior densidade mineral e resistência a fratura, definidas nas avaliações de micro tomografia, histologia e teste de fadiga. A injeção intermitente de adiponectina pode favorecer a regeneração óssea na distração osteogênica rápida.

GAIBA *et al.* (2012) descreveram a aplicação de protocolo de cultura, isolamento e cultivo de CTM-Adp a partir de tecido gorduroso humano de doadores do sexo feminino, saudáveis. As amostras de tecido adiposo foram coletados do tecido subcutâneo abdominal. As células foram cultivadas em meio de *Dulbencco's* modificado e *Dulbecco's Modified Eagle Medium + nutrient F12 mixture* (DMEM

F12) suplementado com soro fetal bovino a 10%. A cultura foi obtida mantida a 37° C em umidificador a 95% de O₂ e 5% de CO₂. Ao atingir 80% de confluência, os autores realizaram a digestão enzimática e utilizaram células de terceira passagem para avaliar e caracterizar por ensaios de diferenciação e imunofenotipagem as células mesenquimais. Houve diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica e a análise por citometria de fluxo demonstrou negatividade nos marcadores CD16, CD34 e CD45 e positividade nos marcadores CD73, CD90, CD105. De acordo com os autores, as células-tronco mesenquimais podem ser isoladas e cultivadas a partir do tecido adiposo mantendo sua integridade funcional.

ZHANG *et al.* (2012) avaliaram o transplante de células-tronco mesenquimais associadas a proteína morfogenética 2 e 7 na regeneração de mandíbulas irradiadas submetidas a distração osteogênica. Utilizou-se 12 coelhos distribuídos em dois grupos. O grupo de estudo foi submetido a cinco sessões de irradiação com dose de 9Gy cada. Após um mês da radioterapia, todos os animais foram submetidos a alongamento unilateral da mandíbula por distração osteogênica, com sete dias de latência e 11 dias de ativação de 0.9mm ao dia. Ao final da ativação, células-tronco mesenquimais combinadas com colágeno bovino foram injetadas na zona alongada. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e avaliados radiográfica e histologicamente. Houve maior mineralização com osso de tecido medular mais maduro, no grupo que recebeu as células-tronco mesenquimais. Os autores

concluíram que o transplante de células-tronco mesenquimais pode incrementar a formação óssea em mandíbulas irradiadas submetidas à distração osteogênica.

AGUENA *et al.*(2012) avaliaram a associação de tecido adiposo com células-tronco derivadas de tecido adiposo no enxerto autólogo de gordura. Estudou-se as diferenças entre os leitos doadores abdominais e os métodos de obtenção. O tecido adiposo foi obtido por lipoaspiração tradicional (bomba de sucção) e de modo manual (bomba assistida) das regiões sub abdominal e de flanco subcutâneo. As células-tronco foram isoladas, contadas, caracterizadas e mantidas em cultura. Não houve diferença significativa entre os métodos de lipoaspiração, no entanto referente aos leitos doadores, a região de flanco mostrou uma subpopulação de células hematopoiéticas e endoteliais mais proeminente do que as obtidas do abdômen.

HAYDEN *et al.* (2012) revisaram a literatura pertinente aos avanços na cirurgia de reconstrução mandibular, no intuito de estabelecerem um consenso nas indicações das técnicas existentes (enxertos ósseos, pedículos ósseos miocutâneos, retalhos ósseos microcirúrgicos e distração osteogênica). Segundo os autores, a maioria dos estudos relatavam técnicas e suas variações, sendo o retalho microcirúrgico o predominante, seguido dos retalhos osteocutâneo e distração osteogênica. Os autores encontraram também uma grande preocupação com a presença da osteorradionecrose. Segundo os autores, os maiores avanços na cirurgia reconstrutiva mandibular estão no uso de cirurgias assistidas por computador e a

engenharia tecidual se destaca como uma grande promessa com enorme potencial de aplicabilidade clínica.

ZHU *et al.*(2012) compararam as características biológicas e de múltipla diferenciação entre as células-tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo e da medula óssea através do estudo fenotípico, secreção de fatores e capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens. Os autores concluíram que as células mostraram comportamentos muito semelhantes no fenótipo, com diferença apenas na expressão do CD 106. Quanto a proliferação, as células derivadas do tecido adiposo se diferenciaram mais rápido, porém apresentaram capacidade menor de suprimir os linfócitos T. As células apresentaram características muito semelhantes, porém o mesmo volume de tecido adiposo apresentava uma abundância maior de células-tronco mesenquimais.

CASTRO-GOVEA *et al.*(2012) investigaram os efeitos da terapia gênica sobre a mineralização durante o processo de distração osteogênica. Foi produzida matriz de osso humano desmineralizado, e embebida com células-tronco mesenquimais associadas a proteína óssea morfogenética-2 *ex vivo*.O material obtido foi implantado em mandíbulas de cães e estas submetidas a distração osteogênica, foram avaliadas radiográfica e histologicamente após três semanas. As avaliações radiográficas demonstraram maior mineralização que o grupo controle, as avaliações histológicas corroboraram com este achado, demonstrado maior organização e mineralização no

trabeculado. Nenhum infiltrado inflamatório foi detectado nas áreas implantadas e nem sinais de hepatotoxicidade.

DHANASEKARAN *et al.*(2012) estudaram os efeitos da glicose na cultura de células-tronco mesenquimais derivadas de diferentes leitões doadores de tecido adiposo comparando as derivadas de medula óssea. Os autores coletaram células-tronco derivadas da gordura, a partir do omento, de gordura subcutânea e de medula óssea (tíbia). As células mesenquimais foram caracterizadas a partir de marcadores de superfície, diferenciação, proliferação e cariótipo, após as culturas serem feitas em meio de DMEM-HG contendo uma concentração de glicose de 25mmol. Segundo os autores, as culturas se desenvolveram mesmo em meio hiperglicêmico, as derivadas de gordura, tanto do mento quanto do subcutâneo, foram superiores a cultura de medula óssea. Os autores concluíram que a terapia por células-tronco pode ser aplicada em meio hiperglicêmico, sugerindo sua viabilidade em pacientes diabéticos.

ZHANG *et al.* (2012) estudaram a expressão de metaloproteinase (MMP-1) e inibidor tissular de metaloproteínas (TIMP-1) na distração osteogênica de mandíbulas irradiadas de coelhos. Este estudo foi conduzido com 24 coelhos submetidos à irradiação (9Gy fracionada em cinco doses). Após quatro semanas, os animais foram submetidos à distração osteogênica, divididos em dois grupos de 3 animais, que foram sacrificados aos três, sete, 12 e 18 dias após o alongamento. Os grupos foram avaliados por imunohistoquímica e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR). Houve a supressão na expressão de MMP-1 e TIMP-1 na

avaliação de sete dias em relação ao grupo controle, e elevação destas proteínas nas avaliações de 12 e 18 dias. No entanto, os grupos de estudo mantiveram-se com níveis de expressão significativamente mais elevados que nos grupos controles, evidenciando a supressão na expressão de MMP-1 e TIMP-1 causada pela irradiação. grupos de estudo mantiveram-se com níveis de expressão significativamente mais elevados que nos grupos controles, evidenciando a supressão na expressão de MMP-1 e TIMP-1 causada pela irradiação.

DOGYANG *et al.* (2013) avaliaram os benefícios produzidos pela injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea na zona de regeneração da distração osteogênica de mandíbula em coelhos. Foram utilizados 30 animais divididos em 3 grupos de 10. No grupo controle foram injetados 0,2ml de soro fisiológico sem células, no segundo grupo foram injetados 0,2ml de soro fisiológico com células dissociadas ($6,5 \times 10^6$) e o terceiro grupo recebeu células fragmentadas ($6,5 \times 10^6$) no soro fisiológico. Os animais foram a órbita indolor induzido com três e seis semanas. As peças avaliadas por radiografia, micro-tomografia, teste mecânico e histomorfometria. Observou-se, na radiografia, aparência fibrosa do grupo controle e maior radiodensidade nos grupos que receberam células-tronco. As análises de micro-tomografia mostraram aumento significativo na densidade mineral no grupo de células fragmentadas e dissociadas em relação ao grupo controle. As avaliações por histomorfometria mostrou osso maduro nos três grupos no período de seis semanas, na análise de três semanas os autores relataram presença de ilhas de cartilagem em

todos os grupos, com tecido ósseo mais organizado e trabeculado mais robusto nos grupos que receberam células-tronco.

DONNEYS *et al.* (2013) demonstraram aumento de vascularização no processo de neoformação óssea na distração osteogênica de mandíbulas. Os autores realizaram osteotomia na mandíbula em 21 ratos e dividiram em dois grupos, o controle com separação de 2,1 mm e no grupo de estudo foram criados defeitos críticos reparados por distração osteogênica. Os animais foram avaliados aos 28 dias através de micro-tomografia computadorizada. Os resultados relatados pelos autores demonstraram aumento significativo na vascularização no grupo submetido a distração osteogênica.

DESHPANDE *et al.* (2013) utilizaram ratos para avaliar a injeção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea na zona de regeneração de mandíbulas irradiadas. Os animais foram divididos em três grupos: grupo controle com distração osteogênica, grupo submetido a distração osteogênica e irradiação e o terceiro grupo com distração osteogênica irradiação e administração de 2×10^6 células-tronco mesenquimais, carregadas por esponja gelatinosa e instalada no ato operatório da distração. Os grupos foram avaliados no 40^o dia por micro-tomografia e testes biomecânicos. Os autores reportaram um aumento significativo na densidade mineral e na resistência mecânica no grupo que recebeu células-tronco em relação ao grupo de radioterapia sem no entanto alcançar os parâmetros de radiodensidade e resistência do grupo controle.

FELICE *et al.* (2013) avaliaram a administração da deferoxamine na distração osteogênica de mandíbulas irradiadas em ratos. Os animais foram divididos em grupo controle (cinco animais), grupo submetido à distração osteogênica e radioterapia e grupo submetido a distração osteogênica e radioterapia associada a deferoxamine. Os animais foram sacrificados após 40 dias e avaliados quanto à resistência mecânica e micro-tomograficamente. O grupo controle apresentou completa mineralização da área alongada, no grupo submetido à irradiação apenas uma das dez mandíbulas apresentou união completa do osso neo-formado. O grupo que recebeu deferoxamine apresentou incremento na mineralização em relação ao grupo de radioterapia. Os testes biomecânicos acompanharam os achados da análise em micro tomografia, demonstrando uma redução na resistência da mandíbula no grupo submetido à irradiação, com recuperação dos valores do grupo controle no grupo que recebeu deferoxamine.

NOMURA *et al.* (2014) utilizaram modelo animal em ratos para avaliar o transplante de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo não cultivadas em gel de colágeno a fim de acelerar a maturação do calo ósseo na distração osteogênica. As células-tronco foram coletadas da região inguinal dos animais sendo então obtida a fração mononuclear. Os animais foram submetidos a cirurgia de distração osteogênica da tíbia e após a última ativação as células-tronco processadas foram injetadas. Demonstrou-se incremento na densidade óssea e no ponto de ruptura no teste biomecânico do calo neoformado no grupo que recebeu as

células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. As avaliações de *Dil labeling* sugerem que as células-tronco transplantadas, foram detectadas na avaliação de quatro semanas. Os testes de RT-PCR mostraram aumento nos níveis de *bone morphogenetic protein-2* (BMP-2), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e *interleukin* (IL-6) no grupo de animais que recebeu células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo. O transplante de fração mononuclear de tecido adiposo acelera a neoformação de tecido ósseo na zona de regeneração da distração osteogênica.

WANG *et al.* (2015) estudaram a ação de células-tronco geneticamente modificadas na regeneração do nervo mandibular após distração osteogênica. Foram isoladas e cultivadas células-tronco mesenquimais de coelhos. As células foram modificadas a fim de incrementar a secreção de hNGF β . Os animais foram submetidos à distração osteogênica para avanço de mandíbula (ativação 1mm/2x/dia por cinco dias), sendo as células-tronco modificadas injetadas no *gap* após término do alongamento. A análise por histomorfometria mostrou aumento significativo na densidade da hialina peri-neural demonstrando, que a implantação de células-tronco modificadas podem acelerar a regeneração do nervo mandibular submetido a distração osteogênica.

KESEMENLI *et al.* (2015) aplicaram dose de 30Gy fracionada em 10 sessões de radiação ionizante em 30 coelhos da raça Nova Zelândia. Após quatro semanas e realizaram distração osteogênica na tíbia. Após um período de latência de sete dias,

foi realizado alongamento de 10 mm ativando o distrator 1 mm/dia. Foi avaliada a regeneração das áreas alongadas por cintilografia e radiologia nos períodos de quatro, oito e 12 semanas e histologicamente 12 semanas pós-distração. Os autores relataram maturação inadequada e significativamente inferior a maturação óssea do grupo controle.

RECREO *et al.* (2015) compararam o potencial preventivo da osteonecrose com o uso de diferentes combinações de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo com e sem estímulos prévios de BMPs e plasma rico em plaquetas, pós-exodontia em modelos animais usuários de ácido zolendrônico. Houve aumento significativo de *turnover* ósseo e contagem de osteoblastos. Ocorreu também redução da incidência de osteonecrose no grupo que recebeu células-tronco mesenquimais. Houve sinergismo quando estas células foram associadas a plasma rico em plaquetas.

CHANDRA *et al.* (2015) estudaram o mecanismo de danos à sinalização celular decorrentes da irradiação ionizante em modelo animal. Segundo os autores, o reparo do DNA através da ação do hormônio paratireóideo na via Kinase A/b –catetin e seu maquinário podem ser danificados durante a radioterapia.

