

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA OU NÃO
À FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES
NA REGENERAÇÃO DE OSSO ALVEOLAR DE CÃES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Érica Batista Fontes

**Santa Maria, RS, Brasil
2009.**

HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA OU NÃO À FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES NA REGENERAÇÃO DE OSSO ALVEOLAR DE CÃES

por

Érica Batista Fontes

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, área de Concentração em Cirurgia Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para
obtenção do grau de

Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Ney Luis Pippi

Santa Maria, RS, Brasil

2009

Fontes, Érica Batista, 1981-

F683h

Hidroxiapatita sintética associada ou não à fração total de células mononucleares na regeneração de osso alveolar de cães / por Érica Batista Fontes ; orientador Ney Luis Pippi. - Santa Maria, 2009.

70 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina veterinária, RS, 2009.

1. Medicina veterinária 2. Célula mononuclear 3. Medula óssea 4. Hidroxiapatita 5. Osso alveolar 6. Cães I. Pippi, Ney Luis, orient. II. Título

CDU: 619:617-089:636.7

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2009

Todos os direitos autorais reservados a Érica Batista Fontes. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor. Endereço: Av. Roraima, n. 1000, Universidade Federal de Santa Maria, Hospital Veterinário, Bairro Camobi, Santa Maria - RS, 97110-000. Fone (0xx)55 3220-9400; Endereço Eletrônico: ericabfontes@hotmail.com.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA OU NÃO À FRAÇÃO
TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES NA REGENERAÇÃO DE
OSSO ALVEOLAR DE CÃES**

elaborada por

Érica Batista Fontes

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Ney Luis Pippi, Dr.

(Presidente/Orientador)

Alceu Gaspar Raiser, Dr. (UFSM)

Emerson Antonio Contesini, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 09 Março de 2009.

**Ao meu irmão ANDREI, pelo carinho,
cumplicidade e apoio, mesmo que a distancia.**

**Aos meus pais, ELIZABETH E RENILDES,
pelo exemplo e pela certeza da vitória, dedico
este trabalho.**

AGRADECIMENTOS

“Sorte é estar preparado para a oportunidade quando ela aparece” (Disrael)

A partir dessa definição, faço os **Agradecimentos**:

Ao professor **Ney Luís Pippi** pela valiosa orientação e transmissão dos seus conhecimentos, amizade e carinho que me concedeu durante o meu curso.

Aos professores **Andréa Pacheco Batista Borges e Alceu Gaspar Raiser** pelas valiosas sugestões, correções e apoio.

Aos professores **Alexandre Mazzanti e Adriano Carregaro Bonfim** pelos ensinamentos e incentivos.

Aos **Professores do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria**, pelo convívio e apoio durante o meu curso de Mestrado.

À **Universidade Federal de Viçosa** pela minha formação acadêmica, cuja preparação me permitiu chegar aonde cheguei.

Ao **Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Maria** pela receptividade.

Ao pós-graduando **Kleber Gomes**, e aos estagiários, **Arícia Sprada, Gabriele Maria Callegaro Serafini, João Paulo Monteiro Carvalho Mori da Cunha, Maurício da Rosa e Monique Togni**, a “equipe Magaiver”, que nem mesmo por falta de água se deixou abalar, pela dedicação e comprometimento com o presente trabalho.

À **Marina Gabriela Monteiro Carvalho Mori da Cunha (Bia)**, meu braço direito durante o decorrer desse trabalho, pelo companheirismo e enorme paciência, tornando minha vida em Santa Maria muito mais agradável. Amiga, obrigada de coração.

Às pós-graduandas **Daniela Brollo Martins e Luciele Varaschini** pelas valiosas contribuições.

Aos meus amigos de mestrado, **Diego Beckmann, Paula Basso e Rogério Santos**, por toda convivência e amizade, pelas conversas e pela ajuda. Sentirei falta de tudo e de todos.

Aos colegas **Charlies Pelizzari, Daniel Muller, Débora Olsson, Fabiano Salbego Graziela Kopinits de Oliveira e Guilherme Tognoli** por terem proporcionado momentos agradáveis e imenso crescimento profissional.

À minha amiga **Anna Leatícia Trindade** que não mediu esforços para me ajudar, nos mais diversos momentos de dificuldade.

A todos os funcionários, em especial a **Nelci e Anita**, pela disposição, estímulo e ajuda sempre presentes durante a realização deste trabalho. A vocês o meu muito obrigado.

Ao **Laboratório de Cirurgia Experimental – LACE**, pelas instalações e equipamentos que possibilitaram a realização deste experimento.

Ao **Laboratório de Análises Clínicas** e seus funcionários pela realização dos exames laboratoriais.

Aos professores **Rafael Figueira**, da Universidade Federal de Santa Maria e **Marlene Isabel Vargas de Vilória**, da Universidade Federal de Viçosa, e ao **Dr. José do Carmo** pelo auxílio nas avaliações histológicas.

Ao professor **Paulo Secon** pela realização e auxílio na interpretação dos dados estatísticos.

A todos meus familiares pelo exemplo de vida, desprendimento e por todo carinho, em especial agradeço aos meus avós **Myrthes Maura Pacheco Batista**, **Cid Martins Batista**, *in memorian*, **Gertrudes Ferreira Fontes e Rubéns Fontes**, *in memorian*.

Às minhas duas amigas-irmãs, **Ma e Bruninha**, pela grande amizade, pelo carinho e pelos encontros que foram fundamentais para matar a saudade que sempre foi grande. A amizade supera qualquer barreira. Amo vocês!!!

À **Dona Odete, Seu Conrado, Lídia e Victor Augusto** pelo imenso carinho e amizade, meu porto seguro em Santa Maria. Em especial a Dona Odete, por entender a importância da pesquisa, disponibilizando seus cães para a realização desse trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ)** pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa.

À aquelas pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

HIDROXIAPATITA SINTÉTICA ASSOCIADA OU NÃO À FRAÇÃO TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES NA REGENERAÇÃO DE OSSO ALVEOLAR DE CÃES

Autora: ÉRICA BATISTA FONTES

Orientador: NEY LUIS PIPPI

Data e local da defesa: SANTA MARIA, 09 DE MARÇO DE 2009.

Vários fatores, dentre eles a doença periodontal, podem levar à reabsorção do osso alveolar. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a fração total de células mononucleares (FTCM) proveniente da medula óssea (MO) na regeneração alveolar da mandíbula de cães, quando associadas à hidroxiapatita sintética (HA). Para isso, foram utilizados 18 cães divididos em 2 grupos (GI e GII). No GI o defeito foi preenchido somente com o biomaterial. O GII foi tratado com HA associado à FTCM. Defeitos de 4,3 mm de diâmetro foram criados entre as raízes do quarto pré-molar direito no osso alveolar. Esses foram preenchidos com o implante correspondente a cada grupo. A MO foi coletada dos quatro membros do animal. O acesso para a coleta no membro pélvico foi o trocanter maior do fêmur, já o acesso no membro torácico consistiu no côndilo maior do úmero. Da MO coletada, foi extraída a camada mononuclear por meio de centrifugação em gradiente de Histopaque® 1.077. As células mononucleares foram transplantadas logo após separação. Com a finalidade de investigar e comparar a eficiência da regeneração óssea foi realizado avaliações clínicas diárias durante uma semana; avaliações radiográficas no pós-operatório imediato, aos 14, 45 e 60 dias; e exames histológicos aos 14, 45 e 60 dias. A cicatrização da ferida ocorreu de forma satisfatória e semelhante para ambos os grupos. O exame radiográfico revelou evolução semelhante para os dois grupos. No pós-operatório imediato, esse exame, permitiu avaliar o adequado preenchimento do defeito no GI e GII. Nos dois grupos, aos 14 dias, observou-se uma diminuição da radiopacidade, em relação ao pós-operatório imediato, seguida por um aumento na mesma aos 45 dias em relação aos 14 dias. Essa evolução é esperada em um processo de reparação ósseo onde é usado como a HA. A radiopacidade aos 60 dias foi superior daquela observada aos 45 dias, mas o defeito ainda era perceptível. Os exames histológicos indicaram um processo de formação óssea progressivo nos dois grupos. Aos 14 dias, havia presença de trabéculas ósseas no GII, não sendo observadas no GI nessa data. De fato, o GII apresentou um processo de regeneração óssea mais acelerada em relação ao GI até os 45 dias, sendo comprovado estatisticamente pela presença em maior quantidade de matriz óssea no GII aos 45 dias, ao nível de significância de 5%. Ainda era perceptível a presença da HA em algumas amostras aos 60 dias indicando que essa não foi completamente reabsorvida. Nenhuma reação do tipo corpo estranho foi observada, portanto, comprovando a biocompatibilidade do material. Coletivamente, os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a associação da FTCM provenientes da medula óssea de cães à HA favoreceu a regeneração óssea em defeitos realizados no osso alveolar da mandíbula de cães. Quando comparada ao uso somente da hidroxiapatita sintética, esse processo de regeneração ocorreu de forma mais rápida em defeitos preenchidos com o biomaterial associado à FTCM.

Palavras-chave: células mononucleares da medula óssea, hidroxiapatita, osso alveolar, cão

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

EFFECT OF BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS COMBINED WITH HYDROXIAPATITE ON THE REGENERATION OF ALVEOLAR BONE IN DOGS

Author: ÉRICA BATISTA FONTES

Adviser: NEY LUIS PIPPI

Date and local of defense: SANTA MARIA, March 9th, 2009

Several factors, including periodontal disease, can lead to alveolar bone reabsorption. The aim of this study was to investigate and compare the efficiency of mononuclear bone marrow cells (MN-BMC) associated with hydroxiapatite with hydroxiapatite alone, to promote bone regeneration. The dogs were separated in two groups (GI and GII) of nine animals. A defect of 4,3 mm diameter was surgically induced by a trephine bur between the dental roots of the fourth pre-molar tooth. In each dog the wound was treated with FMCB associated with HA (GII) or HA alone (GI). Bone marrow was extracted from all four members, the surgical access for this procedure consisted in the major trochanter of the femur and humerus condyle. In order to process the bone marrow a Histopaque® 1.077 gradient was used to separate the layer of mononuclear cells. A small sample of this layer was used for verification of total cell count and viability. The obtained mononuclear cells were then transplanted to the patients as soon as possible. Clinical evaluations for 7 days, radiologic examinations at 14, 45 and 60 days, and histological analyzes at 14, 45 and 60 days were made in order to investigate and compare the efficiency of the treatments in bone regeneration and/or reparation. The surgical procedure was adequate for the investigation purpose and the trephine bur permitted standardization of the bone defects. Adequate cell number and viability were obtained from the four bone marrow extractions followed by their processing. Scarring of the surgical wound was satisfactory and occurred similarly for the two groups. Both groups presented similar progress by radiological examination. Immediate post-surgical exams indicated that the bone defect had an adequate fulfillment. At 14 days, radiopacity had diminished when compared with immediate post-surgical finding; this was followed by an increase in radiopacity at 45 days, in both groups. Even though bone defect was still visible, radiopacity at 60 days was higher than that of 45 days. Histological evaluation indicated a progressive bone formation process in both groups. Immature bone was already visualized at 14 days in GII. In fact, histological and statistical analyzes provide reliable data that bone regeneration occurred in a less amount of time in GII at a probability of 5%. HA was still present at the 60 day group evaluation which indicates that this biomaterial had not been completely absorbed at this time. Additionally, foreign body reactions were not present proving that the bone grafts used was biocompatible. In summary, this study has shown that the use of MN-BMC in combination with HA resulted in improvement in bone reparation when compared with HA alone.

Key-words: mononuclear bone marrow cell, hydroxiapatite, alveolar bone, regeneration, dog

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Desenho ilustrativo demonstrando a característica das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006). 22
- FIGURA 2 - Acessos para introdução da agulha de Steis. No membro torácico o acesso foi crâniolateral na altura da articulação escápulo-umeral, correspondendo ao côndilo umeral (seta vermelha), enquanto que no membro pélvico o acesso foi lateral ao fêmur permitindo exposição à fossa trocântérica femural (seta amarela). 29
- FIGURA 3 - Aspiração da medula óssea com auxílio de uma seringa de 10 mL mediante aplicação de pressão negativa por tração do êmbolo(A); bolsa de colheita de medula (Kit Bone Marrow) (B). 30
- FIGURA 4 – Medula óssea sobre Histopaque® 1.077 em tubos falcon de 50 mL (A); medula óssea após centrifugação em gradiente de densidade com Histopaque® 1.077 e formação de 3 camadas, a seta indica a camada intermediária formada por células mononucleares (B); pellet formado após centrifugação da FTCM (C); eppendorf contendo a FTCM associada a soro autólogo (D). 31
- FIGURA 5 – Realização do “flap” mucoperiosteal. Incisão rostral ao quarto pré-molar se estendendo do sulco gengival até a crista labial inferior (A); incisão caudal ao quarto pré-molar se estendendo do sulco gengival até a crista labial inferior (B); incisão no sulco gengival (C); deslocamento apical do retalho muco periosteal (D). 33
- FIGURA 6 – Broca trefina (A); motor de baixa rotação (B); ; irrigação do local cirúrgico com solução salina 0,9% com auxílio de uma seringa de 10 mL durante a perfuração (C); defeito ósseo produzido com auxílio de uma broca trefina e um motor de baixa rotação (D)..... 34
- FIGURA 7 – Início do preenchimento do defeito ósseo com hidroxiapatita sintética (A); preenchimento do defeito ósseo com FTCM (B); defeito ósseo completamente preenchido com hidroxiapatita sintética (C); sutura do “flap” mucoperiosteal em padrão simples separado (D). 35
- FIGURA 8 – Animal do GI apresentando deiscência de sutura e extravasamento do biomaterial, indicado pela seta preta (A); animal do GII apresentando deiscência de sutura, local cirúrgico indica inflamação detectada pela presença de tecido hiperêmico e edemaciado, evidenciado pela seta amarela (B)..... 44

- FIGURA 9 – Exame radiográfico da mandíbula de cão submetido à cirurgia experimental para realização de defeito ósseo entre as raízes do quarto pré-molar direito. Imediatamente após a cirurgia no GI com hidroxiapatita somente, visualização da falha com radiopacidade grau 3 (A). GI aos 14 dias, presença de halo discreto com radiopacidade grau 0 ao redor de toda falha, centro da falha apresenta radiopacidade grau 1 (B). GI aos 45 dias, aumento da radiopacidade em relação aos 14 dias (C). GI aos 60 dias, região da falha com radiopacidade grau 1 (D). Imediatamente após a cirurgia no GII, hidroxiapatita associado a FTGM, visualização da falha com radiopacidade grau 2 (E). GII aos 14 dias, notar discreta reação periosteal ao redor da falha (F). GII aos 45 dias, presença de halo radiotransparente (grau 0) ao redor de toda falha e radiopacidade grau 2 no centro da falha (G). GII aos 60 dias, radiopacidade da falha grau 2 (H). Notar a evolução da radiopacidade do defeito ósseo (setas). Inicialmente ocorre uma diminuição da radiopacidade (com 14 dias) e posteriormente um aumento da densidade óssea (45 e 60 dias). 49
- FIGURA 10 – Exame radiográfico da mandíbula de cão submetido à cirurgia experimental para realização de defeito ósseo entre as raízes do quarto pré-molar direito, GI aos 14 dias, radiopacidade do defeito ósseo grau 0..... 50
- FIGURA 11 – Fotomicrografia da HAP-91 (HA) aos 45 dias após implante. A HA se apresentou sob forma de material amorfo, acelular, bem delimitada e sem afinidade pela hematoxilina & eosina, 40x. 53
- FIGURA 12 – Fotomicrografias do osso alveolar de um cão aos 45 dias pos-operatório. Formação de tecido fibrovascular (setas) ao redor da HA. Essa imagem retrata o processo de invasão celular sofrido pela HA, 40x. (A); Matriz osteóide recém sintetizada dentro da HA, 10x. Notar a presença de substância com coloração rosada na área correspondente a HA indicando síntese de osteóide. (B). HA: hidroxiapatita; TG: tecido de granulação; TO: trabécula óssea. O círculo indica presença de vasos sanguíneos..... 54
- FIGURA 13 - Fotomicrografias do osso alveolar de cão. Interface contínua (seta) entre o osso neoformado (ON) e o osso receptor (OR) de um cão do GI aos 45 dias, 40x (A); ausência de cápsula fibrosa na interface entre as células proliferativas (CP) e o osso receptor em um cão do GI aos 14 dias, 40x (B). 55
- FIGURA 14 – Fotomicrografia de osso trabecular (OT). Presença de osteoclasto (seta preta) com a formação de lacuna de Howship, característico de um processo de reabsorção óssea; osteoblastos (seta vermelha) em íntima associação à matriz osteóide. Notar a presença de osteócitos no matriz óssea (seta amarela), 40x (A); osteoclasto com grânulos da HA em seu interior, 40x (B). 56