DESHPANDE *et al.* (2015) avaliaram a capacidade das células estromais da medula óssea de reparar os danos vasculares produzidos pela irradiação ionizante em mandíbulas de camundongos submetidos a distração osteogênica. Este estudo utilizou

19 camundongos divididos em três grupos: cinco submetidos à distração osteogênica, sete submetidos a distração osteogênica e radioterapia (dose de 3,72 Gy fracionada em aplicações por cinco dias) e sete submetidos à distração osteogênica e radioterapia com a injeção de 2×10^6 de células estromais de medula no dia da cirurgia. Os resultados foram analisados através de micro-tomografia computadorizada, sendo avaliados os vasos presentes na área de alongamento (número de vasos e anisotropia). Os autores relataram um aumento significativo do número de vasos no grupo que recebeu as células estromais da medula, sendo que a artéria mandibular neste grupo se mostrou distinta e robusta, a anisotropia dos vasos foi completamente restaurada no grupo de estudo.

ZHEUTLIN *et al.* (2015) utilizaram 20 ratos *Lewis* para estudar os efeitos da irradiação sobre a regeneração de mandíbulas submetidas a distração osteogênica. Os animais foram sacrificados em 40 dias. Realizaram-se avaliações histológicas da área alongada. Houve aumento de tecido imaturo e de lacunas vazias com redução dos osteócitos, concluiu-se que a radioterapia claramente reduz a atividade celular no osso alongado por distração osteogênica.

DEHGHEAN *et al.* (2015) avaliaram o transplante de células mesenquimais derivadas da medula óssea e plasma rico em plaquetas, em duas aplicações (metade e final da ativação do distrator), na aceleração do alongamento de 30% da tíbia nativa de cães. As avaliações tomográficas e histológicas mostraram efeito positivo na maturação do tecido ósseo neoformado em ritmo acelerado

TEE & SUN (2015) revisaram as técnicas de engenharia tecidual aplicadas a distração osteogênica em mandíbula, concluindo que apesar de que questões como melhor modelo animal, protocolos de distração osteogênicas e transplante celular devam ser mais investigadas, há evidências em estudos animais que indicam que o transplante de células-tronco mesenquimais podem incrementar a distração osteogênica mandibular.

ZHENG *et al.* (2016) relataram sucesso na distração osteogênica bi-focal com disco de transporte avascular enriquecido por BMP e células-tronco mesenquimais em cães. Neste estudo, foi criado um defeito segmentar em mandíbulas e gerou-se disco de transporte com enxerto alógeno. Em um grupo o enxerto foi associado a BMP-2 e células mesenquimais, um grupo com enxerto alógeno associado a células mesenquimais e outro sem tratamento. Houve aumento significativo na expressão da BMP-2 e mineralização no grupo de estudo mostrando a viabilidade de disco de transporte avascular, na correção de defeitos segmentares.

SINGH *et al.* (2016) realizaram revisão sistemática em bases biológicas da distração osteogênica. A mecanotransdução da distração osteogênica promove uma cascata de processos biológicos com o recrutamento de células multipotentes, angiogênese, osteogênese e mineralização. Observou-se níveis pró-inflamatórios de citocinas IL-1, IL-6, TGF β 1, sugerindo mecanismo de regulação do depósito de matriz extra celular com proteínas colágenas e não colágenas, envolvidas no processo de mineralização e remodelação do tecido ósseo.

HADIDI *et al.*, (2016) avaliaram o efeito das células-tronco mesenquimais derivadas da medulla óssea na microestrutura do osso neoformada na distração osteogênica. Os autores utilizaram 12 ovelhas divididas em dois grupos, o controle e o grupo de estudo que receberam duas injeção de $1,5 \times 10^6$ de células-tronco em solução salina nos dias 10 e 20 do fase de consolidação. No grupo controle nada foi injetado. O osso neo formado foi avaliado por raio-x de energia dispersiva (*energy dispersive x-ray* EDX). Demosntrou-se aumento na concetração de ions Ca^{2+} no grupo de estudo. A avaliação histomorfométria tambem demonstrou aumento da porcentagem de tecido mineralizado no grupo de estudo. Segundo os autores as células-troco mesenquimais aumentaram a mineralização do tecido neoformado, na distração osteogênica.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

- Primária
- Intervencional
- Experimental
- Longitudinal
- Prospectiva
- Aleatorizada
- Unicega
- 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 o número 0333/12 (Anexo 1)

4.3 AMOSTRA

Foram utilizados 10 coelhos da raça Nova Zelândia com idade entre 10 e 12 meses (média 10,8 meses) e peso entre 3,5 kg e 4 kg (média 3,7 Kg). Os animais eram provenientes do biotério central da Unifesp foram acompanhados por veterinário responsável (Dr Rubens Pasqualin). As dependências do biotério da UNIFESP estão de acordo com as normas da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008.

Os animais foram avaliados a fim de verificar qualquer doença ou alteração que pudesse comprometer o processo de cicatrização ou o experimento. Após exame os animais foram acondicionados em gaiolas individuais numeradas, em salas apropriadas com temperatura controlada entre 18 a 20°C, com ciclo luminoso de 12 horas. A dieta administrada aos animais consistia de alimentação balanceada com ração comercial peletizada para coelhos (Ração Coelho[®],

Métodos

Sítio Guabi, Além Paraíba, Minas Gerais, Brasil) e a água foi disponibilizada por bebedouro próprio ad libitum.

Cada animal recebeu numeração individual de 1 a 10.

4.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram distribuídos de forma aleatorizada pelo *software Random Allocation* em dois grupos com cinco animais cada: Grupo controle (GC: distração osteogênica de mandíbula e injeção de 1 ml de S.F 0,9%) e grupo experimental (GE distração osteogênica de mandíbula e injeção de 1 ml de soro enriquecido com 1×10^6 células-tronco)

4.6. TÉCNICA OPERATÓRIA PARA A LIPECTOMIA

Os animais foram anestesiados, por injeção intramuscular (músculo Glúteos Maximus), com uso de Quetamina 40mg.kg/1 (Dopalen[®] Laboratório Cema, Paulínia, Brasil) e Midazolam 2mg.kg/1 (Dormine[®] Cristália, Itapira, Brasil) e infiltração local de anestésico Xilocaína com fenilpressina 1/1000 2 mg/kg através de seringa hipodérmica de 10ml com agulha BD Lur-Lok[™] Tip 70X25 22G (Becton Dickinson Inc, Curitiba, Brasil).

Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral, realizou-sea tricotomia com aparelho Oster Golden[®] (Johanesburg, Africa do Sul) através de lâmina 1 (3mm), no dorso dos animais desde a região nugal até a área da 9^o arco costal, com 2 cm de extensão lateral para cada lado da coluna vertebral.

Após a tricotomia foram marcados dois pontos de orientação para a incisão. As escápulas foram indentificadas e unidas por uma linha. A partir da linha de união dos ângulos inferiores das escápulas, foi traçada uma linha perpendicular na metade da distância interescapular (ponto que coincide com a coluna vertebral) com quatro centímetros de extensão no sentido caudal. A incisão acompanhou esta linha perpendicular.

Após a demarcação, foi realizada limpeza da região com água e sabão neutro, seguida da antissepsia do local com solução de gliconato de clorohexidina a 0,2% aquoso (Rioquimica, São José do Rio Preto, Brasil). Foi realizada anestesia local infiltrativa através da injeção de 1 tubete de Lidocaína com epinefrina 1:100.000 para a promoção de vaso-constricção local com seringa carpule.

Após incisão no plano medial dorsal com bisturi lâmina 23, foi realizada divulsão romba dos tecidos subcutâneos e músculo dorsal posterior com tesoura de *Metzemabaum*. Após a dissecação, o tecido adiposo subjacente foi exposto e cuidadosamente dissecado (Figura 1). Com o auxílio de uma pinça o tecido adiposo foi manipulado, removido (6 g de tecido adiposo) e acondicionado em tubos de Falcon de 15 ml estéreis. As feridas cirúrgicas foram suturadas utilizando pontos

simples (seis a oito pontos) com fio mononylom 3-0 Ethicon® (Jonhson & Jonhson, São Paulo, Brasil).



Figura 1. Corpo adiposo exposto após dissecação e sendo removido para transporte ao laboratório em tubos de falcom com três vezes o volume do tecido adiposo de solução de Henk's

Os tubos contendo o tecido adiposo foram imediatamente levados em tubo de Falcom BD® de 15ml estéril (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EUA) com solução balanceada de *Hank's* até o Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da Unifesp/Escola Paulista de Medicina (responsável: Profa Dra Lydia Masako Ferreira e vice-responsável Prof. Antonio Carlos Aloise), onde foram identificados e etiquetados.

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; Flunixinina

Metaglumina (1mg/kg) (Bananime Pet®, Laboratório MSD, Cruzeiro, Brasil) de 24 em 24 horas por três dias IM; Cloridrato de Tramadol 2mg/kg (Tramal®, Laboratório Pfizer, Guarulhos, Brasil) de oito em oito horas IM por 24 horas.

4.5.1 RADIAÇÃO IONIZANTE

Após a lipectomia, os animais ainda sedados foram transportados em gaiolas apropriadas ao serviço de radioterapia do Hospital São Paulo (UNIFESP-EPM).

Os animais foram acomodados em um suporte próprio em decúbito dorsal horizontal com hiperextensão cervical do animal. Após posicionamento dos animais, foram instaladas placas de acrílico com espessura de 2 mm, lateralmente à face do animal. As placas de acrílico colocadas, tinham por função homogenizar o volume da irradiação no local determinado na scopia, em função da energia do aparelho usado para a irradiação (Figura 2).



Figura. 2. Placas de acrílico usadas na fixação da cabeça e homogeneização da dose a ser aplicada.

Concluída a calibragem, os animais foram levados para a simulação em um aparelho simulador modelo Acuity[®], da marca Varion (Figura 3) aonde através de uma escopia com imagem digital foi obtida e marcada a localização exata da área a ser irradiada incluindo a mandíbula e conseguindo assim a delimitação do campo de radiação, o qual foi utilizado para a irradiação do animal (Figura 4).



Figura 3. Simulação do procedimento de irradiação em simulador modelo Acuity[®].

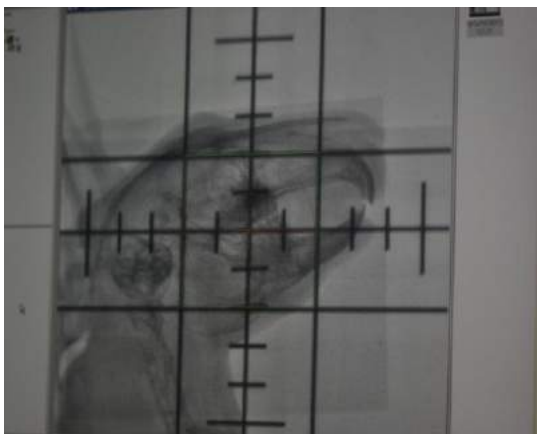


Figura 4 Imagem da escopia (calibragem e localização do alvo da irradiação).

Concluída a simulação, o animal foi levado para a realização da radiação. Foi utilizado acelerador linear de 6MV, modelo 600CD[®], marca Varion,

Aplicou-se a dose de 20Gy. O aparelho distribuiu a energia em duas doses de 10Gy, aplicadas a cada lado do mesmo segmento mandibular. Esta distribuição foi obtida através da rotação do mesmo, fazendo assim com que o volume total recebido de irradiação atingisse a dose de 20Gy na taxa de dose de 3Gy por minuto no ponto previamente calibrado. A irradiação foi realizada com feixe latero-laterais de ambos os lados. A técnica utilizada na irradiação foi a iso-cêntrica (Figura 5).



Figura 5. Irradiação com dose única de 20Gy, aplicada por acelerador linear de 6MV, modelo 600CD[®], marca Varion

Após a irradiação, os animais foram levados ao biotério. Lá foram mantidos em gaiolas por quatro semanas com água e ração *ad libidun* aguardando a próxima etapa do experimento (cirurgia de distração osteogênica).

4.5.2 TÉCNICA OPERATÓRIA PARA DISTRAÇÃO OSTEOGÊNICA

Decorridas quatro semanas da irradiação, os animais foram submetidos a cirurgia de distração osteogênica. Ocorreu o mesmo protocolo anestésico descrito para a lipectomia.

Após a indução da sedação, foi realizada tricotomia cervical compreendendo a região de borda inferior da mandíbula lado direito até escápula.

Em seguida foi realizada a antissepsia do meio com solução de solução de gliconato de clorhexidine a 0,2% aquoso (Rioquímica, São José do Rio Preto, Brasil). A anestesia local infiltrativa foi obtida através de injeção com seringa hipodérmica de 10 ml e agulha BD Lur-Lok™ Tip 70X25 22G (Becton Dickinson Inc, Curitiba, Brasil) com Lidocaína com epinefrina 1:100.000 para anestesia e promoção de uma vaso-constricção local. Foram identificados o músculo masseter, a borda inferior da mandíbula e os dentes incisivos e molares para referência da incisão (Figura 6).



Figura6. Demarcação dos pontos de referência para acesso da borda inferior da mandíbula.

Foi realizada incisão submandibular de 4cm com bisturi e lâmina 23 com hemostasia compressiva quando necessário. A diérese dos planos musculares foi realizada por divulsão romba com tesoura de *Metzembaum*. Os músculos platisma e depressor do lábio foram dissecados e o músculo masseter afastados lateralmente, até a completa abordagem do periósteo na região da borda inferior da mandíbula, que foi incisado com bisturi lâmina 15 e descolado por sindesmótomo de periósteo. A região do forame mentoal foi identificada e o periósteo descolado desde o bordo inferior até a altura do processo alveolar do osso mandibular em toda sua face vestibular (Figura 7).