FIGURA 15 – Fotomicrografias de osso alveolar de cão. Infiltrado fibroblástico (IF) em local com implante, GI, 14 dias, 10x (A); HA envolta por trabéculas ósseas (TO), GI, 45 dias, 10x (B); aposição de tecido ósseo neoformado (ON) em osso receptor (OR), presença de osso cortical trabecular (OCT) em grande quantidade, GI, 60 dias, 10x (C); presença de trabéculas ósseas, GII, 14 dias, 10x (D); presença de grande quantidade de tecido ósseo cortical lamelar (OCL) com resquício de um tecido fibroblástico (TF), GII, 45 dias, 10x (E); presença de tecido ósseo cortical lamelar (OCL), GII, 60 dias, 10x (F). 58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Escala para avaliação da neoformação óssea, presença do biomaterial, presença de tecido conjuntivo (fibroblástico), atividade osteoclástica (taxa de reabsorção) e neovascularização do enxerto.....	38
TABELA 2 - Classificação do edema no pós-operatório, avaliado durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GI) e nos animais do grupo tratado com hidroxiapatita associada à FTCM (GII).	43
TABELA 3 – Índice de viabilidade celular em porcentagem e quantificação celular em 1 ml e em 0,1 ml.	46
TABELA 4 – Equações ajustadas para as variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), em função dos dias (D) de avaliações para os respectivos grupos.	52
TABELA 5 – Valores médios das variáveis matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), para as respectivas combinações de grupo x dias.	52

LISTA DE APÊNDICE

APÊNDICE A – Escores obtidos pelas análises histológicas para as variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), e inflamação (INF).	69
APÊNDICE B - Resumo da análise de variância das variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC).	70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Osso	18
2.2 Doença periodontal	20
2.3 Células-tronco	21
2.4 Substitutos ósseos	24
2.4.1 Enxertos ósseos	24
2.4.2 Hidroxiapatita	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Modelo animal	27
3.2 Implantes	27
3.3 Extração e isolamento da fração total de células mononucleares (FTCM) provenientes da medula óssea (MO)	28
3.4 Procedimento cirúrgico	32
3.5 Cuidados pós-cirúrgicos e avaliações clínicas	36
3.6 Avaliação radiográfica	37
3.7 Preparação e análise histológica	37
3.8 Análises estatísticas	39
3.9 Doação dos animais	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40

4.1 Modelo animal	40
4.2 Aspectos clínicos e cirúrgicos	41
4.3 Coleta da medula óssea e aspectos laboratoriais	45
4.4 Resultados radiográficos	47
4.5 Exames histológicos	51
5 CONCLUSÕES	59
6 REFERÊNCIAS	60
7 APÊNDICE	68

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das principais afecções bucais que acometem os cães e gatos, atingindo cerca de 80 a 85% dos cães e gatos adultos. É um processo progressivo, destrutivo e não regenerativo caracterizado por inflamação. Como consequência dessa enfermidade ocorre danos às estruturas que protegem e sustentam o dente (periodonto), levando à reabsorção dessas, inclusive do osso alveolar (HARVEY; EMILY, 1993; EMILY et al., 1999). Além da doença periodontal, outros fatores como doenças metabólicas e traumas, podem levar à perda alveolar. As terapias periodontais têm como objetivo não apenas estacionar a progressão da doença pela interrupção da ação inflamatória, mas também possibilitar a restauração das estruturas perdidas, especialmente quanto à manutenção da arquitetura e estado funcional das mesmas (MATSUURA et al., 1995; GIANNOBILE et al., 1998).

Os animais portadores de doença periodontal, normalmente, são encaminhados ao médico veterinário quando o processo inflamatório encontra-se avançado. Nesses pacientes, há grande perda óssea tornando-se importante no tratamento o emprego de técnicas que promovam a regeneração óssea (EMILY et al., 1999).

O principal objetivo dos procedimentos cirúrgicos empregados para o tratamento de doenças periodontais é o uso de enxertos ósseos autólogos para estimular o crescimento ósseo e a fixação do implante. Entretanto, a quantidade de enxerto que pode ser coletada de um paciente é limitada e envolve morbidade do sítio doador. Outra alternativa seria o uso de aloenxertos provenientes de bancos; porém as complicações dessa fonte envolvem alto risco de doença do hospedeiro-versus-enxerto, transmissão de doença infecciosa e falha no enxerto. Existem ainda os xenoenxertos, apesar de não apresentarem grande aplicabilidade na medicina veterinária pela potencialidade em causar rejeição (PERMATTEI; FLO, 1999; DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Portanto, ainda não há um método ideal que promova a indução da formação de novo osso sem riscos ao paciente.

As células-tronco mesenquimais estão sendo largamente estudadas e representam uma alternativa em potencial, principalmente devido a sua capacidade de se diferenciar em vários tecidos. Sabe-se ainda que essas células são um importante componente da fração total de células mononucleares (FTCM). Assim sendo, torna-se relevante avaliar a regeneração óssea promovida

pela FTCM quando implantadas junto a substitutos ósseos, já que o emprego desse enxerto fornecerá células capazes de se diferenciarem em osteoblastos. Ao incorporar a matriz especificamente desenhada, ou seja, a hidroxiapatita sintética combina-se mais de uma estratégia, favorecendo o processo de regeneração óssea (DE KOK et al., 2003). Para a técnica proposta, não seria necessário a obtenção de autoenxertos ósseos e aloenxertos reduzindo a morbidade do processo e reduzindo os riscos representados pelo uso de aloenxertos. O uso da bioengenharia tecidual permitiria a produção de um enxerto ósseo ideal.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a regeneração óssea em defeitos alveolares mandibulares de cães quando tratados com FTCM, provenientes da medula óssea, associadas à hidroxiapatita sintética quando comparado à introdução deste biomaterial somente. O uso dessa FTCM baseou-se no fato de serem de fácil extração, e por conterem células-tronco mesenquimais que se diferenciam em múltiplas linhagens quando em condições específicas, inclusive em linhagens osteogênicas (BARRY; MURPHY, 2004; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006). Para isso, foi proposto especificamente:

- Analisar a eficiência de um método alternativo de punção para a coleta da medula óssea (MO);
- Analisar clínica, radiográfica e histologicamente a biocompatibilidade do compósito in vivo;
- Comparar por meio de análises clínicas, radiológicas e histológicas qual protocolo para implante proposto favorece regeneração óssea mais rápida e eficiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Osso

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por uma parte orgânica e uma parte inorgânica (HILL; ORTH, 1998). A fase inorgânica é composta por minerais que fazem parte da matriz óssea extracelular. O mineral predominante no osso é um análogo do mineral hidroxiapatita de ocorrência natural, aquele é representado pela fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Além de cálcio, fosfato e hidroxila, está presente também nessa fase, porém em menor quantidade, íons como sódio, flúor, citrato, magnésio e carbonatos (BOSKEY, 2006). A parte inorgânica do tecido ósseo consiste em uma fase amorfa e uma fase cristalina, a primeira sendo basicamente fosfato enquanto que a última é hidroxiapatita. A fase amorfa predomina em ossos novos e é parcialmente transformada em fase cristalina. Já a fase orgânica consiste primariamente de colágeno tipo I e de uma pequena quantidade de proteínas não-colagenosas, além dos componentes celulares (HILL; ORTH, 1998), que serão citados posteriormente.

A macroestrutura do tecido ósseo é composta por osso cortical, osso trabecular, medula óssea e vasos sanguíneos; enquanto que sua microestrutura engloba o osso primário ou entrelaçado, o osso secundário ou lamelar, e as células ósseas. O osso primário, constituinte do osso trabecular, apresenta, em sua composição, espaços grandes que contêm gordura, vasos sanguíneos e tecido conectivo, já o osso secundário, constituinte do osso cortical, é formado pelas lamelas Haversianas ou concêntricas que comportam os vasos sanguíneos. As células componentes do osso incluem os osteoblastos, osteócitos e os osteoclastos, sendo que cada uma dessas possui uma função importante na manutenção desse tecido (WOODARD, 2000; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Os osteoblastos possuem função osteogênica, ou seja, sintetizam os componentes orgânicos e inorgânicos da matriz óssea. À medida que ocorre a síntese da matriz óssea, os osteoblastos ficam enclausurados pela própria matriz neoformada, transformando em osteócitos. Os osteócitos, portanto, nada mais são do que osteoblastos maduros incorporados à matriz osteóide. Já os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, derivadas do sistema monocítico-macrofágico, e estão envolvidas com a remodelação e reabsorção óssea. Os

osteoclastos estão associados a pequenas cavidades de reabsorção denominadas lacunas de Howship (PERMATTEI; FLO, 1999; DENNY; BUTTERWORTH, 2006) e exercem importante papel na reparação óssea (WOODARD, 2000).

O osso é um órgão dinâmico que cresce e remodela ao longo da vida. O remodelamento ósseo é um processo complexo que envolve a reabsorção de tecido ósseo em uma superfície, seguido por uma fase de formação óssea. Sabe-se que esse processo sofre influência hormonal sistêmica e tem sido sugerido que ocorra também um controle local, exercido por fatores autócrinos ou parácrinos gerados no microambiente ósseo (HILL; ORTH, 1998). Os hormônios sistêmicos regulam a síntese, ativação e os efeitos desses fatores locais, que irão agir induzindo a replicação de células indiferenciadas, recrutando-as e influenciando no funcionamento de células diferenciadas (CANALIS, 1983). Os fatores locais, como os fatores de crescimento, citocinas e prostaglandinas, são sintetizados por células do esqueleto. Os fatores de crescimento são polipeptídeos que regulam a replicação e a função celular, são importantes no processo de regeneração óssea sendo representados pelas proteínas ósseas morfogênicas, pelos fatores de crescimento fibroblásticos, fatores de crescimento derivados de plaquetas, interleucinas, fator de necrose tumoral, fator estimulador de colônias, entre outros (HILL; ORTH, 1998).

A regeneração óssea é derivada de um conjunto de eventos com etapas bem definidas. Após uma lesão, ocorre a formação de um hematoma inicial, seguida de uma fase inflamatória. Nessa fase, ocorre dilatação vascular e exsudação de líquido e leucócitos. A formação de um coágulo organizado permite a neovascularização e formação de tecido de granulação. Na fase seguinte, denominada fase de reparação, células mesenquimatosas pluripotenciais provenientes do tecido mole, periósteo e da medula óssea formam um tecido composto por fibrocartilagem. A fibrocartilagem sofre mineralização, formando osso esponjoso e finalmente osso. A última fase consiste na fase de remodelagem em que o calo irá sofrer redução, à medida que o osso reticular recém formado é convertido em osso lamelar (PERMATTEI; FLO, 1999; WOODARD, 2000; HULSE; JOHNSON, 2002).

São comuns as doenças relacionadas a anormalidades quanto à remodelação óssea em humanos, como exemplos, osteoporose, artrite, osteólises induzidas por tumores e periodontite (WOODARD, 2000). Em medicina veterinária, essa última é sem dúvida a causa mais frequente de perdas dentais e consultas odontológicas em pequenos animais (EMILY et al., 1999).

2.2 – Doença periodontal

A doença periodontal é a doença mais comum que acomete cães e gatos (HARVEY; EMILY, 1993). Fatores como idade, peso, formato do crânio, dieta e hábitos de mastigação influenciam na prevalência. Doença periodontal, também denominada de periodontite, se caracteriza por um processo inflamatório envolvendo estruturas que circundam o dente, podendo ocorrer gengivite, degradação da membrana periodontal, reabsorção do osso alveolar e retração de tecidos gengivais (EMILY et al., 1999). Essa enfermidade é causada pelo acúmulo de placa bacteriana no dente e estruturas adjacentes, sendo um processo destrutivo, progressivo, não regenerativo e incurável se não houver medidas de controle para placa bacteriana (HARVEY; EMILY, 1993).

As terapias periodontais têm como objetivo não apenas estacionar a progressão da doença pela interrupção da ação inflamatória da placa bacteriana, mas também possibilitar a restauração das estruturas perdidas, especialmente quanto à manutenção da arquitetura e estado funcional das mesmas (EMILY et al., 1999; WIKESJO; SELVIG, 1999). Assim, os tratamentos tidos como reconstitutivos e regenerativos empregam um papel importante na periodontopatia, já que tem como finalidade a formação de novos tecidos.

Em periodontites graves, onde a perda óssea é intensa, o processo natural de reparo ósseo não é suficiente sendo necessária à intervenção do cirurgião, com o objetivo de favorecer o processo de reparação. Portanto, as seguintes estratégias podem ser utilizadas para promover a regeneração óssea: osteogênese (transferência de células), osteoindução (induzir células a se tornarem osso), osteocondução (fornecer um arcabouço para as células produtoras de osso) e osteopromoção (promover a regeneração óssea fornecendo um ambiente biológica e mecanicamente favorável à regeneração óssea); sendo que, o objetivo seria combinar o maior número de estratégias possíveis (DE KOK et al., 2003; KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

2.3 – Células-tronco

As células-tronco vêm sendo alvo de grandes pesquisas principalmente quanto à sua potencial capacidade de originar tecidos especializados, entre eles, o tecido ósseo. Estas células possuem três características que as diferem das outras células do organismo: são células indiferenciadas e não especializadas, com capacidade de se multiplicarem por longos períodos por divisão assimétrica e de se diferenciarem em células especializadas de um tecido particular (ZAGO, 2006).

As células-tronco podem ser classificadas quanto à sua origem em célula-tronco embrionária, célula-tronco germinativa ou célula-tronco adulta (ZAGO, 2006). Podem também ser classificadas quanto à sua capacidade de diferenciação em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes. As células totipotentes são capazes de se diferenciarem em todos os tecidos que formam o indivíduo, incluindo a placenta e seus anexos. Elas são encontradas nas primeiras fases de divisão celular, desde o oócito fertilizado até o embrião no estágio de mórula. As células pluripotentes, representadas pelas células-tronco embrionárias, são capazes de se diferenciarem em qualquer tecido das três camadas germinativas. As células-tronco adultas podem ser multipotentes ou unipotentes. Células multipotentes são aquelas que podem se diferenciar em um tecido que não seja aquele que a célula reside, podendo dar origem a tecidos de camadas germinativas diferentes. Já células-tronco unipotentes são células indiferenciadas que têm capacidade de se diferenciarem em somente um tipo celular específico (FRITSCH et al, 2007).

As células-tronco adultas estão presentes em pequenas quantidades no organismo, são populações raras e se localizam em nichos específicos (FORTIER, 2005; MEIRELLES et al., 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006). A interação dessas células com seu nicho é essencial para sua existência e funcionamento (FUCHS et al, 2004). Apesar de não haver um consenso quanto à nomenclatura dessas células, devido a divergências entre diferentes laboratórios quanto ao isolamento e caracterização dessas células (NARDI; MEIRELLES, 2006), para este trabalho usar-se-á o termo célula-tronco mesenquimal. Além da célula-tronco mesenquimal, existe a célula-tronco hematopoiética, a primeira célula-tronco a ser descrita, sendo ainda a mais bem compreendida e a mais amplamente aplicada em protocolos clínicos (FORTIER, 2005; NARDI; ALFONSO, 2006). Esta célula está presente na medula óssea e é responsável pela renovação dos componentes do sangue.

As células-tronco mesenquimais são células multipotentes capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tenócitos e mioblastos, entre outros tecidos (JOHNSTONE et al., 1998; PITTENGER et al., 1999; BARRY, et al, 2001; BARRY; MURPHY, 2004; CHO et al., 2005; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; MCTAGGART; ATKINSON, 2007; MYGIND et al., 2007). Sabe-se que a medula óssea possui uma pequena população de células-tronco mesenquimais que corresponde a cerca de 0,001 a 0,01% de todas as células nucleadas medulares. Estas células compõem a fração mononuclear da medula óssea (PITTENGER et al., 1999; FORTIER, 2005; COVAS, 2006). O uso dessas células baseia-se no fato de serem de fácil extração, fácil cultivo e podem ser induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens quando em condições específicas (JOHNSTONE et al., 1998; PITTENGER et al., 1999; BARRY, et al, 2001; BARRY; MURPHY, 2004; CHO et al., 2005; FORTIER, 2005; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; MYGIND et al., 2007). Como já foi dito, essas células possuem três características que as diferem das outras células do organismo: são células indiferenciadas e não especializadas, são capazes de se multiplicarem por longos períodos por divisão assimétrica e são capazes de se diferenciarem em células especializadas de um tecido particular. A divisão assimétrica consiste na capacidade da célula-tronco se dividir dando origem a uma célula indiferenciada, repondo o “pool” de células-tronco, ou alternativamente, pode se diferenciar em célula especializada (ZAGO, 2006) (Figura 1).