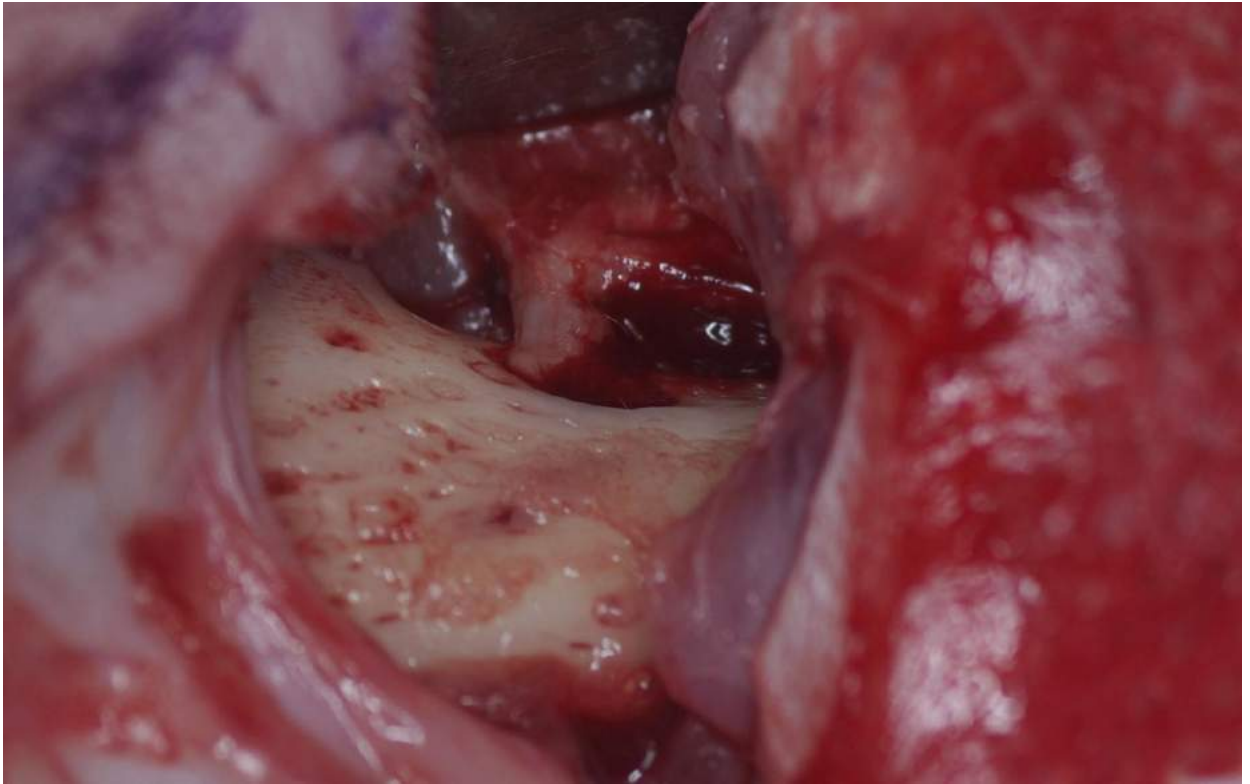


Figura 7. Face vestibular do osso mandibular com foramee nervo mentoniano.

O distrator de corpo de mandíbula, para avanço de 15 mm (Martin[®], Tubling, Alemanha) foi moldado por alicates de dobradura para que a suas placas de suporte ficassem perfeitamente adaptadas à superfície do osso mandibular. Uma vez concluída a modelagem das placas de fixação do distrator, o mesmo foi fixado à borda inferior da mandíbula por meio de dois a três parafusos auto-perfurantes e auto rosqueantes (Martin[®], Tubling, Alemanha) na placa distal e dois a três parafusos na placa proximal.

Os distratores foram instalados de modo que a base de uma das placas de fixação estivesse alinhada com a linha de osteotomia, a fim de servir de referência

externa ao ponto de punção para a injeção das células-tronco mesenquimais (grupo de estudo GE) ou soro fisiológico (grupo controle GC) (Figura 8).

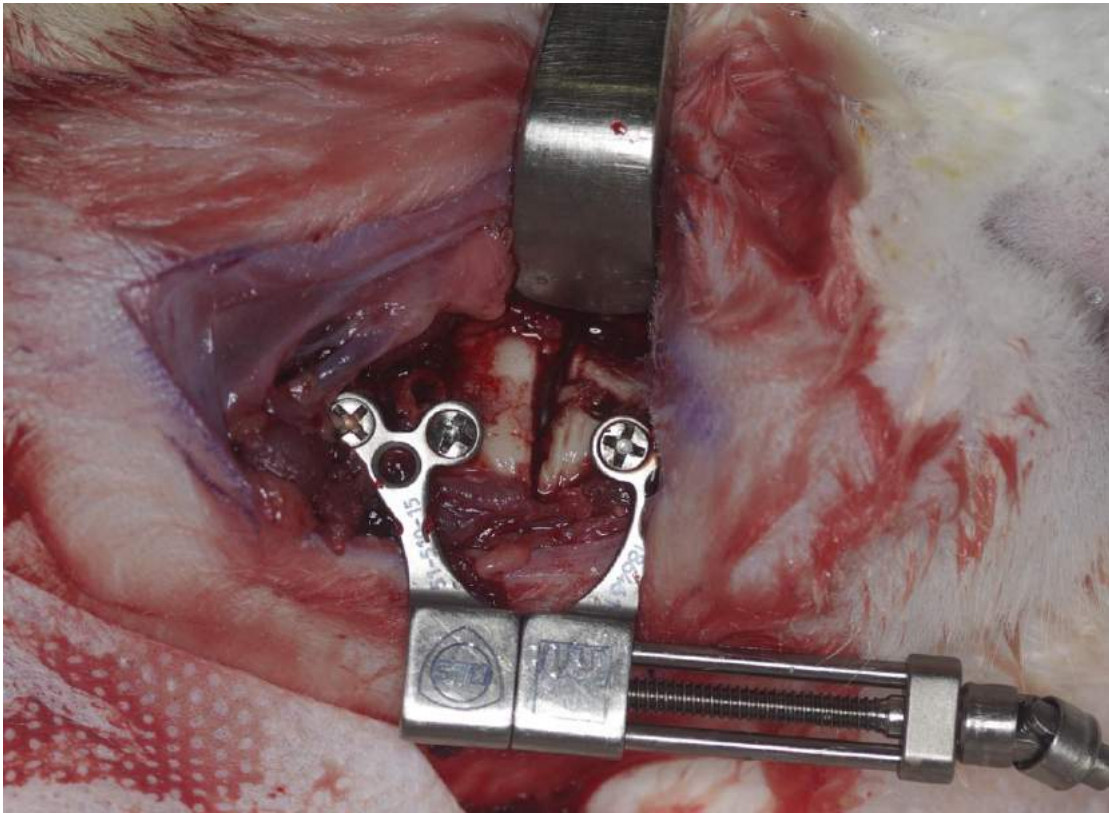


Figura 8. Distrator instalado e fixado na borda inferior da mandíbula. Margem da base de fixação alinhada com a osteotomia a fim de servir como ponto de orientação para localização da zona fibro-vascular (linha).

Com o distrator devidamente fixado, foi realizada a osteotomia por lâmina de piezo-sonic (Osada, Tokyo, Japão) até a completa mobilização dos fragmentos. Após a completa mobilização dos fragmentos, os parafusos de fixação foram checados e reapertados quando necessário, o distrator foi testado em sua estabilidade e mobilidade pela ativação de 1 a 2 mm. Uma vez checada a estabilidade e mobilização

dos fragmentos, o distrator foi retornado à posição inicial. A hemostasia foi revisada e a síntese por planos realizada com fios de poligalactina 4-0 Ethicon[®] (Vicryl[®] Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) nos planos musculares e fios mononylon 3-0 Ethicon[®] (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) na pele (Figura 9).



Figura 9. Ferida operatória suturada com torre do distrator exteriorizada.

No período pós-operatório os animais foram medicados via intramuscular com: antibiótico cefazolina sódica 30mg/kg (Kefazol[®], Laboratório ABL, Cosmópolis, Brasil) de 12 em 12 horas por cinco dias; anti-inflamatório flunixinina metaglumina 1mg/kg (Bananime Pet[®], MSD, Cruzeiro, Brasil) de 24 em 24 horas por três dias; analgésico cloridrato de tramadol 2mg/kg (Tramal[®], laboratório Pfizer, Guarulhos, Brasil) de 12 em 12 horas por três dias. As feridas cirúrgicas foram higienizadas duas vezes ao dia por lavagem e escovação do distrator com solução fisiológica 0,9%

e clorohexidina no período de ativação e a cada dois dias, por todo o período de maturação.

Decorrido o período de latência adotado neste estudo (cinco dias após a osteotomia), foi iniciado o alongamento da mandíbula por meio de duas ativações diárias de 1mm dos distratores com (dois mm por dia) durante cinco dias consecutivos. Durante as ativações, os animais não receberam qualquer medicação complementar.

No quinto dia (última ativação) foram injetadas as soluções contendo células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo no GE (1 ml contendo soro fisiológico 0,9% enriquecidos de 1×10^6) e 1 ml de soro fisiológico a 0,9% no grupo controle.

Para a injeção das células-tronco no grupo de estudo e do soro fisiológico (SF) 0,9% no GC, a base da placa de fixação de referência foi identificada e na linha da torre de fixação foi feita a punção até a zona fibro-vascular com seringa contendo o material a ser injetado. A injeção foi realizada de forma lenta (aproximadamente 30 segundos para injeção de 1 ml), com seringa hipodérmica de 3ml e agulha BD Lur-LokTM Tip 70X25 22G (Becton Dickinson Inc, Curitiba, Brasil), preenchida em 1 ml de SF 0,9% no grupo controle ou 1 ml contendo SF 0,9% enriquecida com células-tronco no grupo de estudo conforme, protocolo de cultura citado adiante (Figura 10) .

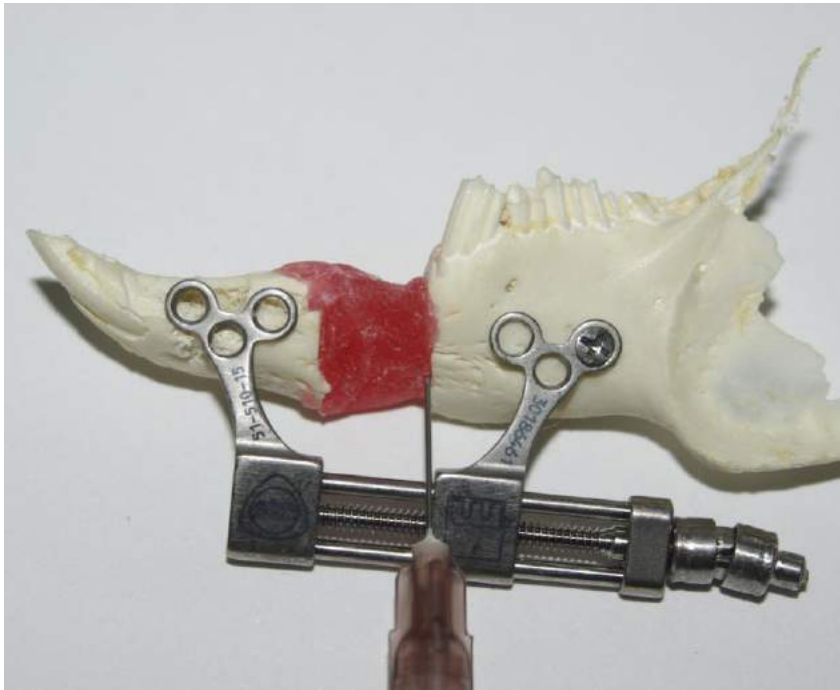


Figura 10. Esquema demonstrativo da localização da área e técnica de injeção (SF0,9% no GC/SF 0,9% + Células-tronco GE) na zona fibrovascular.

Concluída a fase de ativação, os distratores foram travados por meio de inclusão de resina acrílica e mantidos imobilizados durante o período de maturação da zona fibrovascular.

Após o período de quatro semanas, foi realizado o óbito induzido dos animais por meio da aplicação intramuscular de Quetamina 40mg.kg/1 (Dopalen[®], Laboratório Ceva, Paulínia, Brasil) e sobredose de tiopental sódico (laboratório Cristália, Itapira, SP, Brasil) por via intravenosa na veia auricular marginal. O óbito foi confirmado pelo veterinário que acompanhou o procedimento, de acordo com a

resolução nº 714 de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Veterinária e a lei 11.794 de 08/10/2008 art 3 inciso IV.

Após o óbito, a mandíbula foi removida por meio de dissecação e desarticulação dos côndilos mandibulares da fossa mandibulares do osso temporal. As mandíbulas foram então armazenados em vasilhames plásticos contendo formol tamponado a 10%, preenchendo 10 vezes o volume mandibular por 36 horas. Após, este período as mandíbulas foram transportadas em álcool 70%, para análise tomográfica e histológica.

Durante o período de armazenamento em álcool 70%, os vasilhames foram transferidos para Instituto de radiologia (CADO, radiologista responsável Dr Roberto Mansini), onde foram realizados exames tomográficos (Tomógrafo NewTon 3g-NIM, Verona, Itália) com cortes axiais de 1mm.

Após a tomografia, a área de alongamento ósseo foi removida da peça mandibular, foi removido fragmento ósseo contido entre os parafusos de fixação. A peça foi encaminhada ao serviço de histologia para preparo das lâminas e avaliação histológica.

Depois de concluída a descalcificação as peças foram embebidas em parafina formando blocos, que foram cortados no sentido sagital medial em seções de 7µm, com corte inicial a partir do centro da peça e mais dois cortes linguais e dois vestibulares, resultando em quatro lâminas por mandíbula.

4.5 CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ADULTAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo retirado e transportado ao laboratório foi pesado para garantir o peso mínimo de 4g de gordura. Foi processado em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar Classe IIA B3, Forma Scientific), onde o tubo contendo a gordura foi aberto e o conteúdo transferido para um tubo cônico de Falcon[®] de 15mL (Becton, Dickinson and Company, New jersey, EUA) procedendo-se a lavagem com solução tamponada salina PBS acrescida de antibióticos e fungicida (A5955 Sigma Aldrich[®], Missouri USA). O processo de lavagem foi repetido por seis vezes.