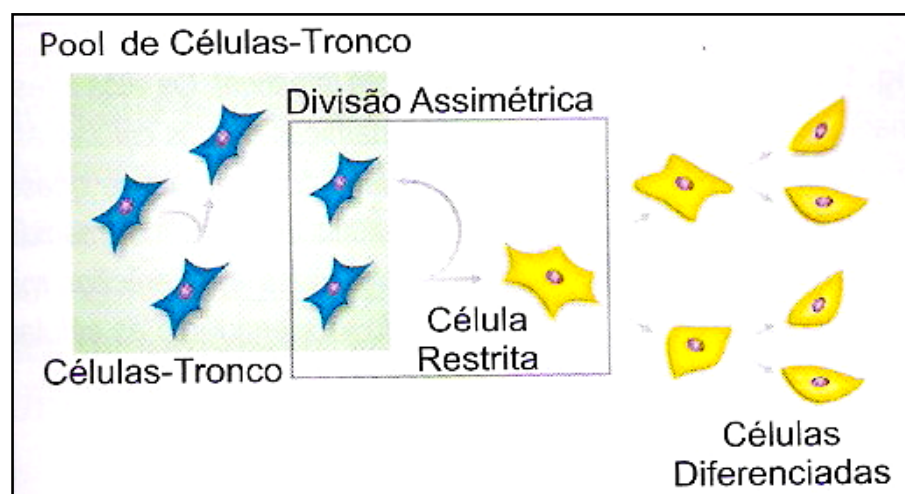


Figura 1 – Desenho ilustrativo demonstrando a característica das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006).

As células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido extensivamente estudadas em diversos tecidos, inclusive no osso. Nesse tecido, destaca-se sua capacidade osteoindutora e osteopromotora (OREFFO et al., 1999; PITTENGER et al., 1999; OTTO; RAO, 2004; BARRY; MURPHY, 2004; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006). Além disso, tem-se estudado e empregado atualmente os substitutos ósseos na regeneração e reconstrução óssea, pela sua capacidade osteocondutora (JENSON et al., 1996). Segundo De Kok et al. (2003), a associação de CTM com substitutos ósseos promove a formação óssea em defeitos mandibulares extensos.

2.4 – Substitutos ósseos

2.4.1 – Enxertos ósseos

Existem basicamente três tipos de enxertos ósseos empregados na rotina cirúrgica, a citar: enxerto esponjoso, enxerto cortical e enxerto corticoesponjoso. Esses ainda podem ser classificados em autoenxerto, aloenxerto e xenoenxerto, sendo que o último não possui ainda grande aplicabilidade na rotina veterinária. Os enxertos ósseos possuem vantagens próprias, sendo que o enxerto esponjoso fornece células e mediadores químicos capazes de promoverem osteocondução, enquanto o enxerto cortical fornece um arcabouço por onde haverá migração de células que promoverão a síntese do novo tecido ósseo (DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Os enxertos autólogos são aqueles provenientes do próprio animal e são largamente utilizados para tratamentos como fraturas com perdas de tecido ósseo, uniões retardadas ou não-uniões, tumores ósseos, entre outros (PERMATTEI; FLO, 1999; DENNY; BUTTERWORTH, 2006; BICALHO et al., 2008). A grande vantagem dessa prática é o risco isento de ocorrer reação de imunogenicidade. Apesar de ser a técnica padrão empregada quando da necessidade de realizar enxertias, a quantidade limitada de tecido ósseo disponível, o tempo envolvido na coleta do material aumentando o tempo cirúrgico e conseqüentemente anestésico e o fato de resultar em morbidade do sítio doador têm direcionado a busca de alternativas com os substitutos ósseos (NASR et al., 1999).

Aloenxerto refere-se à transferência de tecidos ou órgãos retirados de um animal e transplantado em outro da mesma espécie (DENNY; BUTTERWORTH, 2006). A grande vantagem dessa técnica é a possibilidade de criação de um banco de tecidos o que proporcionaria uma quantidade ilimitada de tecido doador. Assim como os autoenxertos, os aloenxertos são utilizados com sucesso na cirurgia ortopédica, porém apresentam como desvantagens a possibilidade de causar reação de imunogenicidade e a possibilidade de transmissão de doenças (NASR et al., 1999; DENNY; BUTTERWORTH, 2006).

Os xenoenxertos representam os enxertos compartilhados entre espécies diferentes, como exemplos, o osso bovino (OLIVEIRA et al., 2001; CONSOLARO et al., 2004; GOMES et al., 2007) e os corais marinhos das famílias *Portitidae* e *Goniopora* (NASR et al., 1999, PETITE et al., 2000; BICALHO et al., 2008). Técnicas atuais de processamento promovem a fabricação de

enxertos biocompatíveis e livres do risco de transmissão de possíveis doenças, porém essa possibilidade sempre existe (NASR et al., 1999).

Implantes aloplásticos são aqueles em que o material implantado é sintetizado no laboratório, entre eles estão os materiais metálicos, os polímeros, e as cerâmicas. As cerâmicas podem ser divididas naquelas denominadas inertes (ou quase inertes), entre as quais se destaca a alumina, a zircônia e o carbono, e as biocerâmicas. As mais utilizadas na regeneração óssea são o fosfato tricálcio, que é uma forma porosa do fosfato de cálcio, e a hidroxiapatita, essa última, têm como característica possuir constituição semelhante ao osso, ou seja, é formada basicamente por íons cálcio e fosfato, podendo variar dependendo do produto (NASR et al., 1999; PEREIRA et al., 2006; WILSON et al., 2007). Ressalva-se a possibilidade de formação de compósitos entre os variados tipos de implantes possibilitando que vantagens específicas de determinado biomaterial sejam somadas (PEREIRA et al., 2006).

2.4.2 – Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) tem despertado grande interesse biológico por ser o principal constituinte inorgânico dos ossos e dentes dos seres vertebrados. Baseado nisso, tem sido criadas formas sintéticas dessa substância com grande utilidade na regeneração de defeitos ósseos (WOODARD, 2000; BOIVIN & MEUNIER, 2003; DENNY; BUTTERWORTH, 2006; BOSKEY, 2006; BICALHO et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2008). As propriedades biológicas da hidroxiapatita como biomaterial têm sido extensivamente descritas nos últimos anos (REZENDE et al., 1998; NASR et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2000; BORGES et al., 2000; YOSHIKAWA; MYOUI, 2005; DUARTE et al., 2006; MYGIND et al., 2006; VITAL et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2008; PIERI et al., 2009; SA et al., 2009). Dentre as características da HA detalhadas destacam-se sua biocompatibilidade, segurança (não é tóxica, nem alergênica ou carcinogênica), biodegradabilidade e principalmente, sua capacidade osteocondutora.

Comercialmente estão disponíveis basicamente três formas de HA, em blocos densos, em blocos compostos por microporos e em grânulos. Essas possuem estrutura porosa diferenciando-se em relação ao tipo de poros, se são intermoleculares ou intramoleculares. A vantagem do produto denso formado por uma microestrutura com poros intermoleculares se refere à força tênsil superior, característica importante quando se aplica a ossos longos (LEGEROS, 2002;

PEREIRA et al., 2006). HA funciona como uma espécie de “arcabouço” (suporte passivo) por onde ocorre neoformação vascular, proliferação celular, crescimento fibrovascular, formação de osteóide e crescimento do osso mineralizado (BORGES, 1998; REZENDE et al., 1998; NASR et al., 1999; LEGEROS, 2002; WILSON et al., 2007; PEREIRA et al., 2006; BICALHO et al., 2008).

No presente trabalho, utilizou-se HAP-91[®], que constitui uma forma granular de HA, composta por microporos intermoleculares. Sua síntese consistiu na precipitação da HAP-91[®] a partir da reação de H_3PO_4 com $Ca(OH)_2$. O precipitado foi submetido a um processo de filtração seguida de secagem por passagem de ar. Posteriormente, o produto foi aquecido a 900°C por uma hora (BICALHO et al., 2008).

A hidroxiapatita sintética é um exemplo de um biomaterial sendo empregado em cirurgias mandíbulo-faciais (LIMA et al., 2003). Essa é biocompatível, não é carcinogênica e nem alergênica (GONZALEZ, 1993; OONISHI et al., 1997), sendo, portanto, um material seguro e clinicamente aceitável na obliteração de vários defeitos periodontais (BROWN et al., 1998). A FTSM é uma fonte de células-tronco mesenquimais com capacidade osteogênica. Ao utilizar a FTSM provenientes do próprio animal associada à hidroxiapatita sintética forma-se um enxerto ideal com características osteoindutoras e condutoras, além de possuir características autólogas, evitando assim a rejeição do implante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Modelo animal

Para os experimentos conduzidos nesse trabalho foram utilizados 18 cães hígdos, machos e fêmeas, adultos, sem raça definida, pesando entre 15 a 20 kg, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Maria. Estes passaram por uma fase de adaptação de 15 dias, prévio ao início do experimento onde foram devidamente vermifugados¹ e vacinados². Os cães foram mantidos em baias individuais durante todo experimento, onde receberam ração³ duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

O presente estudo seguiu as normas de experimentação segundo o Comitê de Ética e Bem Estar Animal para o uso de animais da Universidade Federal de Santa Maria e foi aprovado pelo parecer número 14/2008 (processo número 23081.003283/2008-50).

3.2 - Implantes

O compósito utilizado foi composto pela hidroxiapatita sintética (HAP-91^{®4}) no grupo controle (GI) e uma associação de hidroxiapatita sintética com FTCM no grupo tratado (GII). Utilizou-se a HAP-91[®], que constitui uma forma granular de HA, composta por microporos intermoleculares.

¹Canex Composto – Vetbrands Saúde Animal – Paulínia – SP

²Bio Max – Lema Biológico do Brasil Ltda. – Lagoa Santa – MG

³Pedigree – Waltham. Av. Caetano Schincariol, 900 – Mogi Mirim – SP

⁴HAP-91[®] - JHS – Laboratório Químico Ltda. – Sabará – MG

3.3 - Extração e isolamento da fração total de células mononucleares (FTCM) provenientes da medula óssea (MO)

Para a extração e isolamento da FTCM, os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar de 12 horas, pesagem, banho, e tricotomia dos membros pélvicos e torácicos. A tricotomia se estendeu desde a região da coluna lombar até a altura da articulação femoro-tíbio-patelar, enquanto que a dos membros torácicos se estendeu da região um pouco acima da articulação escapulo-umeral até a articulação úmero-radio-ulnar. Os cães foram então encaminhados ao centro cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram sedados com 0,1mg kg⁻¹ de acepromazina⁵ a 1% associado a 0,3µg kg⁻¹ de cloridrato de tramadol⁶ por via intramuscular. A indução anestésica foi realizada com propofol⁷ na dose 6mg kg⁻¹ por via intravenosa. Em seguida, os animais foram entubados com auxílio de uma sonda orotraqueal e foram mantidos em plano anestésico por anestesia inalatória com halotano⁸ vaporizado em oxigênio 100%. Logo após indução anestésica, foram colocados, num primeiro momento em decúbito lateral direito, e após todos os procedimentos para cirurgia asséptica procedeu-se à coleta da medula óssea. As amostras foram obtidas com auxílio de uma agulha do tipo Steis⁹ sendo que, para penetrar no espaço medular dos ossos, foi realizada uma pequena incisão; em seguida, introduziu-se a agulha mediante punção rotacional. O local da punção correspondeu à fossa trocantérica femoral no membro posterior por acesso lateral ao osso (Figura 2) e ao côndilo umeral no membro anterior por acesso craniolateral (Figura 2). Esse procedimento foi realizado também do lado esquerdo.

⁵ Acepran – Univet – São Paulo – SP

⁶ Tramal – União Química Farmacêutica Nacional S/A – Pouso Alegre – MG

⁷ Prpovan® - Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. – Itapira – SP

⁸ Halotano Cristália Produtos Farmacêuticos Ltda. – Itapira – SP

⁹ Agulha Sties – Tucumedy – Marthan Med Tec-popper-PBN-M.D. Tech – Porto Alegre - RS



Figura 2 – Acessos para introdução da agulha de Steis. No membro torácico o acesso foi crâniolateral na altura da articulação escápulo-umeral, correspondendo ao côndilo umeral (seta vermelha), enquanto que no membro pélvico o acesso foi lateral ao fêmur permitindo exposição à fossa trocantérica femoral (seta amarela).

O sangue da medula óssea foi extraído com auxílio de seringas de 10 mL previamente heparinizadas¹⁰ mediante aplicação de pressão negativa na mesma (Figura 3A). Foram extraídos aproximadamente 20 mL de cada local de colheita em um total de 80mL por animal. Esse material foi transferido para a bolsa de colheita de medula, Kit Bone Marrow (Figura 3B), contendo 0,1mL de heparina e 20 mL de solução salina 0,9%¹¹ para cada 80 mL de sangue de medula. Depois de realizada a colheita o local da incisão foi devidamente suturado utilizando fio de náilon cirúrgico¹² 3-0 em um padrão de sutura simples separado.

¹⁰ Lique mine – Roche – Rio de Janeiro – RJ

¹¹ Cloreto de sódio 0,9% - Texon – Viamão - RS

¹² Mononylon 3-0 – Ethicon Johnson & Johnson – São Paulo - SP

¹³ JP Indústria Farmacêutica S.A.

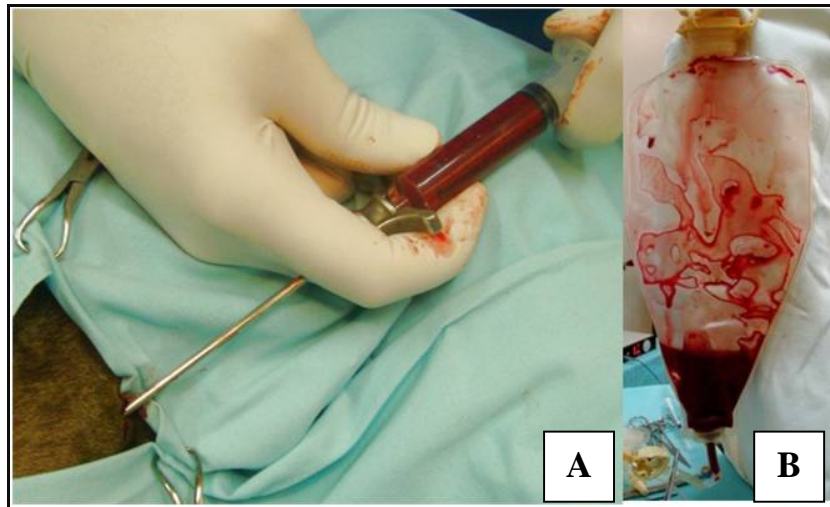


Figura 3 - Aspiração da medula óssea com auxílio de uma seringa de 10 mL mediante aplicação de pressão negativa por tração do êmbolo(A); bolsa de colheita de medula (Kit Bone Marrow) (B).

A MO foi submetido a uma filtragem que consistiu na passagem da medula colhida por um pré-filtro de 500 micras seguida de um filtro de 200 micras, o que permitiu a filtragem de espículas ósseas e coágulos oriundos do processo de colheita. A amostra colhida foi transferida para uma bolsa de infusão própria de MO acoplada no mesmo Kit e encaminhada, ainda estéril, imediatamente ao laboratório de terapia celular para a realização da obtenção do botão de fração total de células mononucleares (FTCM). Durante a transferência, uma alíquota de 1 mL de MO foi colhida da bolsa de infusão¹³, para a realização de mielograma. (osteomielograma).

A MO colhida foi centrifugada a 400 g por minuto em tubos Falcon de 50mL e isolada em gradiente de densidade Histopaque® 1.077¹⁴ (Figura 4A), de acordo com a técnica de Boyum (1968), o que gerou uma solução em 3 camadas (Figura 4B). Com o auxílio de uma pipeta automática, a camada intermediária, correspondente à FTCM foi removida e novamente centrifugada para obtenção de um botão celular (Figura 4C). Após a obtenção do botão de FTCM, realizaram-se duas lavagens com cloreto de sódio a 0,9% para a remoção do Histopaque® 1.077 e uma lavagem com soro autólogo. Uma pequena fração (70µL) de FTCM suspensa foi colhida com auxílio de uma pipeta automática e enviada ao laboratório de análises clínicas para contagem manual da porcentagem de células mononucleares e teste de viabilidade celular com azul de Trypan¹⁵ 1%, sendo considerada aceitável uma viabilidade acima de 70%. O

¹⁴ Histopaque – Sigma – São Paulo – SP

¹⁵ Trypan blue – Comercial Química Americana Ltda. – Paulínia - SP

restante do botão com FTCM foi transferido para um tubo eppendorf (Figura 4D) e enviado para o bloco cirúrgico para ser administrado na lesão.