A peça de gordura foi então fragmentada com o auxílio de tesoura de Metzemaum e pinça da Adison serrilhada em uma placa de Petri de 60mm. Em um tubo de Falcon[®] de 15 ml, os fragmentos de gordura foram inseridos em uma solução de colagenase II (1mg/mL) com duas vezes o volume dos fragmentos e mantido em imersão em colagenase a 37°C por 30 minutos sob agitação orbital em Vortex (Agitador Orbital Tecnal TE 420[®]). Logo após, o tubo foi centrifugado a 300G por 10 minutos (Centrifuga modelo 206BL, Fanem, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi desprezado e *opellet* ressuspendido em 15mL de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium + Nutrient F12 Mixture* (DMEM F-12) (2906-SIGMA ALDRICH CO, MISSOURI, USA) com 10% de soro fetal bovino (CULTILAB,

CURITIBA, BRASI). As células isoladas foram semeadas em frasco de cultura de 75cm² (Frasco de Rou, Cornig Inc.USA) e levado à incubadora a 37°C com 5% de CO². O meio de cultura foi trocado a cada 48 horas até que a confluência das células alcançassem 80% do frasco de cultura. Foram utilizadas as células da terceira passagem da subcultura.

Quando alcançada a densidade de 1x10⁶ células, estas foram tripsinizadas e acondicionadas em tubos de Eppendorf[®] (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) de 1,0mL em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) para reimplantação nas mandíbulas dos animais.

As células cultivadas foram reimplantadas ao término do período de alongamento ósseo (após a cirurgia de distração osteogênica foi aguardado um período de latência de cinco dias e cinco dias de alongamento, perfazendo um total de dez dias de pós-operatório).O reimplante das células cultivadas foi realizado por injeção no local de zona fibro-vascular conforme descrito.

4.6 CARATERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

4.6.1 ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO.

A fim de verificar se as células cultivadas atendiam aos requisitos propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), as células foram submetidas a

imunofenotipagem e aos ensaios de diferenciação em tecido adipogênico, condrogênico e osteogênico. Para os ensaios de diferenciação, as células foram cultivadas em placas estéreis de seis poços de plástico de poliestireno de alta transparência (Techno Plastic Products, Trasadingen, Schafhausen, Switzerland).

Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em placas de seis poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 μ M de insulina regular recombinante humana (HUMULIN[®] R, Lilly, France Fegersheim, France) e 1 μ M de dexametasona (Biosintética-Aché, São Paulo, Brasil) por 15 dias, sendo mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e, o meio de cultura 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 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences, Pennsylvania USA). Após 30 minutos, a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: lavagem uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas lavagens apenas em PBS por dois minutos.

Posteriormente, as células foram incubadas com 0,5% de corante Oil Red O (Sigma Aldrich, Missouri, USA) em temperatura ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada cinco vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1µg/ml do corante (4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride (DAPI) (Sigma Aldrich[®], Missouri, USA) em PBS (0,1% de BSA (Sigma Aldrich[®]) e 0,2 % de saponina, Calbiochem[®] por 2 minutos sendo

as células novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, New York).

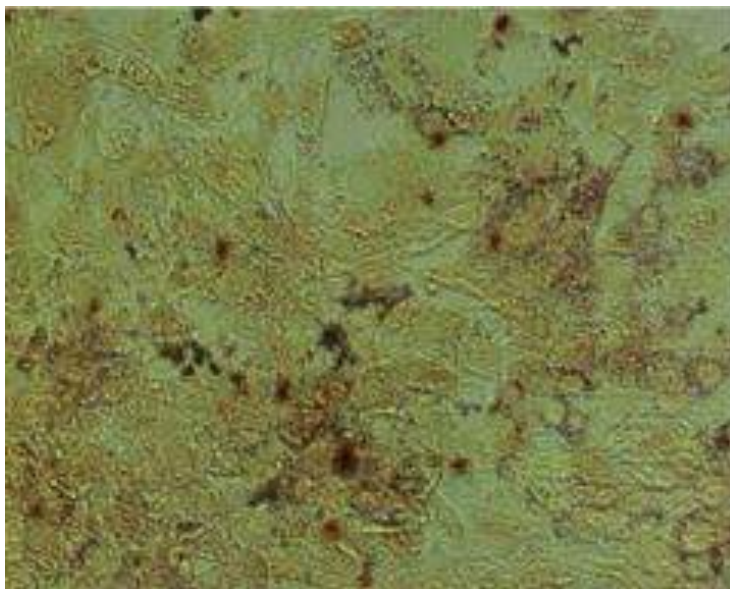


Figura 11 . Diferenciação em células adipogênicas em coloração Oil Red (aumento 100X)

Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em placas de seis poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 50 μ M de ácido ascórbico (Sigma Aldrich[®], Luis, Missouri USA), 0,1 μ M de dexametasona (Biossintética-Aché, São Paulo, Brasil) e 10⁻²M de β glicerofosfato (BAKER ANALYZED[™] Reagent, Mallinckrodt Baker Products, New Jersey, USA) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida Forma Scientific (CO Water Jacketed Incubator Series II) a 37[°]C e 5% de CO₂ sendo o meio de cultura trocado a cada três dias.

Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 minutos a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por dois minutos.

Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de 40nm de alizarina vermelha sódica (40nM, pH 4,1) (Sigma Aldrich[®], Missouri, USA) em temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada cinco vezes com 2ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células

foram incubadas com 1µg/ml do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2.

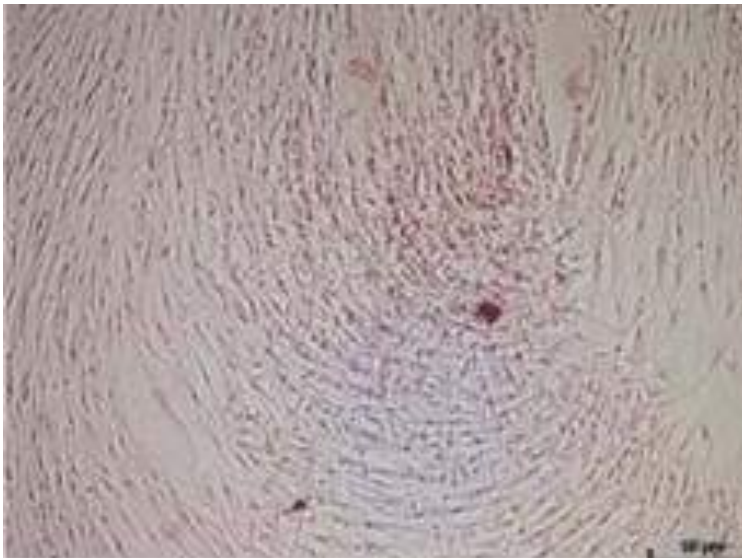


Fig 12. Diferenciação em células osteogênicas em coloração alizarina vermelha (aumento 100x)

Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em placas de seis poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com insulina, 0,1 µmol/L (HUMULIN[®] R Lily France, Fergershein, France) de

dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico (Sigma Aldrich, Missouri, USA) e 10ng/ml TGF- β 1 (Cell Signaling Technology[®], Massachusetts, USA) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37 $^{\circ}$ C e 5% de CO₂ e o meio de cultura 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 2 ml de solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 minutos, a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS sendo a primeira lavagem em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e as duas seguintes apenas em PBS por dois minutos.

Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução 0,1% de azul de Toluidina (Sigma Aldrich, Missouri, USA) em temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2ml e lavada cinco vezes com 2ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A placa com as células fixadas e coradas foi observada no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2.

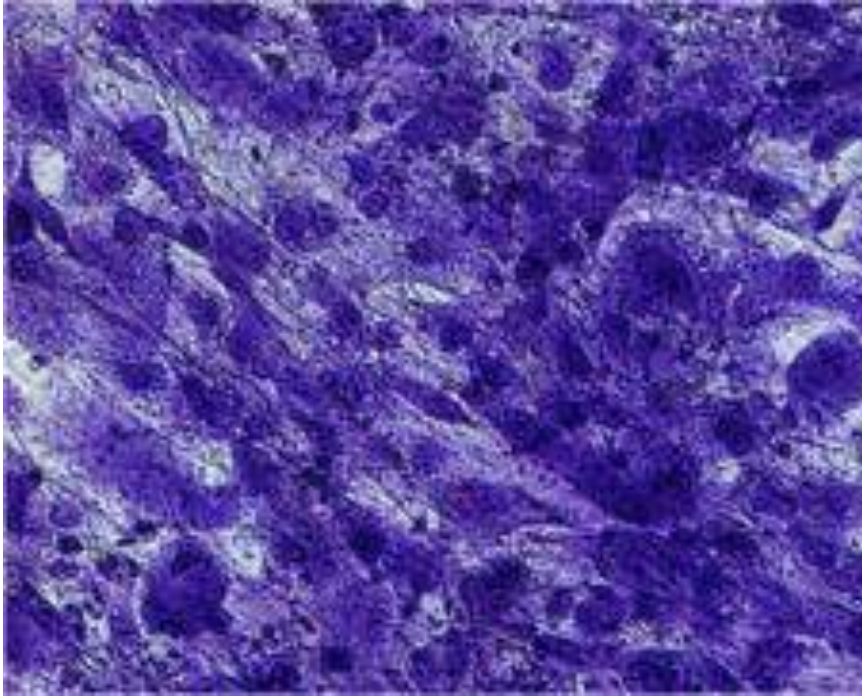


Fig 13. Diferenciação em células condrogênicas coradas em azul de toluidina (aumento de 100x)

4.7.2 IMUNOFENOTIPAGEM

Após o isolamento, as células na terceira passagem foram tripsinizadas e a suspensão centrifugada a 300G por quatro minutos, sendo o sobrenadante descartado e adicionando ao meio 1mL de PBS. O procedimento de lavagem da suspensão de células foi repetido duas vezes. Após a segunda lavagem das células foram adicionados os anticorpos conjugados com FITC (Fluorescein isothiocyanate), APC (allophycocyanin) ou PE (phycoerythrin). Os anticorpos avaliados foram: CD16, CD31, CD34, CD45, CD73 e CD105 (Becton, Dickinson & 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[®] (FACS Calibur, Becton Dickinson) para identificação dos canais de fluorescência específicos para cada anticorpo.

Foram considerados positivos quando a expressão foi maior que 95% e negativos quando a expressão foi menor que 5% .

4.8 ANÁLISE TOMOGRÁFICA

Foi utilizado tomógrafo tipo feixe cônico (NewTon 3G- NIM s.r.l. Verona, Veneto, Itália). O aparelho realizou o procedimento com voltagem de 110 kv e amperagem de 16 ma/s. Foram realizados cortes sagitais e coronais de 1 em 1 mm, obtendo-se volumes total e ósseo, a fração do volume ósseo, o conteúdo mineral tecidual e a densidade mineral tecidual.

Todas as mandíbulas foram acondicionadas em caixas acrílicas rígidas com tampa contendo álcool 70% para um eficaz controle de contaminação cruzada. Os exames foram realizados com supervisão do radiologista Roberto Mansini.

As áreas de osso neo-formado foram comparadas entre os GC e de GE pela avaliação das unidades de escala de cinza de Hounsfield.

Para a avaliação foi identificada a área de alongamento e determinada a zona central como sendo a área de menor valor na escala de Hounsfield. A partir deste

ponto central, foram tomadas duas medidas distantes a 2mm da central. Realizou-se de cada lado da zona central (anterior e posterior).

4.9 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Realizou-se a remoção das espécimes relativos a área de alongamento, após a fixação das mandíbulas em álcool 70%. Foram utilizadas as duas perfurações mais distais relativas aos parafusos de fixação do distrator como parâmetros para osteotomia, a qual foi realizada com serra recíprocante (Osteomed, Dallas, USA). Uma vez removida a peça de tecido ósseo, com aproximadamente 14 mm, foi enviada para o laboratório de histologia onde foi descalcificada (EDTA 10%) por 36 horas. Após este procedimento, os espécimes foram processados e incluídos em blocos de resina (Technovit 9100 NEU[®]) Posteriormente os cassetes contendo os espécimes foram levados a um micrótomo (Isomet 2000[®]) onde seções transversais de 7 µm de espessura foram obtidas para realização da técnica de coloração.

Foi utilizada a técnica de Tricrômio de Mallory para evidenciação das áreas de osso neoformado e zona fibrovascular. As análises quantitativas foram obtidas por histomorfometria, a qual foi realizada avaliação sob microscopia óptica (Nikon Eclipse Ti-U, Japão).

As avaliações foram realizadas, não a partir do centro geométrico da área alongada, mas sim a partir da identificação da área de menor mineralização na zona

central dotecido neoformado (zona fibro vascular central). A partir da identificação da zona central foram realizadas duas medidas, uma proximal (chamada de zona fibrovascular lateral proximal) e outra distal (chamada de zona fibrovascular lateral distal) com 2 mm de distância da zona central. (Figuras 14 A e B)

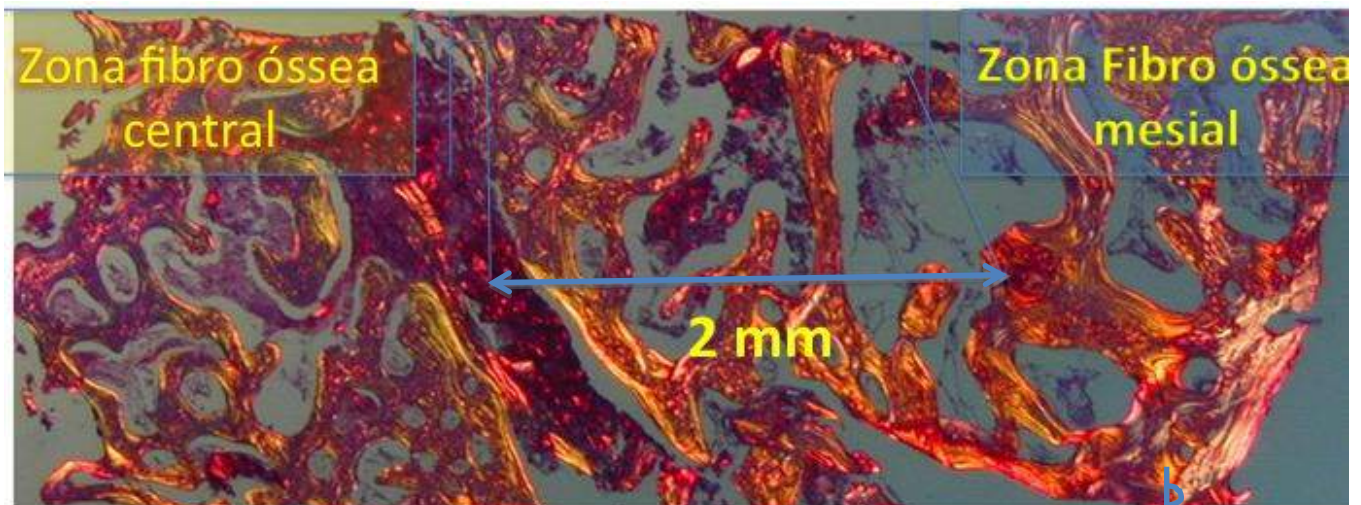


Fig 14 A. Identificação da área de menor mineralização da região de regeneração por distração osteogênica (zona fibrovascular central).