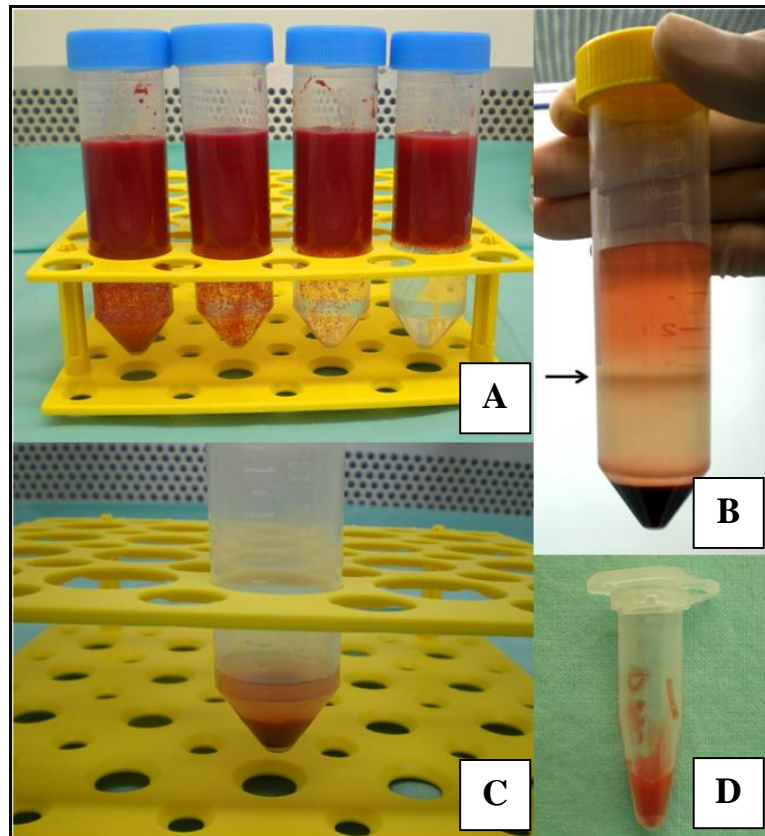


Figura 4 – Medula óssea sobre Histopaque® 1.077 em tubos falcon de 50 mL (A); medula óssea após centrifugação em gradiente de densidade com Histopaque® 1.077 e formação de 3 camadas, a seta indica a camada intermediária formada por células mononucleares (B); pellet formado após centrifugação da FTCM (C); eppendorf contendo a FTCM associada a soro autólogo (D).

Em todos os animais que receberam o enxerto composto por FTCM, durante o trans-operatório, foi extraído da jugular externa 10 mL de sangue para posterior separação do soro. Esse foi utilizado para lavagem final do botão de células mononucleares durante o processamento da MO para separação e isolamento da FTCM.

3.4 - Procedimento cirúrgico

A proposta inicial era de utilizar, para o presente trabalho, pacientes isentos de doença periodontal, porém como a origem dos animais utilizados era incerta, isso se tornou inviável. Dessa forma, os cães passaram por um rigoroso critério de seleção em que foram escolhidos animais que não apresentaram periodontites com uma evolução superior ao grau 2. Por isso, previamente à cirurgia, todos os animais foram submetidos a tratamento para remoção de cálculo dentário uma semana antes.

Após jejum hídrico e alimentar de 12 horas, pesagem e banho, os animais foram encaminhados ao centro cirúrgico do Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram sedados com 0,1mg kg⁻¹ de acepromazina a 1% associado a 0,3µg kg⁻¹ de cloridrato de tramadol por via intramuscular. A indução anestésica foi realizada com propofol na dose 6mg kg⁻¹ por via intravenosa, em seguida, os animais foram entubados com auxílio de uma sonda orotraqual e foram mantidos em plano anestésico por anestesia inalatória com halotano vaporizado em oxigênio 100%. Logo após a intubação, foi introduzido um chumaço de algodão na faringe do animal para prevenir aspiração de fluidos oriundos do procedimento cirúrgico, esses chumaços foram removidos logo após o término do procedimento.

O procedimento cirúrgico para a criação dos defeitos ósseos foi realizado em um mesmo momento em que a FTCM estava sendo isolada e extraída. Para tal, o animal foi posicionado em decúbito lateral esquerdo. A antissepsia da cavidade oral foi realizada com clorexidine¹⁸ a 2%, após prévia higienização com cloreto de sódio a 0,9%. Em seguida, um retalho mucoperiosteal na gengiva correspondente ao quarto pré-molar foi criado com auxílio de uma lâmina de bisturi número 15. Para isso, foi realizada uma incisão ventral ao quarto pré-molar se estendendo desde o sulco gengival até a junção do lábio inferior com o hemiarco mandibular (Figura 5A), da mesma forma foi realizada uma incisão dorsal ao mesmo dente (Figura 5B). Ato contínuo foi executada uma incisão no sulco gengival no sentido rostrocaudal ou caudorostral se estendendo ventralmente partindo das bordas rostral e caudal (Figura 5C). O “flap” criado foi deslocado apicalmente expondo a superfície vestibular do osso alveolar (Figura 5D).

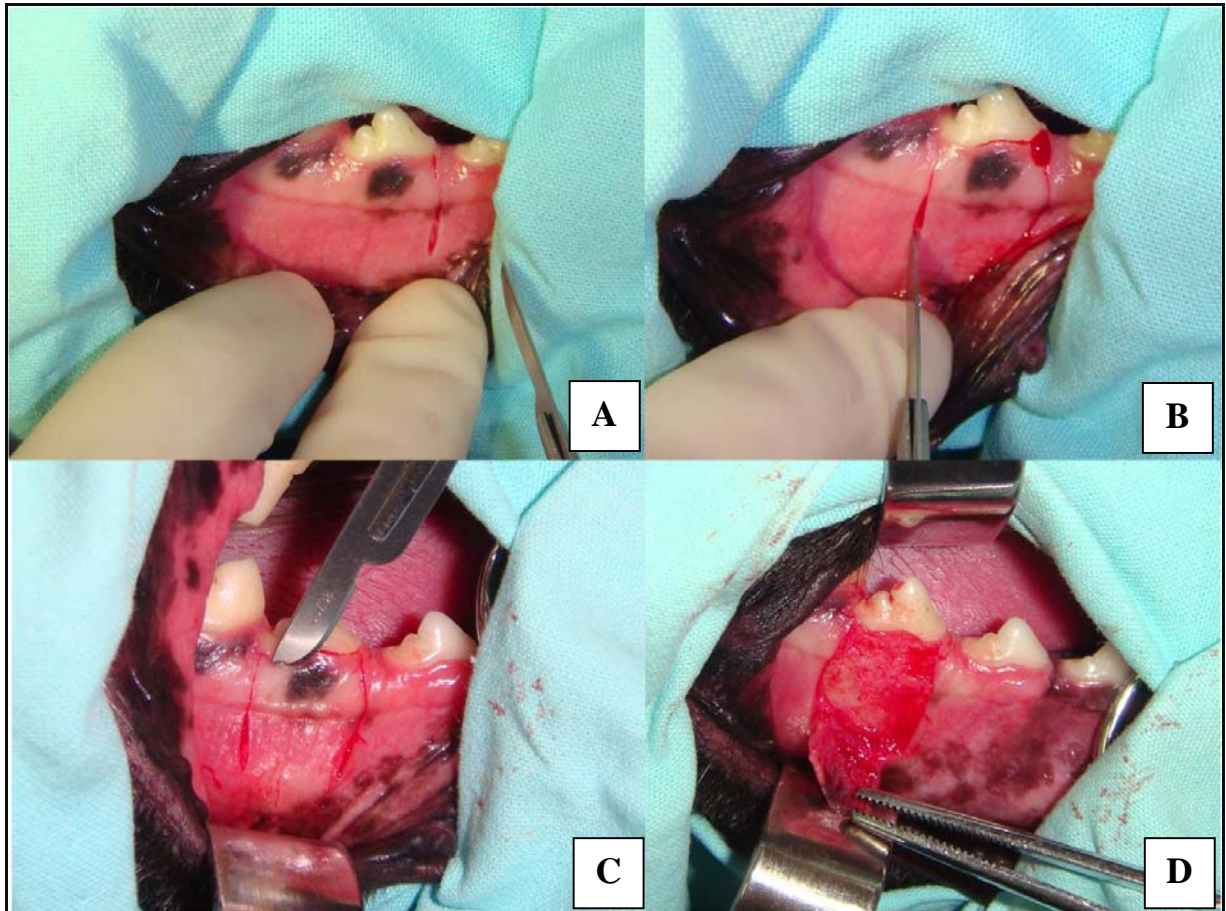


Figura 5 – Realização do “flap” mucoperiosteal. Incisão rostral ao quarto pré-molar se estendendo do sulco gengival até a crista labial inferior (A); incisão caudal ao quarto pré-molar se estendendo do sulco gengival até a crista labial inferior (B); incisão no sulco gengival (C); deslocamento apical do retalho muco periosteal (D).

Com auxílio de uma trefina de diâmetro 4,3¹⁹ mm (Figura 6A) acoplada a um motor de baixa rotação (Figura 6B) foi criado um defeito no osso alveolar entre as raízes do quarto pré-molar (Figura 6C). Para essa etapa tomou-se cuidado para não atingir as raízes do dente e o osso cortical localizado ventralmente na hemiarcada mandibular. O local exato correspondente a lesão óssea induzida só foi precisamente visualizado com o auxílio de exames radiográficos. Durante a perfuração do defeito, o local foi irrigado com solução fisiológica estéril para evitar aquecimento da região (Figura 6D).

¹⁹ Broca Trefina 4,3 – Neodent Implante Osteointegrável – JJGC Ind. Com. De Materiais Dentários Ltda. – Curitiba - PR

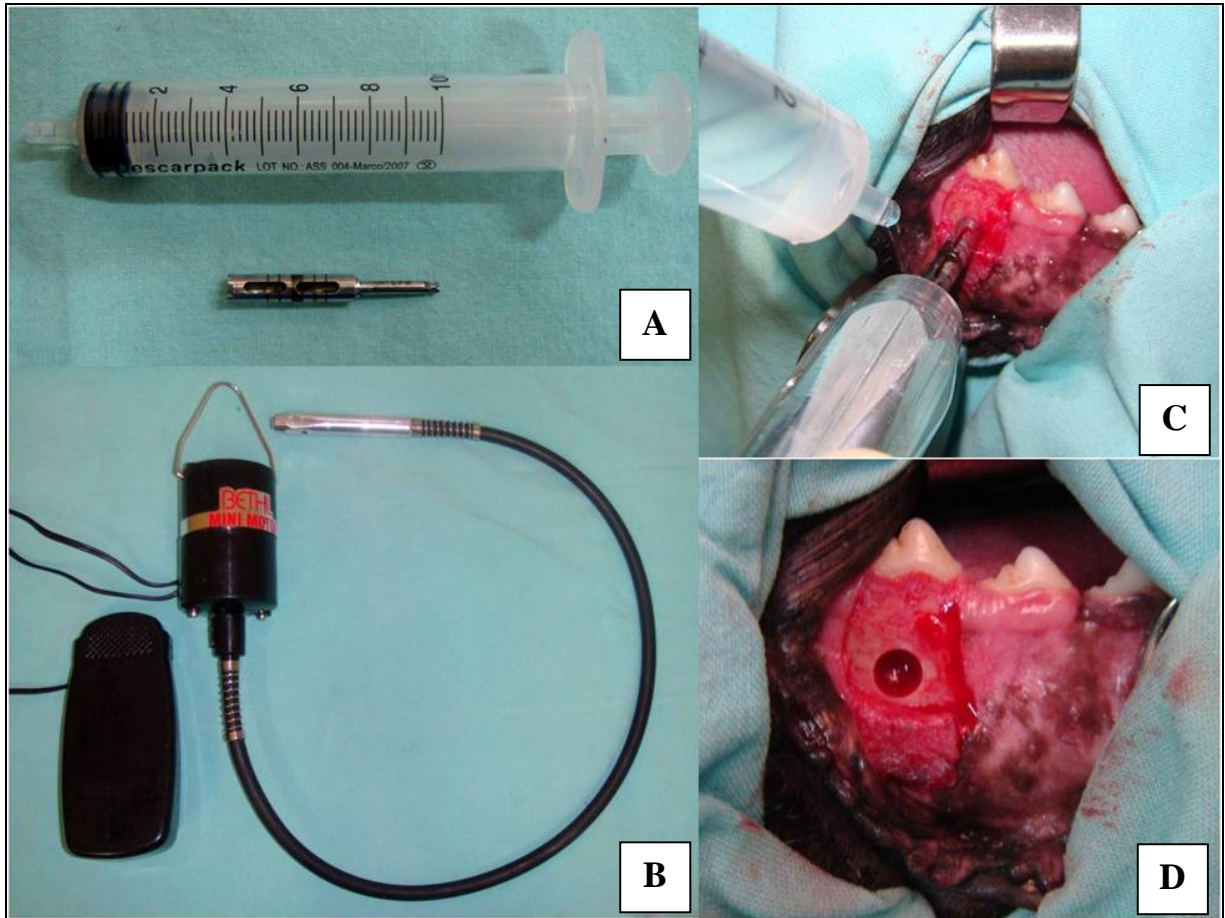


Figura 6 – Broca trefina (A); motor de baixa rotação (B); ; irrigação do local cirúrgico com solução salina 0,9% com auxílio de uma seringa de 10 mL durante a perfuração (C); defeito ósseo produzido com auxílio de uma broca trefina e um motor de baixa rotação (D).

Os 18 cães foram divididos aleatoriamente em dois grupos compostos de 9 cães cada. O Grupo I (GI) serviu como controle, portanto o defeito foi completamente preenchido somente com hidroxiapatita sintética (Figura 7A). Já no GII, o defeito foi completamente preenchido com hidroxiapatita sintética associada à FTCM. Esses compósitos foram colocados de maneira a preencher totalmente o defeito (Figura 7B), e para isso foram prensados levemente com um instrumento de ponta romba, com o objetivo de preencher todos os espaços. As células mononucleares foram injetadas entre camadas de hidroxiapatita sintética, de forma alternada, com o auxílio de uma seringa de insulina (Figura 7C). Finalmente, o “flap” mucoperiosteal foi reposicionado e suturado com pontos simples separados utilizando o fio absorvível de poliglactina 4-0²⁰ (Figura 7D).

²⁰ Vicryl® - 4-0 – Lab. Ethicon – São Paulo – SP

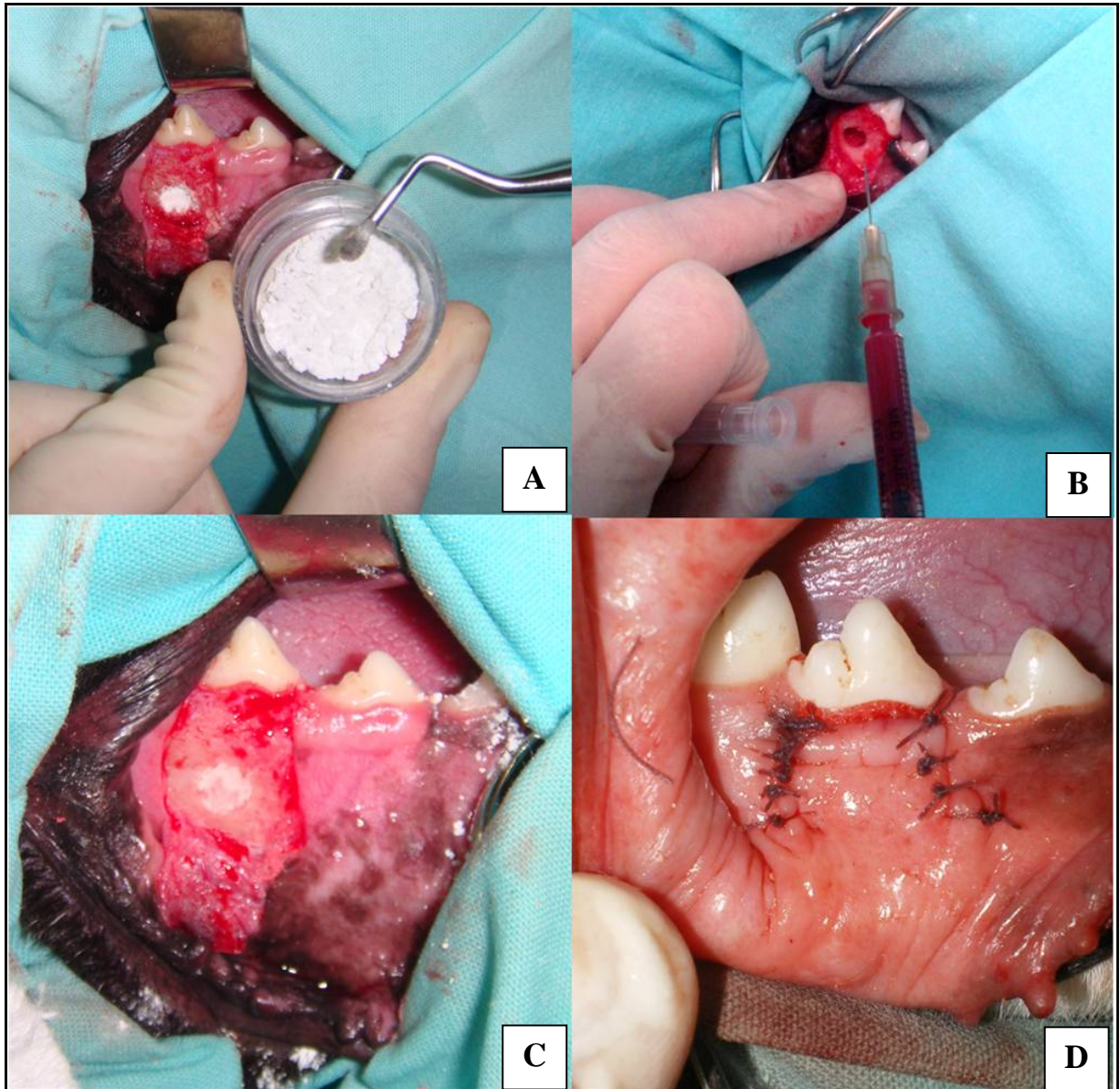


Figura 7 – Início do preenchimento do defeito ósseo com hidroxiapatita sintética (A); preenchimento do defeito ósseo com FTCM (B); defeito ósseo completamente preenchido com hidroxiapatita sintética (C); sutura do “flap” mucoperiosteal em padrão simples separado (D).

3.5 - Cuidados pós-cirúrgicos e avaliações clínicas

Todos os animais receberam cloridrato de tramadol, 2mg kg^{-1} , três vezes ao dia, por via intramuscular; e meloxicam²¹ $0,1\text{mg kg}^{-1}$, uma vez ao dia, por via subcutânea; durante três dias após o procedimento cirúrgico. Além disso, foram tratados com enrofloxacin (10mg kg^{-1}) e metronidazol (30mg kg^{-1}) por via oral, uma vez ao dia, também por três dias. Durante 14 dias, esses animais receberam ração comercial amolecida com água morna, duas vezes ao dia e água *ad libitum*.

O local operado foi higienizado com clorexidine 2% durante 7 dias. O exame clínico constou de avaliação diária da ferida durante os sete primeiros dias. A ferida cirúrgica foi avaliada para presença de reação inflamatória, sinais de deiscência e infecção da ferida cirúrgica. A avaliação da reação inflamatória foi baseada na presença de edema e dor. Todas as variáveis, exceto a secreção purulenta e a deiscência de suturas, foram graduadas em ausente, discreta, moderada e intensa, onde foram atribuídos os escores 0, 1, 2 e 3 respectivamente. A secreção purulenta e a deiscência de suturas foram classificadas em ausente e presente, para as quais foram atribuídos os escores 0 e 1, respectivamente.

O edema grau 0 (ausente) foi caracterizado pela ausência de aumento de volume visível. Foi classificado em grau 1 (discreto) quando houve apenas um ligeiro aumento de volume no local da incisão cirúrgica, o edema grau 2 (moderado) se apresentou como um aumento de volume compreendendo a região ventral do hemiarco mandibular, e foi atribuído grau 3 (intenso) ao edema, quando este se estendeu por toda gengiva do hemiarco mandibular direito.

A dor foi classificada levando em consideração o desconforto apresentado pelo animal ao toque digital e sua relutância em se alimentar. Dessa forma, foi classificada em dor grau 0 (ausente) quando o animal manifestou apetite imediatamente após completo retorno anestésico e não apresentou qualquer desconforto a leve compressão da ferida cirúrgica. A dor foi considerada grau 1 (discreta) se o animal apresentou desconforto ao toque digital no local operado, apetite normal e não houve relutância para se alimentar; grau 2 (moderada) se ocorreu resistência em permitir a manipulação para higienização; e grau 3 (intensa) se o animal apresentou relutância em se alimentar mesmo apresentando apetite normal. Com dor intensa, além dos sinais apresentados acima, os cães apresentaram-se prostrados.

²¹ Maxicam Injetável 2%® - Ouro Fino Agronegócio – Cravinhos – SP

Outro parâmetro avaliado, ao qual também se atribuiu escores variando de 0 a 3, foi a presença de sangramento. Esse, portanto, foi classificado em grau 0 (ausente) quando a ferida cirúrgica não apresentava qualquer vestígio de sangue durante as avaliações clínicas no pós-cirúrgico; grau 1 (discreta) caracterizada pela presença de pequena quantidade de sangue em gaze após a higienização da lesão; grau 2 (moderado) evidenciado pela presença de pequeno volume de sangue represado e depositado entre o lábio inferior e a gengiva. Enquanto que para o grau 3 (intenso) foi atribuído à intensa perda sanguínea com necessidade de transfusão.

3.6 - Avaliação radiográfica

Exames radiográficos da região operada foram realizados no pós-operatório imediato, aos 14, 45 e 60 dias visando avaliar o processo de regeneração óssea. Para isso um filme intra-oral²² foi posicionado na região lingual do quarto pré-molar direito utilizado a técnica do paralelismo com posicionamento oblíquo ventrolateral-dorsomedial. As radiografias foram analisadas quanto à radiopacidade em diferentes graus, no centro e na periferia do defeito, comparando a falha provocada com o osso vizinho. Também foram feitas comparações entre os dois grupos. A mensuração da radiopacidade foi feita atribuindo-se diferentes graus comparativos: grau 3, radiopacidade do defeito acima do osso vizinho; grau 2, radiopacidade do defeito semelhante ao osso vizinho; grau 1, radiopacidade do defeito abaixo do osso vizinho; e grau 0 na ausência de radiopacidade.

3.7 - Preparação e análise histológica

Três animais de cada grupo foram submetidos à avaliação histológica nas seguintes datas: 14, 45 e 60 dias. Esses foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico citado acima para realização de biopsia da região, em que foi utilizada a trefina de diâmetro de 4,3mm acoplada a um motor de baixa rotação. Para uma adequada avaliação microscópica dos parâmetros, matriz óssea, biomaterial, tecido conjuntivo, neovascularização, atividade osteoclástica e avaliação da interface enxerto-leito receptor, tomou-se o devido cuidado em incorporar nas amostras cerca de 50% de tecido ósseo receptor e 50% de tecido em regeneração.

²² Filme radiográfico Kodac DF 58.

As amostras foram fixadas em formol 10% tamponado por um tempo médio de 7 a 15 dias. Após esse período, as amostras foram descalcificadas em ácido fórmico a 10% tamponado com citrato de sódio para pH 4,5. Retiradas dessa solução depois de completada a descalcificação, as amostras foram lavadas em água corrente por pelo menos 24 horas. A seguir, foram diafanizadas em 2 banhos de xilol por 30 minutos cada e embebidas em parafina em estufa a 58 °C por 1 hora.

Os blocos foram seccionados longitudinalmente no centro do defeito. Foram obtidos cortes de 5 µm em secções não seqüenciais com aproximadamente 50µm de distância, para coloração com hematoxilina-eosina e análise à microscopia de luz.

Os resultados histológicos foram submetidos à análise estatística. Para essa análise foi realizada uma análise descritiva das variáveis presenças de matriz óssea, biomaterial, tecido conjuntivo, neovascularização e atividade osteoclástica, em que foi atribuído um escore específico conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Escala para avaliação da neoformação óssea, presença do biomaterial, presença de tecido conjuntivo (fibroblástico), atividade osteoclástica (taxa de reabsorção) e neovascularização do implante.

Escalas	Escore (pontos)
Ausente	0
Discreta	1
Moderada	2
Intensa	3

3.8 - Análises estatísticas

Os dados foram analisados por meio de análise de variância e de regressão. Para o fator qualitativo as médias foram comparadas utilizando-se o teste de TUKEY adotando-se o nível de 5% de probabilidade. Para o fator quantitativo (dias), os modelos foram escolhidos baseando na significância dos coeficientes de regressão utilizando-se o teste “t” e no coeficiente de determinação ($r^2 = \text{S.Q. Regressão} / \text{S.Q. Tratamento}$).

Independentemente da interação grupo x dias ser ou não significativa, optou-se pelo desdobramento da mesma devido ao interesse em estudo.

3.9 – Doação dos animais

Após o término deste experimento todos os animais foram doados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Modelo animal

O modelo experimental utilizado demonstrou ser satisfatório para a avaliação da regeneração do osso alveolar. Não houve necessidade de fixadores externos e implantes metálicos internos, o que permitiu que os resultados obtidos fossem atribuídos ao biomaterial associado ou não à FTCM.

A utilização de cães como modelo experimental baseou-se na existência de pesquisas prévias que fizeram uso desses animais para verificação do processo de cicatrização do osso alveolar e de ossos longos, permitindo a comparação de resultados encontrados (REZENDE et al., 1998; BORGES et al., 2000; MALARD et al., 2006; DUARTE et al., 2006; VITAL et al., 2006; GOMES et al., 2007; YUAN et al., 2007; PIERI et al., 2009; SA et al., 2009). Contribuiu ainda para essa decisão a possibilidade de verificação do uso de uma técnica de regeneração tecidual próximo a situações clínicas reais, diferente do que ocorre com o uso de modelos experimentais menores como coelhos, ratos ou camundongos (CANCEDDA et al., 2007). Além disso, os animais eram de fácil manuseio e manejo.

Optou-se por utilizar a região entre as raízes do quarto pré-molar como local para realização dos defeitos ósseos já que em um processo de periodontite, a perda óssea envolve principalmente a região de localização dos dentes pré-molares. Comumente ocorre perda do quarto pré-molar devido à intensa reabsorção óssea (EMILY et al., 1999). A escolha do local da lesão foi realizada baseando-se na localização anatômica das raízes do quarto pré-molar na hemiarcada mandibular tomando-se o cuidado em evitar o osso cortical localizado ventralmente. A ausência de um método mais apurado para a escolha do local permitiu uma pequena variação entre os animais. A localização exata do defeito só pôde ser determinada em uma etapa posterior com o auxílio dos exames radiográficos.

4.2 – Aspectos clínicos e cirúrgicos

O procedimento cirúrgico propriamente dito foi de fácil execução, conforme resultados anteriormente descritos por Fófano (2004) e Yamada et al. (2004). Em trabalho realizado por Fófano (2004), um dos problemas enfrentados foi a falta de padronização do defeito ósseo, já que foi usado para esse procedimento uma broca esférica número 8. Na tentativa de padronização do defeito entre os diferentes grupos, no presente estudo, foi utilizada uma trefina 4,3mm, a qual se mostrou eficiente, sendo, portanto de grande importância funcional. Resultados similares foram observados por Yamada et al. (2004) usando trefina 10mm. Entretanto, o uso da trefina 4,3mm possui uma desvantagem relativa ao tamanho do defeito criado, já que está aquém do defeito mandibular crítico para cães, que seria de no mínimo 10mm (WIKESJO; SELVIG, 1999). Apesar de o tamanho relativamente pequeno da falha permitir uma regeneração óssea do tipo espontânea, a proposta em avaliar a eficiência das células mononucleares provenientes da MO em promover formação óssea quando adicionada à hidroxiapatita sintética não foi invalidada, já que o parâmetro regeneração espontânea foi igualmente incorporado no controle hidroxiapatita como único método de implante. Assim também em mandíbulas de minisuino tem se conduzido estudos de regeneração por implante usando o modelo de tamanho de defeito de 3.5mm de diâmetro inferior ao tamanho crítico de 5mm para defeitos alveolares nesta espécie (PIERI et al., 2009).

A hemostasia foi realizada por compressão manual com auxílio de gaze cirúrgica mostrando-se eficiente, não sendo necessária a infiltração da área correspondente ao quarto pré-molar com lidocaína 2% associada a vasoconstritor, como recomendado por Fófano (2004).

A trefina 4,3mm não se mostrou adequada para realização das biopsias, já que em algumas amostras houve dano no tecido a ser submetido ao exame histológico, não permitindo a avaliação da interface biomaterial-tecido. Isso ocorreu principalmente nas biopsias de 14 dias quando provavelmente havia a presença de tecido fibrovascular em maior quantidade, caracterizado ao toque por consistência amolecida à compressão com instrumento rombo, o que tornou a amostra mais delicada e mais propensa a danos físicos. Aos 45 e 60 dias, a área do defeito a ser avaliada apresentava uma consistência rígida à compressão nos dois grupos, o que indica possível substituição de tecido fibroso frouxo por tecido conjuntivo denso especializado (mineralizado) (PIERMATTEI; FLO, 1999; BOSKEY, 2006). Essas amostras, por terem

consistência rígida não sofreram grandes danos, o que permitiu uma adequada análise histológica.

No presente estudo, optou-se por não realizar a transfusão sanguínea autóloga no trans-operatório, na qual o sangue teria que ser colido na fase pre-operatória para durante o procedimento ser transfundido. Essa prática é comum em pacientes humanos com o objetivo de prevenir a queda na concentração dos níveis de hemoglobina durante o ato da coleta da MO (PARKKALI et al., 2005). Em cães, tem sido constatado que não há queda significativa na taxa de hemoglobina apresentadas por animais submetidos ao procedimento de espoliação da MO (OLIVEIRA, 2008).

Não houve diferença perceptível entre os animais dos dois grupos quanto ao edema apresentado nos primeiros sete dias do pós-operatório, sendo que aproximadamente 66,7% dos animais do GI e 77,8% dos animais do GII apresentaram edema de grau 1 (Tabela 2), corroborando com os resultados de Fófano (2004). Esse tipo de edema pode ser atribuído ao trauma tecidual causado pela técnica cirúrgica, que por mais que proporcione uma cicatrização por primeira intenção, o trauma incisional e a manipulação tecidual levam ao desencadeamento das reações de inflamação, com a morte celular e liberação de citocinas. Essas por sua vez causam o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento de células e fluídos para o interstício refletindo em aumento de volume (HEDLUND, 2002; VASCONCELOS, 2006).

Tabela 2 - Classificação do edema no pós-operatório, avaliado durante exame clínico imediatamente após o procedimento cirúrgico (dia 0) até 7 dias nos animais do grupo controle (GI) e nos animais do grupo tratado com hidroxiapatita associada à FTCM (GII).

DIA	AUSENTE		DISCRETO		MODERADO		INTENSO	
	n° de cães		n° de cães		n° de cães		n° de cães	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
0	9	9	0	0	0	0	0	0
1	2	3	7	6	0	0	0	0
2	3	4	6	5	0	0	0	0
3	4	4	5	5	0	0	0	0
4	5	6	4	3	0	0	0	0
5	7	6	2	3	0	0	0	0
6	8	6	1	3	0	0	0	0
7	8	6	1	3	0	0	0	0

Outras variáveis clínicas avaliadas no pós-operatório foram hemorragia, dor, deiscência de sutura e secreção purulenta, sendo que 55,5% dos animais do GI e 11,11% dos animais do GII apresentaram sangramento de grau 1. Essa discrepância entre os dois grupos se deve provavelmente à ordem em que foram realizadas as cirurgias. Para uma maior eficiência quanto ao aproveitamento do fator tempo, e um melhor aproveitamento do material disponível, foram realizadas, em um primeiro momento, as cirurgias dos animais do GI. Apesar de alguns animais do GII também terem sido operados durante esse período, o maior número foi submetida ao procedimento cirúrgico em um tempo posterior. O melhor domínio da técnica por parte da cirurgiã, inclusive no que diz respeito à hemostasia adequada da região, preveniu com maior eficiência o sangramento no pós-operatório do GII. Cabe ressaltar que uma leve hemorragia observada não comprometeu os resultados da pesquisa em questão já que apesar de existir, fora ínfimo.