Fig 14 B Medida tomada a partir da zona fibrovascular central a partir deste ponto foi traçada uma reta de 2 mm (representada pela seta) anterior a este ponto (ZFVA) de onde foi realizada a histomorfometria da zona fibrovascular.

4.10 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Realizou-se as avaliações a partir da identificação da área de menor mineralização do tecido neoformado (zona fibrocascular central) em todas as lâminas estudadas A partir da identificação da zona central foram realizadas duas medidas uma proximal e outra distal com 2mm de distância da zona central. De cada uma destas áreas foram obtidas imagens digitais capturadas através de câmera digital CCD[®] (Rt Color; Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) acoplada a um microscópio de luz Nikon Eclipse Ti-U com uma objetiva de 10x com escala de 100 micrômetros.

Os examinadores traçaram todas as imagens utilizando o programa Image J[®] (Lumenera Corporation, Ottawa, Canadá) para mensuração dos parâmetros: Tecido Mineral Vital (TMV), Tecido Não Mineral (TNM).

Todos os resultados foram obtidos em pixels correspondentes ao trabeculado ósseo e convertido para micrômetros quadrados a fim de expressar a área total e área de tecido mineralizado sendo então convertidos em porcentagem da área total (Figura 15).

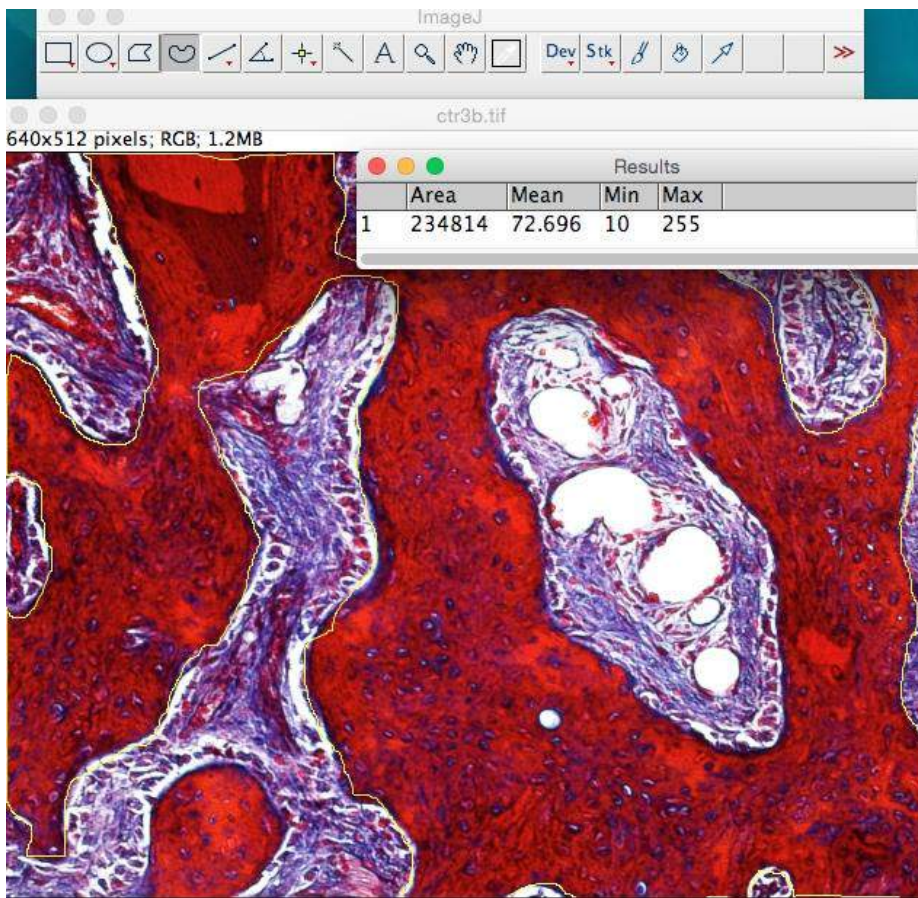


Fig 15 Imagem da histomorfometria (programa Image J[®]) com demarcação da área estudada e sua conversão em pixels e porcentagem de área ocupada (GE)

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram previamente quantificados pelo uso do *software GraphPad Prism*[®](GraphPad Softwaree Inc., San Diego, EUA). Os grupos controle GC e GE constituíram as variáveis independentes. As análises tomográficas e de histomorfometria foram as variáveis dependentes do estudo.

Para análise dos resultados foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney (SIEGEL 2006). Comparou-se os resultados observados nos grupos controle (GC) e grupo estudo (GE) para as seguintes variáveis: valores da escala de Hounsfield nas áreas fibro vasculares central, e soma das zonas fibro vasculares proximal e distal. Porcentagem da área de ocupação do tecido mineralizado observado na histomorfometria na área fibrovascular central e porcentagem da área de ocupação do tecido mineralizado, (área proximal e distal) de tecido observado na histomorfometria respectivamente nas áreas fibrovasculares laterais anterior e posterior.

A hipótese nula (H_0) testada foi de igualdade entra a média dos grupos ($média_1=média_2$). O nível de confiança assumido foi de 5%, ou seja, de 95% de confiança $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

As cirurgias de lipectomia, distração osteogênica e os alongamento ósseos ocorreram sem intercorrências, sendo detectado desgaste em plano inclinado dos dentes incisivos, desocclusão e laterognatia em todos os animais (Figura 16).



Figura 16. Desocclusão dos incisivos, laterognatia com desvio da linha média dentária (identificada na linha azul) e desgaste em plano inclinado com diferença nos tamanhos do dentes incisivos.

Até o momento da eutanásia dos animais, as regiões de exteriorização dos distratores apresentavam-se limpas, sem sinais de secreção, porém com tecido de granulação e discreto infiltrado inflamatório.

Todas as mandíbulas apresentaram sinais macroscópicos de neoformação óssea, no entanto, o grupo controle apresentava uma cortical mais rugosa e irregular na área de alongamento sendo mais facilmente sua identificação. O grupo de

Resultados

estudo apresentava um osso mais uniforme com a área de alongamento menos (Figura 19).

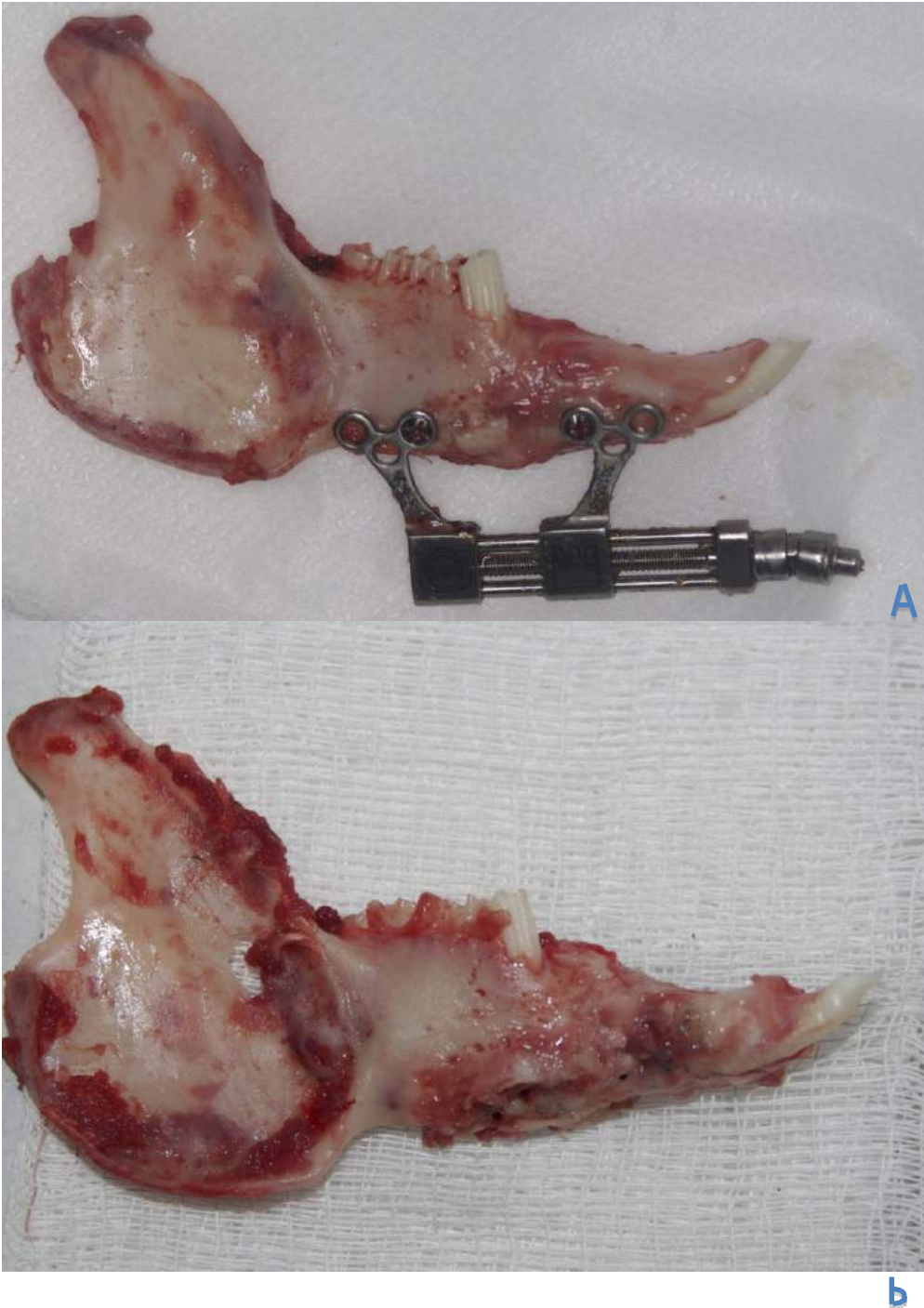


Figura 17 A Tecido neoformado no grupo de estudo com aspecto macroscópico mais organizado e regular. Figura 17 B Tecido neoformado no grupo controle com zona fibrovascular ainda desorganizada, rugosa e irregular , mostrando mais desorganização no tecido alongado.

Resultados

Os anticorpos CD16,CD31,CD34,CD45 se apresentaram negativos, excluindo células de hemáticas. Os anticorpos CD73 E CD105 apresentaram perfil positivo na imunofenotipagem caracterizando células da linhagem mesenquimal (tabela1).

Tabela1- Lista de marcadores de superfície e suas expressões, utilizados para caracterização das células-tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo de coelhos e avaliadas por citometria de fluxo (Guava easyCyte[®])

Marcador	Tipo de Expressão
CD16	NEGATIVA
CD31	NEGATIVA
CD34	NEGATIVA
CD45	NEGATIVA
CD73	POSITIVA
CD105	POSITIVA

Positiva: Expressão > 95% / Negativa: Expressão < 5%. O resultado obtido permite excluir as células da linhagem hematopoiética e mostra expressão positiva compatível com células mesenquimais

A avaliação das tomografias pela escala de Hounsfield mostrou diferenças significativas nas áreas avaliadas. A área lateral apresentou-se com média de 111,8 ±9,7 UH (unidades Hounsfield) no grupo controle (GC) contra 151±24,1 UH no

Resultados

grupo estudo(GE), com z calculado de 3,63 e $p = 0,001$ (tabela 2). A área central apresentou área com média de $35,2 \pm 13,4$ UH no grupo controle (GC) contra $98,2 \pm 41,8$ UH no grupo GE, com z calculado de 2,61 e $p = 0,0045$, mostrando um padrão decrescente em números absolutos nas medidas da percentagem de área mineralizada na medida que as avaliações se afastam do centro (tabela 3).

Tabela 2- Valores das medianas e de desvio padrão (DP) do grau de mineralização do tecido ósseo expresso em Unidades de Hounsfield (UH) obtidos por meio de tomografias tipo feixe cônico da zona fibrovascular lateral (ZFV Lateral). Estes valores são representativos da média entre as medidas das ZFV Lateral proximal e distais.

ZFV Lateral			
	GC	GE	<i>p</i>
1	98,5	131,5	
2	113	168,5	
3	109,5	153,5	
4	114,5	151	
5	121	170,5	
Mediana/DP	114,5±9,7	148±24,1	0,0045*

Grupo Controle (GC); Grupo Estudo (GE)

Teste de Mann-Whitney onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e assinalados com um (*)

Tabela 3- Valores das medianas de desvio padrão (DP) do grau de mineralização do tecido ósseo expresso em Unidades de Hounsfield (UH) obtidos por meio de tomografias tipo feixe cônico da zona fibrovascular central (ZFV Central).