Nenhum animal apresentou dor durante o período de avaliação clínica o que pode ser evidenciado pela manifestação de apetite imediatamente após retorno anestésico e não houve relutância à compressão digital da área lesionada. Acredita-se que a utilização de anti-inflamatórios e opioides durante o pós-operatório auxiliou no controle do edema e da dor. De

fato, em procedimentos similares descritos anteriormente (FOFANO, 2004), porém sem uso de um opióide durante o pós-operatório, constatou-se dor em alguns animais.

Na presente investigação, três animais apresentaram deiscência de sutura, sendo que um animal era do GI (Figura 8A) e dois eram do GII (Figura 8B). Isso pode ser devido a características comportamentais inerentes aos animais. Aliado a isso, existe a possibilidade de ter ocorrido, no animal do GI, uma pobre compactação do biomaterial no defeito ósseo, o que permitiria extravasamento do material e conseqüentemente irritação do local. Já nos animais do GII, pode ter ocorrido falha de metodologia. Ressalta-se a necessidade de realizar uma adequada profilaxia da cavidade oral, já que é um local contaminado (HARVEY; EMILY, 1993; SEIM III, 2002). O próprio local em que foi realizado o procedimento cirúrgico justifica a ausência de secreção purulenta nos animais do GII, onde clinicamente e histologicamente comprovou-se a presença de um processo inflamatório maléfico, similar ao descrito por Vasconcelos (2006). Esse foi evidenciado clinicamente pela presença de uma área hiperêmica e tumefeita, associado a deiscência da sutura, no local da ferida cirúrgica e histologicamente pela presença intensa de polimorfonucleares indicando um processo agudo. A constante secreção de saliva associado à deglutição possibilita um enxágue constante dessa região, dificultando o acúmulo de secreção.

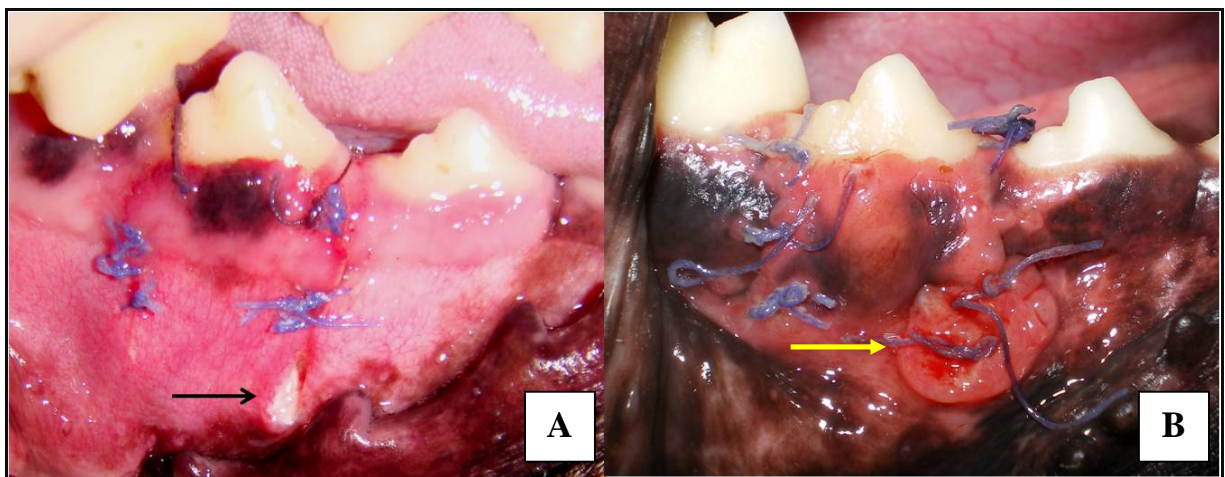


Figura 8 – Animal do GI apresentando deiscência de sutura e extravasamento do biomaterial, indicado pela seta preta (A); animal do GII apresentando deiscência de sutura, local cirúrgico indica inflamação detectada pela presença de tecido hiperêmico e edemaciado, evidenciado pela seta amarela (B).

4.3 – Colheita da medula óssea e aspectos laboratoriais

A colheita da medula óssea foi realizada dos quatro membros, de onde foi puncionada do fêmur e do úmero, conforme descrito por Lucarelli et al. (2004). A facilidade de realização deste procedimento possibilitou realizar a punção em quatro locais distintos, permitindo uma maior flexibilidade quanto ao número de acessos, diferindo de procedimentos realizados por Oliveira (2008), nos quais foi colhido 10 mL kg⁻¹ de MO somente de um fêmur do animal. A colheita em quatro sítios distintos se mostrou vantajoso já que refletiu na diminuição do tempo cirúrgico e conseqüentemente do tempo anestésico ao qual o animal foi submetido. Isso pode ser justificado pelo fato de ao realizar a punção seguida de aspiração do sangue presente na medula óssea, a velocidade de ejeção dos primeiros 10 a 15mL é superior ao da velocidade do volume conseqüente. Ao se realizar a coleta em sítios diferentes, se ganha tempo por estar captando o volume inicial. Além disso, sabe-se que o volume inicial, cerca de 2 a 4mL da medula colhida, contém as maiores concentrações de células-tronco mesenquimais, componente da FTCM. No volume subseqüente, há uma contaminação da amostra por sangue o que causa uma diluição das células desejadas (MUSCHLER et al., 1997). O processamento laboratorial, em que houve a extração da camada de células mononucleares, consistiu em uma purificação grosseira de células-tronco presentes na medula, uma vez que essas não são as únicas constituintes dessa camada (PITTENGER et al., 1999; BARRY, et al., 2001; BARRY & MURPHY, 2004; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006; MYGIND et al., 2007). Como o volume de MO coletado foi superior ao recomendado por Mushler (1997), foi possível promover a separação e extração da camada mononuclear. Esse procedimento aumentou a eficiência da utilização do implante quando comparado àquele realizado pela administração da MO sem processamento.

Todos os animais do GII tiveram sua celularidade medular aferida por meio de mielogramas, caso houvesse alguma anormalidade o animal seria descartado do experimento. Nenhum apresentou contagem fora dos padrões de referência. Além disso, durante o processamento das células para extração da camada mononuclear, essas foram quantificadas e foi verificada sua viabilidade. Apenas um cão (animal 1) apresentou viabilidade celular abaixo de 90% e apenas um cão (animal 8) apresentou contagem celular na magnitude de 10⁷. Os outros apresentaram uma contagem celular na magnitude de 10⁸, aferido em 1mL. O tamanho reduzido do defeito induzido experimentalmente permitiu utilizar 0,1mL do *pelet* obtido. Assim sendo, foi utilizado uma quantidade celular efetiva na magnitude de 10⁷ e 10⁶ no animal 8, superior àquela

recomendada para transplante em cães de $1,2$ a $3,4 \times 10^6$ células (GENGOZIAN, 2000; NAKAGE et al., 2005) (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de viabilidade celular em porcentagem e quantificação celular em 1mL e em 0,1mL.

Animal	Viabilidade celular (%)	CM^a totais/mL	CM^a totais/0,1mL
1	83	$4,5 \times 10^8$	$4,5 \times 10^7$
2	95	$3,8 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$
3	96	$5,1 \times 10^8$	$5,1 \times 10^7$
4	91*	$1,7 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
5	98	$4,3 \times 10^8$	$4,3 \times 10^7$
6	95	$2,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^7$
7	94	$4,9 \times 10^8$	$4,9 \times 10^7$
8	90	$9,1 \times 10^7$	$9,1 \times 10^6$
9	96*	$2,9 \times 10^8$	$2,9 \times 10^7$

a – CM (células mononucleares)

* presença de aglomerados de células consideradas inviáveis.

Uma característica comum a todas as amostras foi a presença de granulócitos, provavelmente devido à contaminação com sangue. Muschler et al. (1997) e Lucarelli et al. (2004) observaram que, após uma certa quantidade de MO aspirada, passa a ser coletado sangue, resultando em uma contaminação da camada mononuclear por células mononucleares de sangue, como os granulócitos.

4.4 – Resultados radiográficos

Os resultados radiográficos dos animais do GI obtidos imediatamente após a cirurgia revelaram radiopacidade grau 3 na região do defeito, uma vez que a falha óssea experimentalmente produzida foi completamente preenchida com hidroxiapatita sintética (Figura 9A), semelhante a resultados descritos na literatura (BORGES, 1998; YAMAMOTO et al., 2000; DUARTE et al., 2007; YOSHIKAWA et al., 2008). Já no GII, foi observado no mesmo período, radiopacidade semelhante ao osso alveolar circunvizinho, ou seja, grau 2 (Figura 9E), o que difere, portanto, do descrito pelos autores anteriormente citados. Essa diferença pode ser atribuída ao fato da hidroxiapatita estar associada a células mononucleares provenientes da medula óssea. A associação entre esses dois constituintes foi realizada por aplicação direta uma sobre a outra, o que favoreceu a solubilização das células na estrutura porosa do biomaterial inorgânico, tornando a mistura menos radiopaca quando comparada à hidroxiapatita sintética somente. Esta observação não influenciou os resultados obtidos já que a evolução radiográfica apresentada nos dois grupos foi similar. Os exames radiográficos do pós-cirúrgico imediato mostraram que a hidroxiapatita foi eficientemente implantada no osso (Figura 9A e 9E). De acordo com Yamamoto et al. (2000), esse exame é importante para comprovar que houve um adequado preenchimento da falha pela hidroxiapatita durante o trans-operatório.

Nas radiografias realizadas aos 14 dias, pôde-se notar nos dois grupos uma radiopacidade menor quando comparadas às radiografias correspondentes aos 45 dias e aos 60 dias (Figura 9). Esse fenômeno era esperado devido à neoformação provavelmente de tecido conjuntivo junto ao processo normal de reparação óssea (BORGES et al., 2000; VITAL et al., 2006; SA et al., 2009). Deve-se considerar ainda a não ocorrência de alteração na densidade da hidroxiapatita, uma vez que tem sido comprovado por microscopia eletrônica que seu número atômico não se altera durante o processo de regeneração óssea (REZENDE et al., 1998). Aos 14 dias, era perceptível uma área radiolúcida na periferia dos defeitos (radiopacidade grau 0), observando-se grau 1 de radiopacidade no centro dos mesmos tanto nos animais do GI quanto do GII (Figura 9B e 9F). Esse fato foi atribuído à provável reabsorção da hidroxiapatita na periferia do defeito, com deposição de tecido fibrovascular precedendo à formação e posterior mineralização óssea. Esses resultados são similares aos apresentados por Duarte et al. (2007) e Yoshikawa et al. (2008) e foram sustentados pelos resultados obtidos na análise histológica. De fato, aos 14 dias foi

constatada uma quantidade de tecido conjuntivo superior no GI quando comparado ao GII, ao nível de significância 5% (Tabela 3).

Aos 45 dias, pôde-se perceber um aumento da radiopacidade do defeito quando comparado ao exame realizado após 14 dias do procedimento cirúrgico. Essa evolução da radiopacidade persistiu durante o período de reparação, sendo condizente também com as radiografias realizadas aos 60 dias, que apresentaram radiopacidade superior aos exames realizados aos 45 dias (Figura 9C e 9G). Esse aumento na radiopacidade do defeito ósseo é uma consequência esperada em um processo no qual esteja ocorrendo regeneração óssea. De fato, tem sido observado que a substituição do tecido conjuntivo por tecido ósseo neoformado, seguida de mineralização do mesmo, implica em um aumento de radiopacidade (BORGES et al., 1998; VITAL et al., 2006; DUARTE et al., 2006; DENNY; BUTTERWORTH, 2007; SA, et al., 2009). Merece atenção o fato desse processo se iniciar na periferia e ocorrer dessa para o centro do defeito, podendo ser comprovado pela análise radiográfica das lesões aos 45 dias nos dois grupos, os quais revelem uma linha radiolucida por toda periferia do defeito, condizente com o tecido fibrovascular (Figura 9C). A menor espessura da linha radiolucida no GII, que se apresentou mais tênue quando comparada ao GI, (Figura 9G) indica que a regeneração óssea no GII ocorreu de forma mais rápida. Esse fato foi comprovado pelos resultados histológicos em que foi observada uma quantidade superior de matriz óssea no GII, ao nível de significância de 5%.

Aos 60 dias (Figura 9D e 9H), ainda pode-se perceber a falha óssea, porém com uma radiopacidade maior à apresentada aos 14 dias indicando que provavelmente está ocorrendo progresso na formação óssea. Além disso, existem indícios claros de um processo de regeneração mais avançado no GII, com o defeito apresentando radiopacidade grau 2, ou seja, semelhante ao osso alveolar circunvizinho; enquanto que no GI, o defeito apresentou radiopacidade grau 1 indicando, portanto um processo de reparação mais tardio. Assim como aos 45 dias, pôde-se observar uma linha radiolucida na periferia do defeito ósseo no GI (Figura 9D), já no GII essa área de radiolucência já não era mais visível aos 60 dias de avaliação (Figura 9H), o que representou mais um indício de que o processo de regeneração óssea no GII ocorreu de forma mais acelerada.

Os exames radiográficos não revelaram indícios de reação de imunogenicidade por parte do biomaterial e da FTCM utilizadas para preencher o defeito ósseo experimentalmente provocado no osso alveolar de cães, comprovando sua biocompatibilidade. Além disso, esses

exames permitiram avaliar a integridade de raiz óssea e do forame mentoniano, constando que não houve dano iatrogênico durante o procedimento cirúrgico, o que evidenciou a preservação desses em todos os animais.

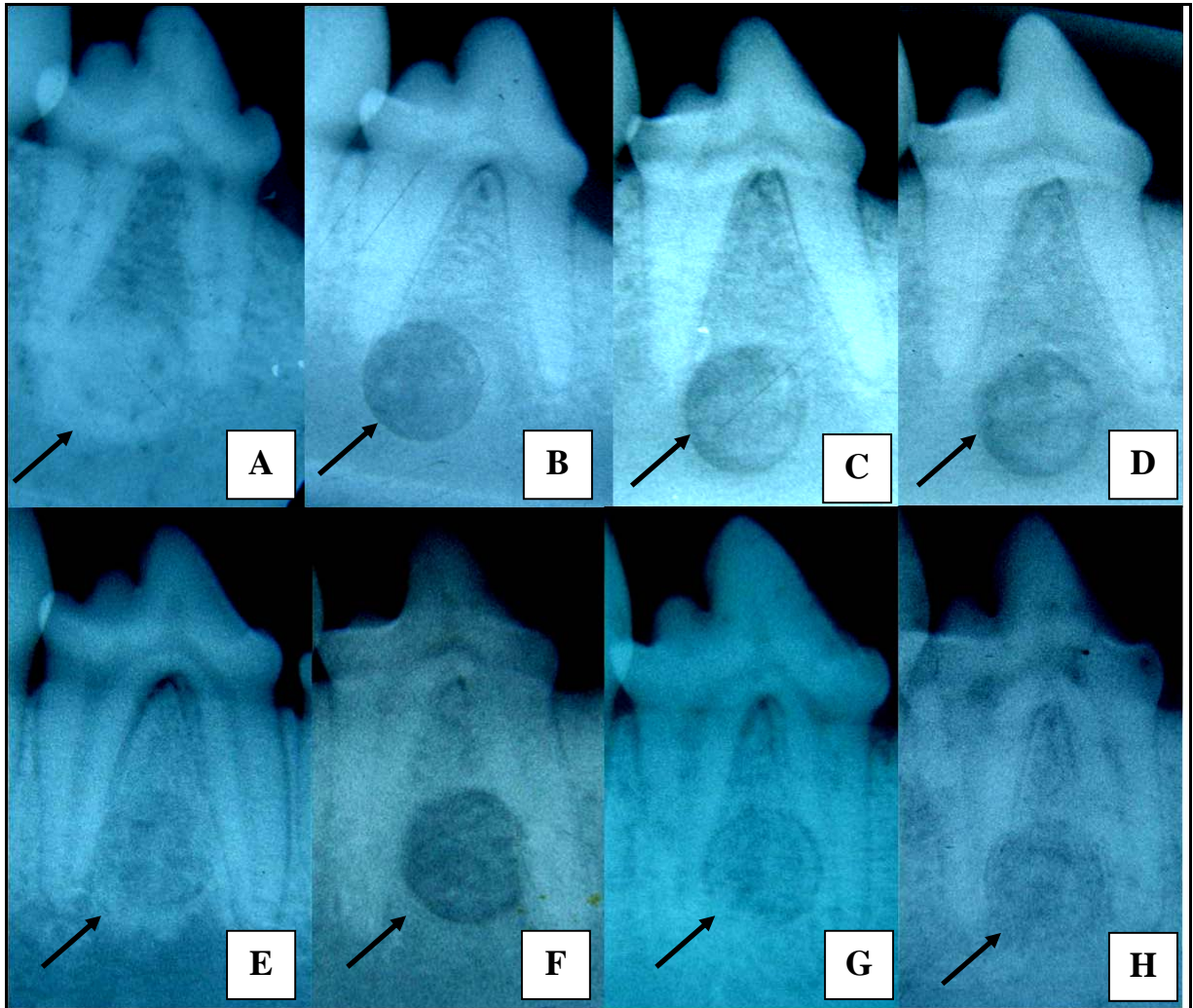


Figura 9 – Exame radiográfico da mandíbula de cão submetido à cirurgia experimental para realização de defeito ósseo entre as raízes do quarto pré-molar direito. Imediatamente após a cirurgia no GI com hidroxiapatita somente, visualização da falha com radiopacidade grau 3 (A). GI aos 14 dias, presença de halo discreto com radiopacidade grau 0 ao redor de toda falha, centro da falha apresenta radiopacidade grau 1 (B). GI aos 45 dias, aumento da radiopacidade em relação aos 14 dias (C). GI aos 60 dias, região da falha com radiopacidade grau 1 (D). Imediatamente após a cirurgia no GII, hidroxiapatita associado a FTCM, visualização da falha com radiopacidade grau 2 (E). GII aos 14 dias, notar discreta reação periosteal ao redor da falha (F). GII aos 45 dias, presença de halo radiotransparente (grau 0) ao redor de toda falha e radiopacidade grau 2 no centro da falha (G). GII aos 60 dias, radiopacidade da falha grau 2 (H). Notar a evolução da radiopacidade do defeito ósseo (setas). Inicialmente ocorre uma diminuição da radiopacidade (com 14 dias) e posteriormente um aumento da densidade óssea (45 e 60 dias).