ZFV Central			
	GC	GE	<i>p</i>
1	27	127	
2	37	68	
3	18	80	
4	41	96	
5	53	172	
Mediana/DP	37±13,4	96±41,8	0,0045*

Grupo Controle (GC); Grupo Estudo (GE)

Teste de Mann-Whitney onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e assinalados com um (*)

Resultados

A histomorfometria medida na área lateral proximal demonstrou resultados com diferenças significativas entre os grupos controle e de estudo nas áreas avaliadas com média de $37,1 \pm 14,7\%$ no grupo controle (GC) e $77 \pm 9,1\%$ no grupo estudo (GE) com z calculado de 3,78 e $p=0,0001$ (tabela 4).

Tabela 4- Valores das medianas e desvio padrão da quantidade de tecido mineralizado (TM) da zona fibrovascular lateral proximal (ZFV Lateral Proximal) obtidos por histomorfometria e expressos em porcentagem.

ZFV Lateral Proximal			
	GC	GE	<i>p</i>
1	57,1	81,8	
2	39,1	79,1	
3	15,8	86,1	
4	39,3	75,8	
5	34,3	62,2	
Mediana/DP	$39,1 \pm 14,7$	$79,1 \pm 9,1$	0,0001*

Grupo Controle (GC); Grupo Estudo (GE)

Teste de Mann-Whitney onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e assinalados com um (*)

A histomorfometria medida na área lateral distal demonstrou resultados com diferenças significativas entre os grupos controle e de estudo nas áreas avaliadas com média de $36,7 \pm 12,9\%$ no grupo controle (GC) e $74,9 \pm 12,9\%$ no grupo estudo (GE) e $p=0,0001$ (tabela 5).

Resultados

Tabela 5- Valores das medianas e desvio padrão da quantidade de tecido mineralizado (TM) da zona fibrovascular lateral distal (ZFV Lateral Distal) obtidos por histomorfometria e expressos em porcentagem.

ZFV Lateral Distal			
	GC	GE	<i>p</i>
1	47,2	95,4	
2	39,3	64,4	
3	25,2	67,1	
4	33,4	67,7	
5	38,4	79,8	
Mediana/DP	38,4±12,9	67,7±12,9	0,0001*

Grupo Controle (GC); Grupo Estudo (GE)

Teste de Mann-Whitney onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e assinalados com um (*)

A zona fibrovascular central mostroudiferença estatística significativa entre os grupos controle e de estudo com uma área de 25,3±10,6% no grupo controle e 61,5±9,9% no grupo GE $p= 0,0045$ (tabela 6).

Tabela 6- Valores das medianas e desvio padrão da quantidade de tecido mineralizado (TM) da zona fibrovascular central (ZFV Central) obtidos por histomorfometria e expressos em porcentagem.

ZFV Central			
	GC	GE	<i>p</i>
1	32,7	75,5	
2	31,3	47,7	
3	10,6	59,6	
4	17,7	63,5	
5	34,3	61,2	
Mediana/DP	31,3±10,6	61,2±9,9	0,0045*

Grupo Controle (GC); Grupo Estudo (GE)

Teste de Mann-Whitney onde os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes e assinalados com um (*)

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Neste estudo foi utilizado o coelho adulto da raça Neo Zelandês como modelo animal para a avaliação da regeneração por distração osteogênica de osso mandibular irradiado. O modelo animal tem sido largamente utilizado para o estudo das bases biológicas da distração osteogênica. Apesar de NIEMEYER *et al.* (2007) afirmar que o uso de animais de pequeno porte no estudo de regeneração óssea em calvária pode não representar um defeito crítico, mas apenas defeitos parciais, devido a grande velocidade de reparação este modelo tem sido amplamente utilizado no estudo de defeitos críticos (ALOISE *et al.*, 2015; ZIMMERMANN *et al.*, 2015). Apesar do uso de animais de pequeno porte ser controverso em regeneração óssea de defeitos críticos em calvária, este modelo experimental é amplamente utilizado no estudo da distração osteogênica (TSUBOTA *et al.*, 1999; CAMPISI *et al.*, 2003; SHAO *et al.*, 2006; ABUDUSAIMI *et al.*, 2011; DOGYANG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015).

DJASSIM *et al.* (2007) revisaram protocolos dos estudos de distração osteogênica com modelos animais e concluíram que o mais utilizado foi o coelho. Neste estudo, foi selecionado o coelho por sua fácil adaptação às condições do experimento, boa aceitação como modelo de estudo pelo comitê de ética e pela vasta experiência do Laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica UNIFESP no manuseio deste modelo (PELLEGRINE *et al.*, 2014; ALOISE *et al.*, 2015; ZIMMERMAN *et al.*, 2015).

A quantidade de animais selecionados em cada grupo deste estudo foi semelhante aos estudos de autores que utilizaram modelo animal em trabalhos com distração osteogênica. ZHANG *et al.* (2012) utilizaram coelhos distribuídos em dois grupos de seis animais, no estudo de ZHANG *et al.* (2012) foram utilizados 24 coelhos distribuídos em dois grupos porém sacrificados em períodos diferentes, resultando em três animais para cada período estudado, CLARK *et al.* (2006), utilizaram em seu estudo 20 coelhos distribuídos em quatro grupos de cinco animais por grupo, quantidade semelhante por grupo ao presente estudo. Além das referências na literatura, foi realizado um cálculo preditivo de tamanho amostral, levando em consideração o desfecho primário.

Neste estudo, os animais foram devidamente ambientados de modo padronizado. Esta padronização seguiu as recomendações de FERREIRA, HOCHMAN, BARBOSA (2005) garantindo assim que obtivéssemos a maior uniformidade possível aos animais utilizados neste experimento em relação as questões ambientais, genéticas e experimentais, uma vez que quanto maior a uniformidade, menor a quantidade amostral mínima, estando o estudo em conformidade com a filosofia de ética médica em pesquisa com animais.

A técnica de isolamento e expansão das células-tronco mesenquimais do tecido adiposo utilizada neste estudo foi a descrita para lipectomia do panículo dorsal descrita por MAZZETI *et al.* (2010) e ZIMMERMAN *et al.* (2015).

Vários modelos experimentais têm sido usados a fim de estudar a regeneração óssea. A calvária tem sido muito utilizada para avaliação de enxertos (ALOISE *et al.*, 2015; ZIMMERMAN *et al.*, 2015) e distração osteogênica. Porém para o estudo da distração osteogênica a tíbia e a mandíbula são os ossos mais utilizados nos estudos (ZHANG *et al.*, 2011; AIMAITI *et al.*, 2011 e ÇAKIR-ÖZKAN *et al.*, 2011).

Os modelos de defeito crítico em calvária e de alongamentos ósseos em mandíbula, apesar de sua ampla utilização, são modelos em que a regeneração ocorre em condições ideais, uma vez que tanto osso quanto retalhos apresentam-se livres de qualquer dano (PELLEGRINE *et al.*, 2014; ZIMMERMAN *et al.*, 2015). Desta maneira, optamos por um modelo onde tecido ósseo e tecidos adjacentes apresentassem alto grau de deficiência a fim de verificar a capacidade desta células-tronco de minimizar ou reverter não apenas um defeito crítico mas também em uma área cujos tecidos adjacentes se apresentassem comprometidos. Desta forma estuda-se um modelo mais próximo à realidade clínica.

A distração osteogênica pode ser considerada forma de engenharia tecidual uma vez que, por meio da geração de tensão mecânica na área de regeneração óssea tem capacidade de produzir aumento na concentração de colágeno tipo I. Também produz aumento de fatores de crescimento ósseo conjuntamente ao incremento na migração de vasos. Conseqüentemente, a distração osteogênica produz um arcabouço endógeno, que resulta em maior transcrição celular e angiogênese superiores às

encontradas em uma zona de fratura óssea.(KNIMPENBERG *et al.*, 2005; SHAO *et al.*, 2006 e LEE *et al.*, 2008).

A radiação ionizante é amplamente utilizada no tratamento de diversos tumores da face, sendo a osteorradição necrose uma das principais complicações deste procedimento (HEE-KYUN *et al.*, 2009). Apesar da distração osteogênica estimular a angiogênese (DONNEYS *et al.*, 2013), os trabalhos de TSUCHITA *et al.*(2005), e DESHPANDE *et al.*(2015) demonstraram que quando submetida a irradiação o osso neoformado por distração osteogênica apresenta-se imaturo e com falhas na sua mineralização decorrentes de uma redução na vascularização do tecido alongado. O comprometimento do osso neoformado em mandíbulas irradiadas também foi relatado por ZHANG *et al.*(2011), ZHANG *et al.*(2012), FELICE *et al.*(2013), e ZHEUTLIN *et al.*(2015),estes estudos demonstraram que a irradiação pode alterar a expressão de fatores de crescimento. Podem produzir a redução e até mesmo a supressão de metaloproteínas e comprometer a angiogênese,tendo como resultado o comprometimento da maturação do osso alongado durante o processo de distração osteogênica, sendo ela um fator de risco a ser considerado na aplicação desta técnica em áreas submetidas a radioterapia.

O método de processamento e cultura das células-tronco derivadas do tecido adiposo seguiu o protocolo descrito por GAIBA *et al.* (2012). Este tecido é uma fonte rica em células mesenquimais e apresenta quase o dobro da população em relação a medula óssea (NIEMAYER *et al.*, 2007; CHEN *et al.*,2012) caracteriza-se por ser de

fácil acesso cirúrgico, com baixa morbidade e alto índice de sucesso na coleta e cultura de células-tronco coletadas do panículo adiposo dorsal do coelho (GAIBA *et al.*, 2012; PEPTAN *et al.*, 2006; PELLEGRINE *et al.*, 2014; ZIMMERMAN *et al.*, 2015).

De acordo com os critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) para células-tronco mesenquimais, são necessários os testes de imunofenotipagem e diferenciação celular, a fim de determinar a linhagem das células utilizadas. Neste estudo, foram selecionados os marcadores CD16, CD31, CD45, CD73, CD105. Obteve-se tendo como resultados, a expressão positiva para os marcadores CD73, e CD105 e negativos para a expressão de CD16, CD31, CD34, e CD45. Os resultados permitiram excluir assim as células da linhagem hematopoiética. As células foram capazes de se diferenciarem em linhagens adipoblásticas (verificadas pela coloração *Oil Red O*), condroblásticas (verificadas pela coloração Azul de Alcian) e osteoblástica (verificadas pela coloração Alizarina vermelha).

O protocolo adotado na distração osteogênica neste estudo, seguiu os parâmetros recomendados por DJASIN *et al.* (2007) em sua revisão. A latência de cinco dias foi adotada por SHAO *et al.* (2006) e SHEN *et al.* (2012), e o ritmo de ativação do distrator (alongamento) foi o mesmo adotado por SHAO *et al.* (2006), FUJIO *et al.* (2011) e JIANG *et al.* (2011). O período de consolidação de 4 semanas, foi adotado por CAMPISI *et al.* (2003), SHAO *et al.* (2006), TSUCHIYA *et*

al. (2005) e ZHEUTLIN *et al.* (2015) que demonstraram que no período de quatro semanas, foi possível observar claramente os danos na vascularização e angiogênese decorrentes da irradiação no tecido alongado. Definiu-se portanto um período adequado para a avaliação da ação das células-tronco sobre o tecido neoformado e comprometido pela irradiação.

A forma utilizada para transplantar as células-tronco mesenquimais na área de distração osteogênica foi através de injeção das células no tecido fibrovascular em uma solução 1 ml de soro fisiológico (S.F.) a 0,9%. Apesar de haver diversas formas para incluir as células-tronco, dentre elas: implante de células-tronco carregadas em esponja de colágeno no ato da osteotomia (DESHPANDE *et al.*, 2013), injetadas em associação com colágeno bovino (ZHANG *et al.*, 2012), a injeção das células com soro fisiológico a 0,9% foi utilizada por diversos autores entre eles: HANANG & CHOI (2010), EGUCHI *et al.* (2011), ZHANG *et al.* (2012), DOGYANG *et al.* (2013), NOMURA *et al.* (2014), WANG *et al.* (2015), DESHPANDE *et al.* (2015), WU *et al.* (2015), HADIDI *et al.* (2016).

A biologia envolvida na regeneração óssea através da distração osteogênica é bastante complexa. A tensão mecânica produzida no processo de alongamento se traduz em mecanotransdução no nível celular e molecular, diferenciando a distração osteogênica da consolidação de uma fratura óssea (PACICCA *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2008). A mecanotransdução produz alterações no meio extracelular e na

expressão proteica das células-tronco implantadas (KNIPPENBERG *et al.*, 2005), com aumento do número e diâmetro dos vasos neoformados (MOIOLI *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2010; AIAMATI *et al.*, 2011; DONNEYS *et al.*, 2012; DASHPANDE *et al.*, 2015) e maior concentração de colágeno tipo I, VEGF, FNT, BMP2, BMP4 e BMP7, IL-6, RANK/RANK-L (CAMPISI *et al.*, 2003; PEREZ-SAYANS *et al.*, 2010; FORRIOL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; MONACO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2012; NOMURA *et al.*, 2014, SINGH *et al.*, 2016). Apesar da maior sinalização celular durante a distração osteogênica, muitos autores tem demonstrado a possibilidade de incrementar a regeneração por aceleração da ativação ou da maturação do osso neoformado, utilizando plasma rico em plaquetas (HIBI *et al.*, 2006; PEREZ-SAYANS *et al.*, 2010; HWANG e CHOI 2010)), BMP (MYZUMOTO *et al.*, 2003; EGUCHI *et al.*, 2011; ZAO *et al.*, 2011; STOGOV *et al.*, 2016), adiponectina (JIANG *et al.*, 2011), SDF-1 (FUJIO *et al.*, 2011), terapias gênicas (HONG *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2015) e células-tronco mesenquimais (SHAO *et al.*, 2006, SHEN *et al.*, 2006; DONGYANG *et al.*, 2013; NOMURA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2016) e células-tronco mesenquimais associadas a terapias gênicas (CASTRO-GOVEIA *et al.*, 2012).