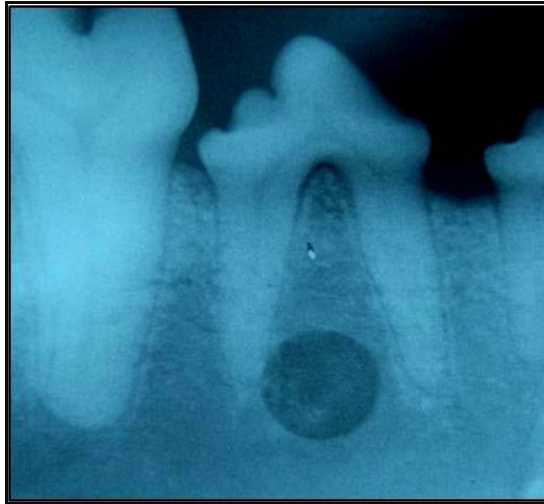


Figura 10 – Exame radiográfico da mandíbula de cão submetido à cirurgia experimental para realização de defeito ósseo entre as raízes do quarto pré-molar direito, GI aos 14 dias, radiopacidade do defeito ósseo grau 0.

4.5 – Exames histológicos

Os exames histológicos à microscopia de luz permitiram a identificação do defeito em todas as amostras. Esses exames permitiram avaliar variáveis como quantidade de matriz osteóide, atividade osteoblástica e osteoclástica, presença da HA, presença de tecido conjuntivo, neovascularização (Tabela 4 e 5), presença de tecido inflamatório e união entre o enxerto e o leito receptor. Dois animais apresentaram, ao exame histológico, um processo inflamatório do tipo supurativo neutrofílico, o que foi evidenciado pela grande quantidade de polimorfonucleares. Como o número de amostras para essa alteração foi pequena, optou-se por não submetê-las a análise estatística.

Houve evolução progressiva na neoformação óssea, identificada pelo aumento na quantidade de matriz osteóide, nos dois grupos (Tabela 4). A equação de regressão ajustada para a matriz óssea em função do tempo, nos animais do GII, mostrou que essa evolução ocorreu de forma mais rápida quando comparada aos animais do GI (Tabela 4). No tempo de 45 dias, os animais do GII apresentaram conteúdo de matriz óssea significativamente maior do que os animais do GI (Tabela 5). Uma possível interpretação para esses resultados seria que a FTGM acelerou o processo de reparação óssea quando incorporada a HA. De fato, pôde-se constatar que aos 60 dias não houve alteração significativa da presença de matriz óssea quando comparada aos 45 dias nos animais do GII, indicando que provavelmente estabeleceu-se o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea aos 45 dias. O osso é um órgão dinâmico que cresce e está sujeito a remodelamento ao longo da vida. Esse processo envolve a reabsorção de tecido ósseo em uma superfície, seguido por uma fase de formação óssea (HILL; ORTH, 1998; PIERMATTEI; FLO, 1999; WOODARD, 2000; HULSE; JOHNSON, 2002).

Tabela 4 – Equações ajustadas para as variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), em função dos dias (D) de avaliações para os respectivos grupos.

Variáveis	Grupos	Equações ajustadas	r ²
MOS	GI	$y = -0,65778 + 0,041792^{**}D$	0,9612
	GII	$y = -0,26943 + 0,054415^{**}D$	0,8977
HA	GI	$y = 2,68575 - 0,020088^{**}D$	0,8566
	GII	$y = 3,43055 - 0,038865^{**}D$	0,8977
TC	GI	$y = 3,30537 - 0,021704^{**}D$	0,9999
	GII	$y = 1,055 + 0,012618^{**}D$	0,1819
NV	GI	$y = 2,70573 - 0,009388^{**}D$	0,4365
	GII	$y = 2,79184 - 0,017161^{**}D$	0,6251
OC	GI	$y = 0,87482 + 0,017161^{**}D$	0,6251
	GII	$y = -0,0031 + 0,042095^{**}D$	0,6751

** 1% de probabilidade pelo teste “t”.

Tabela 5 – Valores médios das variáveis matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), para as respectivas combinações de grupo x dias.

Dias	MOS		HÁ		TC		NV		OC	
	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII	GI	GII
14	0,00a	0,33a	2,33a	3,00a	3,00a	1,00b	2,66a	2,66a	1,00a	0,33a
45	1,00b	2,66a	2,00a	1,33a	2,33a	2,33a	2,00a	1,66a	2,00a	2,66a
60	2,00a	2,66a	1,33a	1,33a	2,00a	1,33a	2,33a	2,00a	1,66a	2,00a

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra na linha para cada variável não difere entre si ao nível de significância de 5% de probabilidade pelo teste de TUKEY.

A HA analisada se apresentou sob forma de material amorfo, acelular, bem delimitada e sem afinidade pela hematoxilina & eosina (Figura 11). Resultados similares também foram relatados por Borges et al. (1998), Duarte et al. (2006) e Vital et al. (2006). Esse biomaterial é um composto mineral análogo ao osso que funciona como um suporte passivo para a neovascularização, e a migração e proliferação celular. Ele favorece uma sequência de eventos que se inicia com a angiogênese, seguida de migração e proliferação de células indiferenciadas precursoras de linhagens osteogênicas e condrogênicas. Esses processos são ativados pela ação de hormônios sistêmicos e fatores de crescimento locais que recrutam essas células do tecido mole, periósteo e da medula óssea para o local da lesão (WOODARD, 2000; HULSE; JOHNSON, 2002; FUCHS et al., 2004; NARDI; MEIRELLES, 2006).

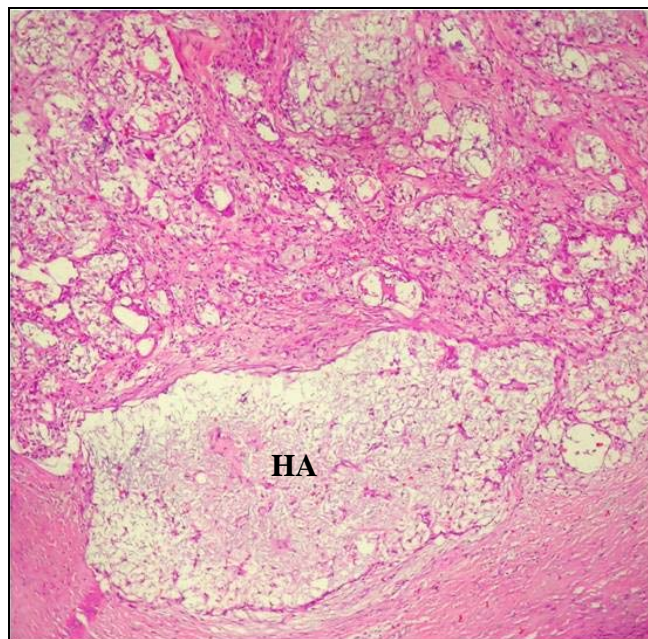


Figura 11 – Fotomicrografia da HAP-91 (HA) aos 45 dias após implante. A HA se apresentou sob forma de material amorfo, acelular, bem delimitada e sem afinidade pela hematoxilina & eosina, 40x.

Vários estudos (REZENDE et al., 1998; NASR et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2000; BORGES et al., 2000; YOSHIKAWA; MYOUI, 2005; DUARTE et al., 2006; MYGIND et al., 2006; VITAL et al., 2008; YOSHIKAWA et al., 2008; PIERI et al., 2009; SA et al., 2009) já comprovaram que a HA funciona como um suporte para o crescimento tecidual no interior de seus poros (Figura 12). Sugere-se ainda que a HA permita um tipo de fixação bioativa que consiste na deposição de tecido ósseo por aposição direta, através da formação de uma interface contínua com o tecido receptor (PEREIRA et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram que a HA utilizada possui essas duas características. Os exames histológicos revelaram que esse biomaterial, após ser rodeado por um tecido fibrovascular, sofreu invasão celular funcionando como suporte para proliferação dessas células, o que comprova sua capacidade osteocondutora (Figura 12A e 12B). Já sua capacidade bioativa pôde ser comprovada pela análise da interface enxerto-leito receptor, que se apresentou contínua sem formação de uma cápsula fibrosa (Figura 13A e 13B). Nas análises referentes aos 14 dias do GI, mesmo não havendo formação óssea, percebe-se uma alta atividade de células e ausência de uma cápsula fibrosa (Figura 13B).

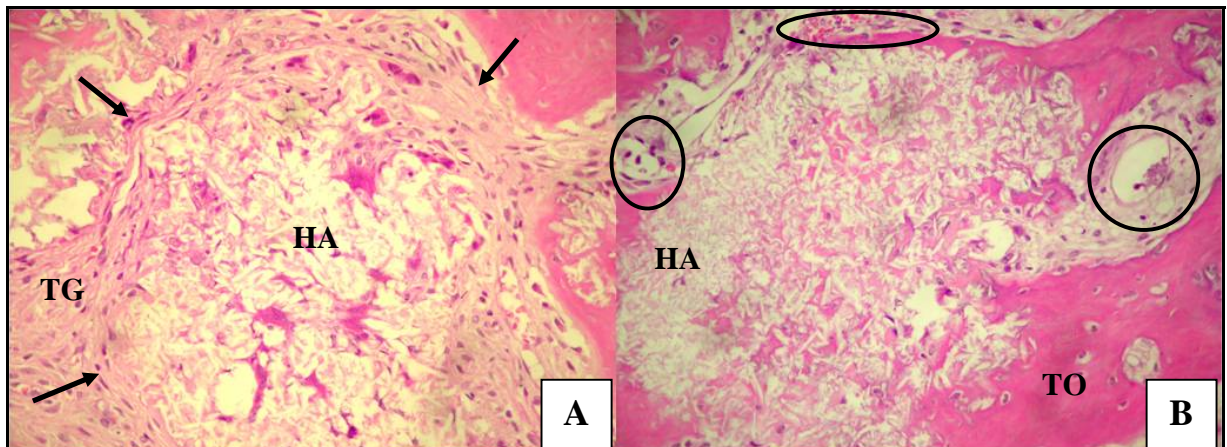


Figura 12 – Fotomicrografias do osso alveolar de um cão aos 45 dias pos-operatório. Formação de tecido fibrovascular (setas) ao redor da HA. Essa imagem retrata o processo de invasão celular sofrido pela HA, 40x. (A); Matriz osteóide recém sintetizada dentro da HA, 10x. Notar a presença de substância com coloração rosada na área correspondente a HA indicando síntese de osteóide. (B). HA: hidróxiapatita; TG: tecido de granulação; TO: trabécula óssea. O círculo indica presença de vasos sanguíneos.

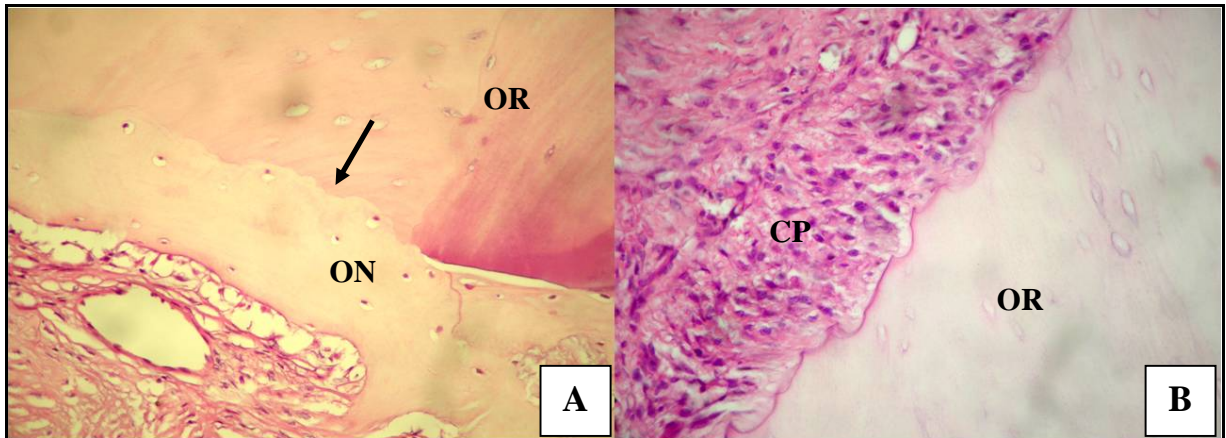


Figura 13 - Fotomicrografias do osso alveolar de cão. Interface contínua (seta) entre o osso neoformado (ON) e o osso receptor (OR) de um cão do GI aos 45 dias, 40x (A); ausência de cápsula fibrosa na interface entre as células proliferativas (CP) e o osso receptor em um cão do GI aos 14 dias, 40x (B).

Os exames histológicos também permitiram a visualização dos principais componentes celulares do tecido ósseo, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Figura 14A e 14B). Os osteoblastos são responsáveis pela síntese da matriz óssea que posteriormente sofre mineralização. À medida que essa matriz vai sendo secretada, os osteoblastos retidos nessa matriz passam a ser denominados osteócitos. Os osteoclastos atuam na reabsorção e no remodelamento ósseo (HILL; ORTH, 1998; WOODARD, 2000; DENNY; BUTTERWORTH, 2006). Apesar de não apresentar diferença estatística significativa, biologicamente, a atividade osteoclástica foi maior no grupo que recebeu as células mononucleares provenientes da medula óssea, isso ocorreu provavelmente devido à presença, em maior quantidade, de células precursoras da linhagem mielóide. Essas células se diferenciam em células gigantes multinucleadas e no tecido ósseo são denominadas osteoclastos (PETITE et al., 2000). Estudos realizados por Borges et al. (2000) comprovaram que a reabsorção celular de grânulos de HA ocorre concomitantemente à formação adjacente de osso novo. Além disso, uma maior atividade osteoclástica está relacionada a uma maior taxa de remodelamento ósseo. Acredita-se que precursores presentes no microambiente celular ativam os osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea, seguindo uma fase de formação óssea (HILL; ORTH, 1998).