As formas de avaliação da maturação óssea na regeneração por distração osteogênica foram as mais variáveis, FELICE *et al.* (2013) reportaram o uso de testes biomecânicos correlacionado maturação óssea com resistência mecânica. Porém o método mais utilizado foi a avaliação histológica, reportando apenas à interpretação

dada a lâmina sem quantificar a maturação óssea (ZHANG *et al.*, 2012). A histomorfometria representa uma forma quantitativa de avaliação histológica, permitindo a obtenção de resultados objetivos e reprodutíveis, bem como facilitando a comparação com outros estudos da literatura, como utilizado por PRICE *et al.*(2008), DONGYNG *et al.* (2013),YAMUCHI *et al.* (2010)e HADIDI *et al.* (2016).Neste estudo optou-se pelo uso da histomorfometria com a interpretação da porcentagem de área ocupada pelo tecido mineralizado(TCHANQUE_FOSSUO *et al.*,2012).

No preente estudo foi avaliada influência das células-tronco derivadas do tecido adiposo em distração osteogênica de risco, devido o comprometimento mandibular a regeneração óssea causada pela irradiação. Estudos prévios (ABUDUSAIMI *et al.*, 2011, AIMAIT *et al.*, 2011), demonstraram que células-tronco podem incrementar a regeneração óssea em áreas de necrose vascular induzida na cabeça de tibia; incrementando a revascularização da área danificada.ZENG *et al.*(2016) demonstraram a possibilidade de vitalizar um disco de transporte avascular (osso homólogo) através de engenharia tecidual para a correção de defeitos segmentares da mandíbula. KAN *et al.* (2014) demonstraram por histomorfometria que o uso de laser de baixa potência (45J)pode aumentar o osso trabeculado no período de 28 dias pós alongamento (aumento de 3,25 no grupo controle para 5.75 no grupo de estudo) e do osso cortical (aumento de 0,13 no grupo controle para 0.2 no

Discussão

grupo de estudo). RECREO *et al.*(2015), demonstraram a capacidade das células-tronco associadas a plasma rico em plaquetas de restabelecer a homeostase em áreas de osteonecrose induzidas por bifosfanados. Estudos prévios reportaram bons resultados com o uso de oxigenoterapia hiperbárica (CLARK *et al.*, 2006) e administração de feroxamine (FELICE *et al.*, 2013) em mandíbulas irradiadas submetidas a distração osteogênica, demonstrando a possibilidade de se atenuar os efeitos deletérios da irradiação na regeneração óssea. TCHANQUE-FOSSUO *et al.* (2013) demonstrou por histomorfometria, aumento de tecido mineralizado de $53,0 \pm 11,46\%$ para $74,24 \pm 6,44\%$ através da citoproteção celular pela administração de Amifosina em mandíbulas irradiadas de camundongos.

DESHPANDE *et al.* 2013 transplantaram células-tronco em esponja de colágeno modificadas (DESHPANDE *et al.*, 2015) obtiveram aceleração na maturação do osso alongado em mandíbulas de coelhos, DONGYNG-MA *et al.* (2013) reportaram um incremento da mineralização do tecido alongado (avaliação por histomorfometria) de $37,5 \pm 6,4\%$ para $66,5 \pm 9,7\%$ com a injeção de células-tronco mesenquimais, achados semelhantes ao encontrado na nossa zona fibrovascular mesial e distal (respectivamente $39,1 \pm 14,7$ GC e $79,1 \pm 9,1$ GE e $38,4 \pm 12,9$ GC e $67,4 \pm 12,9$ GE)ZHANG *et al.*(2012) utilizaram um modelo semelhante ao presente estudo, aplicaram irradiação fracionada na mandíbula de coelhos. Porém, as células-tronco eram derivadas da medula óssea e foram associadas a BMP e combinadas com gel de colágeno bovino. Os autores encontraram aumento

da maturação do tecido ósseo. O presente estudo não utilizou BMP e houve aumento da maturação do tecido ósseo. Este aumento também foi obtido neste estudo, onde não foi utilizada a associação com BMP ou meio osteogênico na cultura e houve um aumento da maturação do tecido ósseo. Uma vez que a matriz de tecido fibrovascular apresenta um aumento na concentração deste sinalizador, decorrente da mecanotransdução induzida pela distração (CAMPISI *et al.*, 2003; PEREZ-SAYANS *et al.*, 2010; FORRIOL *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; MONACO *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2012; NOMURA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2015).

A injeção das células com soro fisiológico reduz a manipulação celular e os custos da terapia. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os achados reportados por PRICE *et al.* (2008), DONGYANG_MA *et al.* (2013), TCHANQUE-FOSSUO *et al.* (2012), YAMUCHI *et al.* (2010), DESHPANDE *et al.* (2015), ZENG *et al.* (2015), HADIDI *et al.* (2016). Neste estudo foi obtido incremento no tecido mineral da zona fibrovascular central de $31,3 \pm 10,6$ % no GC para $61,2 \pm 9,9$ % no GE ($p=0,0045$), e na zona fibrovascular mesial de $39,1 \pm 14,7$ % no GC para $79,1 \pm 9,1$ % no GE ($p=0,001$), e na zona fibrovascular distal de $38,4 \pm 12,9$ % no GC para $67,4 \pm 12,9$ % no GE ($p=0,001$). Como perspectiva do presente estudo temos o esclarecimento do papel das células-tronco injetadas na matriz óssea neoformada, uma vez que sua atuação ainda permanece obscura.

Mais estudos se fazem necessários para responder se estas células atuam diretamente na neoformação do tecido ósseo através da diferenciação em linhagens osteoprogenitoras, ou se elas coordenam, através de sinalização ou outro mecanismo ainda desconhecido, os eventos de maturação óssea.

Todos os autores que estudaram distração osteogênica utilizando avaliação histológica, histomorfometria e/ ou tomografia computadorizada para avaliar o osso neoformado, realizaram suas medidas utilizando avaliações de todas as áreas do alongamento, exceto o estudo de *WU et al.*(2015). A controvérsia realcioana a estes estudos reside no fato de que os dados relativos as diversas áreas do tecido alongado são mesclados com zonas de diferentes estágios de mineralização. A mistura dos dados relativos às diversas zonas pode levar a uma interpretação errônea da porcentagem total de osso mineralizado uma vez que a maturação ocorre da extremidade ao centro, sendo em períodos de três a cinco semanas difícil até mesmo a identificação do limite entre osso nativo e osso regenerado. No presente estudo a identificação da área de menor maturação a partir deste ponto, mensurou-se áreas distintas e comparáveis. A área de maturação central representa a área com função biomecânica mais crítica, sendo a zona que em humanos impede ou retarda o pleno retorno a carga sobre o osso alongado.

No presente estudo avaliou-se a capacidade das células-tronco em atenuar ou reverter a ação deletérea da irradiação sobre o osso neoformado por distração osteogênica, são necessários novos estudos para elucidar o mecanismo pelo qual as

células atuam, a proteômica e metabolômica envolvidas no processo, ainda permanecem obscuros, necessitando de novos estudos. O uso de animais em experimentos deste tipo ainda se faz necessário, mas o desenvolvimento de modelos celulares de mecanotransdução abriria novos campos de pesquisa.

Como perspectivas a estetrabalho, outros estudosdeverão ser executados até que se estabeleça um protocolo para o uso de terapia celularcom menor risco e morbidade em pacientes.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

A associação de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido Adiposo, na distração osteogênica, aumentou a porcentagem de tecido ósseo neoformado na mandíbula de coelhos irradiada.

REFERÊNCIAS

9.REFERÊNCIAS

Abudusaimi A, Alhemaitijiang Y, Wang YH, Cui L, Maimaitiming S, Abulikemu M. Adipose-derived stem cells enhance bone regeneration in vascular necrosis of the femoral head in the rabbit. *J. Int. Med. Res.* 2011;39(5):1852-60.

Aguena M, Fanganiello RD, Tissiani LA, Ishiy FA, Atique R, Alonso N, Passos-Bueno MR. Optimization of parameters for a more efficient use of adipose-derived stem cells in regenerative medicine therapies. *Stem Cells Int.* 2012;30:36-42

Aimaiti A, Saiwulaiti Y, Saiyiti M, Wang YH, Cui L, Yusufu A. Therapeutic effect of osteogenically induced adipose derived stem cells on vascular deprivation-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits. *Chin J Traumatol.* 2011;14(4):215-20.

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.

Andrade NN, Reshamwala SM, Subburaj K. Mandibular reconstruction through transport distraction using intraoral appliance. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011;69(8):2260-9.

Çakır-Özkan N, Eyibilen A, Özkan F, Gülbahar MY, Kabak YB. Immunohistochemical analysis of reconstructed sheep mandibles: transport distraction osteogenesis versus autogenous bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg.* 2001;169(4):1248-54.

Campisi P, Handy RC, Lauzier D, Amako M, Rauch F, Lessard ML. Expression of bone morphogenetic proteins during mandibular distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(1):201-8.

Castro-Govea Y, Cervantes-Kardasch VH, Borrego-Soto G, Martínez-Rodríguez HG, Espinoza-Juarez M, Romero-Díaz V, Marino-Martínez IA, Robles-Zamora A, Álvarez-Lozano E, Padilla-Rivas GR, Ortiz-López R, Lara-Arias J, Vázquez-Juárez J, Rojas-Martínez A. Human bone morphogenetic protein 2-transduced mesenchymal stem cells improve bone regeneration in a model of mandible distraction surgery. *J Craniofac Surg.* 2012;23(2):392-6.

Chandra A, Lin T, Zhu J, Tong W, Huo Y, Jia H, Zhang Y, Liu XS, Cengel K, Xia B,

Qin L. PTH1-34 blocks radiation-induced osteoblast apoptosis by enhancing DNA repair through canonical Wnt pathway. *J Biol Chem.* 2015;290(1):157-67.

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.

Chrcanovic BR, Reher P, Sousa AA, Harris M. Osteoradionecrosis of the jaws--a current overview--part 1: Physiopathology and risk and predisposing factors. *Oral Maxillofac Surg.* 2010;14(1):3-16.

Clark CL, Strider J, Hall C, Ferguson HW, Armstrong KL, Runner RR, Baur DA. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(4):589-93.

Dehghen M.M, Elaiminejad M.B, Motallebizadeh N, Halan J.A, Tagiyar s.S, Nikmahar A, Pedram M, Shahverdi A, Mehrjerdi K.H, Izad S. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell with platelet-rich plasma accelerate distraction osteogenesis in a canine model. *Cell J.* 2015; 17: 243-52

Deshpande SS, Weiss DM, Donneys A, Gallagher KK, Tchanque-Fossuo CN, Sarhaddi D, Buchman SR. An isogenic model of murine mandibular distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg.* 2013;24(2):540-4.

Deshpande SS, Monson LA, Cavaliere CM, Ayzengart AL, Buchman SR. Distraction osteogenesis following low-dose hyperfractionated irradiation in the rat mandible. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(8):1465-70

Deshpande SS, Gallagher KK, Donneys A, Nelson NS, Guys NP, Felice PA, Page EE, Sun H, Krebsbach PH, Buchman SR. Stem cells rejuvenate radiation-impaired vasculogenesis in murine distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg.* 2015;135:799-806.

Dhanasekaran M, Indumathi S, Kanmani A, Poojitha R, Revathy KM, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Surface antigenic profiling of stem cells from human omentum fat in comparison with subcutaneous fat and bone marrow. *Cytotechnology.* 2012; 64 (5) 497-509.

Djasim U. M, E. B. Wolvius, J. W. Van Neck, H. Weinans, K. G. H. Van Der Wal. Recommendations for optimal distraction protocols for various animal models on the basis of a systematic review of the literature. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2007;36: 877-83.

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.

Donneys A, Catherine N, Tchanque-Fossuo, Buchman RS. Bone regeneration in distraction osteogenesis demonstrates significantly increased vascularity in comparison to fractures repair in the mandible. *J. Craniofac. Surg.* 2012; 23: 328-32

Dongyang Ma, Ren L, yao H, Tian W, chem F, Zhang J, liu Y, Mao T. Locally injection of cell sheet fragments enhances new bone formation in mandibular distraction osteogenesis: A rabbit model. *J. Orthopaedic Res.* 2013; 54 : 1082-8

Eguchi Y, Wakitani S, Naka Y, Nakamura H, Takaoka K. An injectable composite material containing bone morphogenetic protein-2 shortens the period of distraction osteogenesis in vivo. *J Orthop Res.* 2011;29(3):452-6.

Felice PA, Ahsan S, Donneys A, Deshpande SS, Nelson NS, Buchman SR. Deferoxamine administration delivers translational optimization of distraction osteogenesis in the irradiated mandible. *Plast Reconstr Surg.* 2013; 132(4):542-8

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

Forriol F, Denaro L, Longo UG, Taira H, Maffulli N, Denaro V. Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. *Strategies Trauma Limb Reconstr.* 2010;5(2):71-8

Fujio M, Yamamoto A, Ando Y, Shohara R, Kinoshita K, Kaneko T, Hibi H, Ueda M. Stromal cell-derived factor-1 enhances distraction osteogenesis-mediated skeletal tissue regeneration through the recruitment of endothelial precursors. *Bone.* 2011;49(4):693-700.

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.

González-García R, Naval-Gías L. Transport osteogenesis in the maxillofacial skeleton: outcomes of a versatile reconstruction method following tumor ablation. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010;136(3):243-50.

Hadidi YN, kassaby M, Ahmed SAF, Khamis NS. Effec of mesenchymal stem cell application on the distracted bone microstructure: An experimental model. *Oral & Maxillofac. Surg.* 2016 *In press*

Hayden RE, Mullin DP, Patel AK. Reconstruction of the segmental mandibular defect: current state of the art. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;20(4):231-6.

Hibi H, Yamada Y, Kagami H, Ueda M. Distraction osteogenesis assisted by tissue engineering in an irradiated mandible: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2006;21(1):141-7.

Hee-Kyun OH, Mark S. Chambers, Jack W. Martin, Hoi-Jeong Lim, Hong-Ju Park, .Osteoradionecrosis of the Mandible:Treatment Outcomes and Factors Influencing the Progress of Osteoradionecrosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:1378-86.

Hong P, Boyd D, Beyea SD, Bezuhly M. Enhance of bone consolidation in mandibular distraction osteogenesis: A contemporary review of experimental studies involving adjuvante therapies. *J. Plast Rec Surg* 2013; 66:883-95

Hwang YJ, Choi JY. Addition of mesenchymal stem cells to the scaffold of platelet-rich plasma is beneficial for the reduction of the consolidation period in mandibular distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(5):1112-24.

Jereczek-Fossa BA, Orecchia R. Radiotherapy-induced mandibular bone complications. *Cancer Treat Rev.* 2002;28(1):65-74.

Jiang X, Song D, Ye B, Wang X, Song G, Yang S, Hu J. Effect of intermittent administration of adiponectin on bone regeneration following mandibular osteodistraction in rabbits. *J Orthop Res.* 2011;29(7):1081-5.

Jung S, Kleineidam B, Kleinheinz J. Regenerative potential of human adipose-derived stromal cells of various origins. *J. Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2015;43 2144-51

Kesemenli C.C, Kaya H, Memisoglu K, Kaya B, Dirier A, Tosun B, Kilinc N. Distraction osteogenesis is inhibited by cancer radiotherapy with Co 60. *Clin Invest Med* 2015;32: 376-82

Knippenberg M, Helder MN, Doulabi BZ, Semeins CM, Wuisman PI, Klein-Nulend J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells acquire bone cell-like responsiveness to fluid shear stress on osteogenic stimulation. *Tissue Eng.* 2005;11(11-12):1780-8.

Lee DY, Cho TJ, Kim JA, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*. 2008;42(5):932-41.

Lee DY, Cho TJ, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, Choi IH. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone*. 2010;46(3):673-9.

Lee SJ, Kim BJ, Kim YI, Sohn CH, Jeon YK, Xu L, Kim SH, Kwon SY, Choi TH, Kim SW. Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Adipose Tissue-Derived Stem Cell on New Bone Formation in High-Speed Distraction Osteogenesis. *Cleft Palate Craniofac J*. 2016;53:84-92

López-Arcas JM, Arias J, Castillo J, Burgueño M, MARÍA J. Morán MJ, Chamorro M, e Martorell V. The Fibula Osteomyocutaneous Flap for Mandible Reconstruction: A 15-Year Experience. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010;68:2377-84.

Mazzeti MPV, Oliveira IS, Ferreira RM, Fauaz G, Ribeiro CN, Gomes PO, Pontes P, Ferreira AT, Eça LP. Qualitative and quantitative analysis of rabbit's fat mesenchymal stem cells. *Acta cirúrg, Bras*. 2010;25 (1):24-7.

Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper VN 3rd, Reddi AH. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 3:124-30.

Moioli EK, Clark PA, Chen M, Dennis JE, Erickson HP, Gerson SL, Mao JJ. Synergistic actions of hematopoietic and mesenchymal stem/progenitor cells in vascularizing bioengineered tissues. *PLoS One*. 2008;3(12):3922-8.

Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology*. 2011;75(8):1381-99.

Nabil S, Samman N. Incidence and prevention of osteoradionecrosis after dental extraction in irradiated patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011;40(3):229-43.

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.

Nomura I, Watanabe K, Matsubara H, Hayashi K, Sugimoto N, Tsuchiya H. Uncultured autogenous adipose-derived regenerative cells promote bone formation

during distraction osteogenesis in rats. *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(12):3798-806

Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfel Mizumoto Y, Moseley T, Drews M, Cooper VN 3RD, Reddi AH. Acceleration of regenerate ossification during distraction osteogenesis with recombinant human bone morphogenetic protein-7. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:124-30.

Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmerman A, De Melo e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25:567-72.

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.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Rey JM, García-García A. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(5):679-86.

Pichelmayer M, Zemann W. Bilateral vertical segmental distraction in a patient with bilateral cleft of lip, alveolus, and palate. *Cleft Palate Craniofac J.* 2012;49(3):365-8.

Price DL, Moore EJ, Friedman O, Garces YI, Kee AY, Furutani KM. Effect of radiation on segmental distraction osteogenesis in rabbits. *Arch Facial Plast Surg.* 2008 May-Jun;10(3):159-63

Rachmiel A, Srouji S, Emodi O, Aizenbud D. Distraction osteogenesis for tracheostomy dependent children with severe micrognathia. *J Craniofac Surg.* 2012;23(2):459-63.

Recreo P, Vera J.L.C, Hristov T.G, Birgillos E R, Albaretegi A, Burgeño A, Arranz A. Adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma for preventive treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in a murine model. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* 2015; (43) 1161-68

Reuther T, Schuster T, Mende U, Kübler A. Osteoradionecrosis of the jaws as a side effect of radiotherapy of head and neck tumour patients--a report of a thirty year retrospective review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(3):289-95.

Wang L, Zhao Y, Cao J, Yang X, Lei D. Mesenchymal stem cells modified with nerve growth factor improve recovery of the inferior alveolar nerve after mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2015;53:279-84

Watanabe Y, Sasaki R, Ando T, Okano T, Akizuki T. Multistage bone-charged distraction osteogenesis for aesthetic reconstruction of an extensive bone deficiency in the mandible. *J Craniofac Surg.* 2012;23(1):175-7.

Wu G, Zhou B, Chunbing H, Shaolam L. Gene expression of osteogenic factors following gene therapy in mandibular lengthening. *J. Craniofac Surg.* 2015;26: 1-4
 Xu J, Zheng Z, Fang D, Gao R, Liu Y, Fan ZP, Zhang CM, Wang SL. Early-stage pathogenic sequence of jaw osteoradionecrosis in vivo. *J Dent Res.* 2012 Jul;91(7):702-8.

Singh M, Vashistha A, Chaudhary M, Kaur G. Biological basis of distraction osteogenesis – A review . *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* (2016); 28 1–7

Shao Z, Liu B, Liu Y, Liu W, Liu R, Peng Q, Liu L. Distraction osteogenesis in the irradiated rabbit mandible. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59(2):181-7.

Shen QR, Zou SJ, Chen YX, Zhou Hx, Hu J. Effects of mesenchymal stem cells transplantation on cranial suture distraction osteogenesis in growing goats. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2006;24(2):153-5.

Stogov M.V, Tushina N.V, Emanov A.A. Serum concentration of growth factors in dogs under different condition of distraction osteogenesis. *Bulletin of experimntal Biol and Med.* 2015;2:213-15

Tchnaque-Fossuo C.N., Donneys A., Buchman. Quantitative histologic evidence of Amifosine induced cytoprotection in an irradiated murine model of mandibular distraction osteogenesis. *Plast Resonstr. Sur.* 2012; 6 : 1199-1207

Tee B.C, Sun Z. Mandibular distraction ostegenesis assisted by cell-based tissue engineering: a systematic review. *Orthod Craniofac Res* 2015; 18: 39-49

Tsubota S, tsuchiya H, Tomita Y, Minato H. Transplantation of osteoblasto-like cells to the distracted callus in rabbits. *J bone J Surg Br.* 1999;81(1):125-9.

Tsuchiya H, Uehara K, Sakurakichi K, Watanabe K, Matsubara H, Tomita K. Distraction osteogenesis after irradiation in a rabbit model. *J Orthop Sci.* 2005;10(6):627-33.

Yamuchi K, Takahasi T, Funaki H, Hamada Y, Yamashita Y. Histological and histomorphometrical comparative study of b-tricalcium phosphate block grafts and periosteal expansion osteogenesis for alveolar bone augmentation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2010; 39: 1000–1006

Zeng JJ, Guo P, Zhou N, Xie QT, Liao FC. Treatment of large bone defects with a novel biological transport disc in non-vascular transport distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2016. 11. Epub ahead of print

Zhang WB, Zheng WL, Chua TTD, Cheung KL. Expression of bone morphogenic protein, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on irradiated mandibles during distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 69:2860-71.

Zhang WB, Zheng LW, Chua TTD, Cheung KL. Treatment of irradiated mandibles with mesenchymal stem cell transfected with bone morphogenetic protein 2/7. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70:1711-16.

Zhang WB, Zheng LW, Chua DTT, Cheung, Kong H. Expression of MMP-1 and TIMP-1 in irradiated mandibles during distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70: 698-703

Zhao ZY, Shao L, Zhao HM, Zhong ZH, Liu JY, Hao CG. Osteogenic growth peptide accelerates bone healing during distraction osteogenesis in rabbit tibia. *J Int Med Res.* 2011;39(2):456-63.

Zheutlin AR, Deshpande SS, Nelson NS, Polyatskaya Y, Rodriguez JJ, Donneys A, Buchman SR. A Histomorphometric Analysis of Radiation Damage in an Isogenic Murine Model of Distraction Osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015 73(12):2419-28.

Zhu X1, Shi W, Tai W, Liu F. The comparison of biological characteristics and multilineage differentiation of bone marrow and adipose derived Mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res.* 2012;350(2):277-87.

Zimmermann A, Pelegrine A A, Peruso D, Martinez E F, Oliveira RM, Aloise A C, Ferreira LM. Adipose mesenchymal stem cell associated with xenograft in a guided regeneration bone model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30:1415-22.

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

The aim of this study is to evaluate the effect of adipose derived mesenchymal stem cell (ADSC) on the regeneration of distraction osteogenesis on irradiated mandible of adult rabbit. Ten adult rabbits were selected and the dorsal fat penicle was removed for harvesting and culture of adipose derived adult mesenchymal stem cells. The mandibles were irradiated on a single dose of 20Gy. After 30 days the animals underwent to mandibular lengthening by distractions osteogenesis. After 10mm of mandibular lengthening, the animals were divided on two groups. On the control group, 1 ml of saline solution was injected and on the study group, and ADSC (1×10^6) was injected in the study group. After consolidation phase (4 weeks) the mandibles were removed and evaluated by tomography. The spicements were cuted in slices (7- μ m per slice) for histological evaluation. The sections were stained with Mallory trichome and assessed under a light microscope. Histomorphometric were analysed using J image program and stataistic analyses obtained by Mann-Withney test ($p > 0,05$). The tomography shows a significant improvement on Hounsfield scale (ZFVL on GC 114,5 and GE 148 $p = 0,0045^*$ / ZFVC, 37, on GC to 96 GE, $p = 0,0045^*$). The Histomorphometric analysis demonstrated increase on the mineralized tissue occupation by new bone formation (ZFVD 37,5% on GC to 75.9% on GE $p = 0,0002^*$, ZFVM 39,1% on GC to 79,1% on GE $p = 0,0001^*$, ZFVC, 31,3% on GC to 61,2% no GE $p = 0,045^*$) The results achived, showed a significative increase on bone formation on fibrovascular zone ($z = 2.61$ and $p = 0,0045$). The injection of adipose derived mesenchymal stem cell is able to improve bone regeneration on irradiated distraction callus on rabbit mandible.

ANEXOS



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 9 de novembro de 2012
CEP Nº: 0333/12

Ilmo(a) Sr(a)

Pesquisador(a): MARCELO MELO SOARES

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 adultas derivadas do tecido adiposo na distração osteogênica de mandíbulas de coelhos pós radiação ionizante :

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 células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo, na distração osteogênica da mandíbula irradiada de coelhos.

RESUMO: Os animais serão distribuídos de forma randomizada em dois grupos com cinco animais cada.: Grupo 1 (Controle) e Grupo 2 (Experimental). Os 10 animais serão irradiados no Setor de Radioterapia do Hospital São Paulo- Unifesp-EPM com uma dose única 22.5 Gy na mandíbula. Após este procedimento, será realizada a distração mandibular bilateral utilizando os distratores de corpo de mandíbula e no mesmo tempo operatório será removido o pânículo de gordura dorsal de cada animal para obtenção das células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. O tecido adiposo será processado no laboratório de cultura de células da disciplina de cirurgia plástica da Unifesp-EPM onde as células serão isoladas e expandidas. Uma vez alcançado o número de células ideal, elas serão implantadas ao longo da área alongada das mandíbulas dos animais do grupo experimental (2) por injeção do material na matriz óssea neo formada. Serão realizados exames radiográficos e histológicos das mandíbulas dos animais dos dois grupos, sendo as análises realizadas por avaliador cego. Será realizado o óbito induzido dos animais, em grupos de seis, ao final de quatro semanas.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Células-tronco derivadas do tecido adiposo tem se tornado uma atrativa população de células multipotentes pra uso em terapias regenerativas, sendo rapidamente aceitas como uma alternativa ao uso de células tronco mesenquimais adultas derivadas de medula óssea uma vez que ambas apresentam similaridades fenotípicas. Diversos modelos animais tem sido usados no estudo da distração osteogênica após a radioterapia porem com resultados controversos devido a diferenças nos modelos animais e nos protocolos de radioterapia e distração osteogênica. A irradiação do tecido ósseo, é um procedimento padrão para os pacientes oncológicos; porém, acarreta uma hipovascularização com comprometimento da regeneração óssea. A utilização da distração osteogênica se representa um avanço no tratamento das sequelas das cirurgias ablativas, principalmente aquelas em que se acomete a mandíbula. Portanto a utilização de células tronco mesenquimais adultas (CTMA) derivadas do tecido adiposo pode, de alguma forma diminuir a morbidade e risco deste procedimento, incrementando a neoformação óssea.

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo. Apresentada carta de ciência e de acordo do CEDEME com o fornecimento do animal, informado o local de manutenção dos animais(CEDEME) e nome do veterinário responsável - Dra Mary CS Pasqualim.

TCLE: Não se aplica

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo

CRONOGRAMA DO ESTUDO: 24 meses

PRIMEIROS RELATÓRIOS PARCIAIS PREVISTOS PARA : 4/11/2013 e 30/10/2014

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,

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

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/guiabbbp_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

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/>

Siegel S, Castelan JR,. Estatística não paramétrica para ciência do comportamento. Segunda edição. Artmed. Porto Alegre 448p 2006.

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