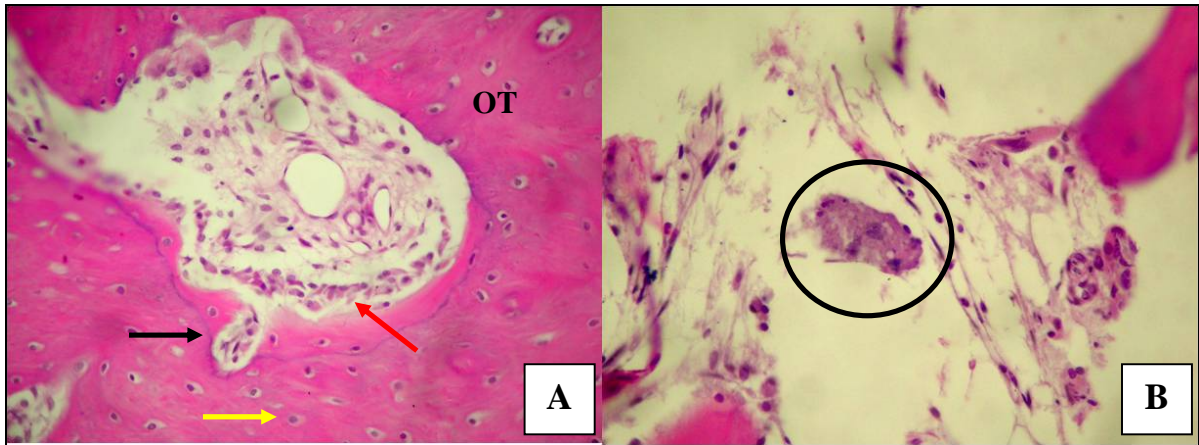


Figura 14 – Fotomicrografia de osso trabecular (OT). Presença de osteoclasto (seta preta) com a formação de lacuna de Howship, característico de um processo de reabsorção óssea; osteoblastos (seta vermelha) em íntima associação à matriz osteóide. Notar a presença de osteócitos no matriz óssea (seta amarela), 40x (A); osteoclasto com grânulos da HA em seu interior, 40x (B).

A aplicação da FTCM é vantajosa por fornecer diversas células que atuam no processo de regeneração tecidual, entre elas, células-tronco mesenquimais com capacidade osteoindutora de se diferenciarem em células osteogênicas (OREFFO et al., 1999; PITTENGER et al., 1999; OTTO; RAO, 2003; BARRY; MURPHY, 2004; JAVAZON et al., 2004; CHO et al., 2005; FORTIER, 2005; COVAS, 2006; NARDI; MEIRELLES, 2006). Os resultados obtidos no presente estudo forneceram fortes evidências para o efeito positivo dessas células na neoformação óssea em defeitos mandibulares de cães. Exames histológicos da evolução da formação de tecido ósseo entre os dois grupos indicaram que a aplicação da FTCM associada à HA acelerou a biogênese óssea nos defeitos provocados experimentalmente (Figura 15). Estes exames foram realizados aos 14, 45 e 60 dias e revelaram um processo mais avançado de neoformação óssea no grupo que recebeu o tratamento de HA associado à FTCM (Figura 15).

Aos 14 dias, no GI, nota-se um grande infiltrado fibroblástico (Figura 15A) comumente observado em processos de reparação óssea. Esse tecido sofrerá deposição de matriz osteóide para posteriormente ser mineralizado formando tecido ósseo maduro (Figura 15B e 15C). Pesquisas, conduzidas por Hill; Orth (1998) e Boivin; Meunir (2003) demonstraram que o processo de mineralização na matriz osteóide produzida pelos osteoblastos se inicia somente a partir de 10 a 15 dias de formada, justificando a ausência de tecido ósseo mineralizado no GI nesse período. Esse resultado difere dos obtidos por Borges (1998), nos quais já se observou presença de trabéculas ósseas aos 14 dias após o implante com a hidroxiapatita. Entretanto,

ressalta-se que a referida mineralização foi avaliada em defeito provocado na diáfase proximal da tíbia de cães, conseqüentemente, em local distinto ao avaliado na presente investigação.

A presença de trabéculas ósseas aos 14 dias no GII (Figura 15D) indica um processo mais avançado de neoformação óssea quando comparado ao GI. Isso provavelmente ocorreu devido à presença de células-tronco mesenquimais provenientes da FTTCM nesse grupo. Sabe-se que quando devidamente estimuladas, essas células têm capacidade de diferenciação em linhagens osteogênicas. O fato de ter introduzido essas células em um microambiente favorável para a formação de tecido ósseo, ou seja, em um ambiente que contém estímulos ideais para a osteogênese, salientam a hipótese de que essas células possivelmente se diferenciaram em células produtoras de matriz óssea (DE KOK et al., 2003; JAVAZON et al., 2004; YAMADA et al., 2004; COVAS, 2006).

As avaliações seguintes, aos 45 dias e aos 60 dias, revelaram uma evolução gradual na formação de tecido ósseo. Os resultados dos exames histológicos demonstraram que o processo de formação óssea nos animais do GII foi significativamente mais acelerado quando comparado ao GI, ao nível de significância 5% (Tabela 5). Aos 45 dias, o GII já apresentava intensa formação óssea (Figura 15E), enquanto no GI apresentava também deposição de matriz osteoide, porém em menor quantidade (Figura 15B). Esse resultado repetiu-se entre os dois grupos aos 60 dias (Figura 15C e 15F). Convém ressaltar que em todas as amostras analisadas o biomaterial estava presente indicando que a HA ainda não tinha sido totalmente reabsorvida aos 60 dias.

Finalmente, mais estudos são necessários para a total compreensão do funcionamento das células-tronco mesenquimais presentes na FTTCM, principalmente no que diz respeito aos estímulos que levam à sua diferenciação. Uma melhor compreensão dos fatores que influenciam e das condições necessárias para que ocorra a diferenciação dessas células em linhagens osteogênicas possibilitará um melhor emprego dessas na regeneração tecidual. Outras investigações são indispensáveis para melhor elucidação dos efeitos dessas células e de maneiras como elas podem ser manipuladas para o benefício em cirurgias.

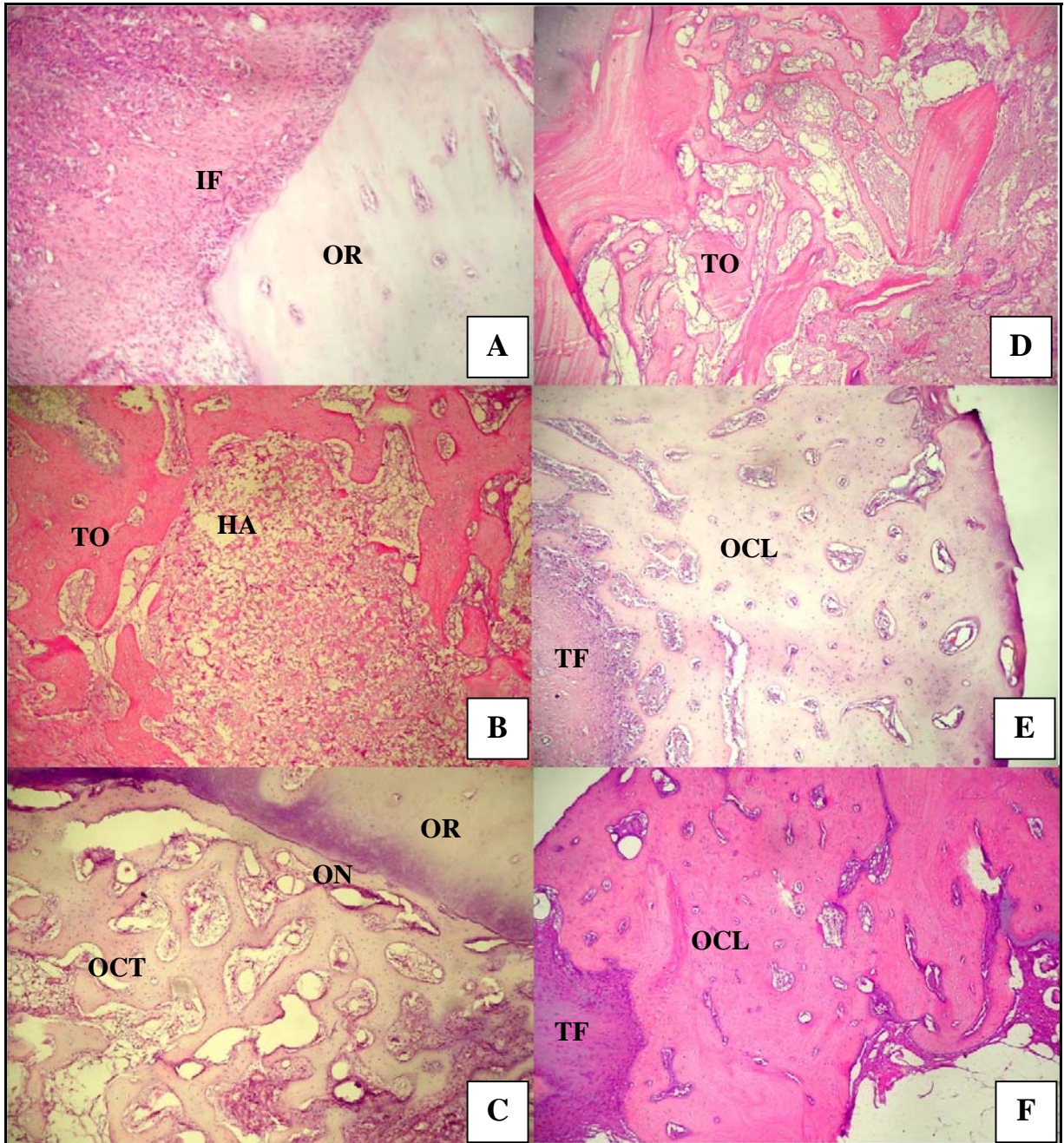


Figura 15 – Fotomicrografias de osso alveolar de cão. Infiltrado fibroblástico (IF) em local com implante, GI, 14 dias, 10x (A); HA envolta por trabéculas ósseas (TO), GI, 45 dias, 10x (B); aposição de tecido ósseo neoformado (ON) em osso receptor (OR), presença de osso cortical trabecular (OCT) em grande quantidade, GI, 60 dias, 10x (C); presença de trabéculas ósseas, GII, 14 dias, 10x (D); presença de grande quantidade de tecido ósseo cortical lamelar (OCL) com resquício de um tecido fibroblástico (TF), GII, 45 dias, 10x (E); presença de tecido ósseo cortical lamelar (OCL), GII, 60 dias, 10x (F).

5 CONCLUSÕES

A punção da medula óssea em quatro sítios distintos mostrou ser um procedimento de fácil e rápida execução. Resultados laboratoriais evidenciaram que a quantidade celular obtida é ideal para inoculação em cães.

Os resultados obtidos neste trabalho, baseados em análises clínicas, radiográficas e histológicas, mostraram que a associação da fração total de células mononucleares provenientes da medula óssea de cães à hidroxiapatita sintética (HAP-91) favoreceu a regeneração óssea em defeitos realizados no osso alveolar da mandíbula de cães. Quando comparada ao uso somente da hidroxiapatita sintética, esse processo de reparação ocorreu de forma mais rápida em defeitos preenchidos com o biomaterial associado à FTCLM.

6 REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.
- BARRY F. et al. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. **Experimental Cell Research**, New York, v. 268, n. 2, p. 189-200, Aug. 2001.
- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 36, n. 1, p. 568-584, Jan. 2004.
- BICALHO, S. M. C. M. et al. **HAP-91[®] e COL. HAP-91[®] Casuísticas e Estudos Científicos**. 3 ed. Sabará: Sabará, 2008. 253 p.
- BOIVIN, G.; MEUNIER, P. J. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. **Osteoporosis International**, Springer London, v. 14, n. 3, p. 19-24, Mar. 2003.
- BORGES, A. P. B. **O efeito da hidroxiapatita sintética na regeneração óssea de defeito provocado experimentalmente no terço proximal da tíbia de cães. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico por microscopia eletrônica de retrodisperção**. 112 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 1998.
- BORGES, A. P. B. et al. Hidroxiapatita sintética (HAP-91) como substituto ósseo em defeito experimental provocado no terço proximal da tíbia em cão: aspectos à microscopia eletrônica de transmissão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 52, n. 6, p. 616-620, set. 2000.
- BOSKEY, A. D. Tecidos conjuntivos do sistema musculoesquelético. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3 ed. Barueri, SP: Manole, 2006. v. 2, Cap. 125, p 1774-1784.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Oslo, v. 21, Suppl. 97, p. 77-89, Jun. 1968.

BROWN, G. D. et al. Hydroxyapatite cement implant for regeneration of periodontal osseous defects in humans. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.69, n.2, p.146-157, Feb. 1998.

CANALIS, E. The hormonal and local control of bone formation. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 4, n.1, p. 62-77, Winter, 1983.

CANCEDDA, R. et al. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, Surrey, Inglaterra, v. 28, n. 29, p. 4240-4250, Oct. 2007.

CHO, H. H. et al. Induction of osteogênica differentiation of human mesenchymal stem cells by histone deacetylase inhibitors. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 96, n. 3, p. 533-542, Oct. 2005.

CONSOLARO, A. et al. **Avaliação de implantes de osso bovino liofilizado “Osseobond®” e membrana reabsorvível de osso bovino liofilizado**. 2004. Capturado em 10 de fev. 2009. On-line. Disponível na internet [HTTP://www.odontologia.com.br](http://www.odontologia.com.br).

COVAS D. T. Células-tronco mesenquimais. In: ZAGO, M. A. (Ed.); _____. **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. Cap. 3, p. 35-48.

DE KOK, I. J. et al. Investigation of allogenic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 14, n.4, p. 481-489, Aug. 2003.

DENNY, R. D.; BUTTERWORTH, S. J. Cicatrização óssea. In:_____ **Cirurgia Ortopédica de Cães e Gatos**. São Paulo – Roca Ltda., 2006. Cap. 1, p. 2-13.

DUARTE, T. S. et al. Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 5, p. 849-853, set./out. 2006.

_____ Osteointegração da hidroxiapatita sintética no processo alveolar da mandíbula de cães: aspectos clínicos e radiográficos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 114-118, jan./fev. 2007.

EMILY, P. et al. Peridontia. Enfermidade Periodontal. In: ROMÁN, F. S. **Atlas de Odontologia de Pequenos Animais**. São Paulo – Manole, 1999. Cap 7, p. 111-126.

EMILY, P.; HOLEN, M. Periodontal therapy. In: BOJRAB, M. J.; THOLEN, M. **Small animal oral medicine and surgery**. Pennsylvania: Lea & Febiger. Cap. 6, p. 121- 157.

FÓFANO, G. **Matriz óssea bovina mineralizada na reparação alveolar da mandíbula decães e sua associação com membrana de colágeno. Estudo experimental**. 64 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

FONTES, A. M. et al. Células-tronco e seus métodos de estudo. In: ZAGO, M.A. (Ed.); COVAS, D. T. (Ed.). **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. Cap. 7, p. 93-106.

FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v. 34, n.5, p. 415-423, Sept./Oct. 2005.

FRITSCH, M et al. Células-tronco: aspectos gerais. In: PASQUALOTO, F. F. **Células-tronco: visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 10-82.

FUCHS, E. et al. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 6, p. 769-778, Mar. 2004.

GENGOZIAN, N. Identification and isolation of hemopoietic progenitors. In: FELDMAN, B. F. et al. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. Cap. 16, p. 91-96.

GIANNOBILE, W. V. et al. Recombinant human osteogenic protein-1 (OP-1) stimulates periodontal wound healing in class III furcation defects. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 69, n. 2, p. 129-137, Feb. 1998.

GOMES, K. et al. Osso bovino esponjoso inorgânico liofilizado em bloco no reparo de fístula oronasal induzida em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.1, p.159-164, fev. 2007.

GONZALEZ, R. Hidroxiapatita porosa HA-200. Principais características físico-químicas. **Química Nova**, Sao Paulo, v. 16, p. 509-511, 1993.

HARVEY, C. E.; EMILY, P. P. **Small animal dentistry**. t. Louis: Mosby, 1993. 413 p.

HEDLUND, C. S. Cirurgia do sistema tegumentar. In: FOSSUM, T. W., **Cirurgia de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Rocca, 2002, Cap. 13, p. 101-171.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British Journal of Orthodontics**, Oxford, v. 25, p. 101-107, May 1998.

HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM, T. W., **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Rocca, 2002, Cap. 28, p. 787-853.

JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, Amsterdam, v. 32, n. 5, p. 414-425, May 2004.

JENSEN, S. S. et al. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 1, p. 55-66, Jan./Feb. 1996.

JOHNSTONE, B. et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. **Experimental Cell Research**, New York, v. 238, n. 1, p. 265-272, Jan. 1998.

KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, Philadelphia, v.35, n. 2, p.232-242, Apr. 2006.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia v. 395, n. 2, p.81-98, Feb. 2002.

LIMA, T. B. F. et al. Reparo de defeito ósseo provocado na região da furca dental em cães (*Canis familiares*) com hidroxiapatita sintética. **Revista Científica de Medicina Veterinária: Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v.1, n.4, p.257-261, out./dez. 2003.

LUCARELLI, E. et al. Bone reconstruction of large defects using bone marrow derived autologous stem cells. **Transfusion and apheresis science**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 169-174, Feb. 2004.

MALARD, O. et al. Calcium phosphate scaffold and bone marrow for bone reconstruction in irradiated area: a dog study. **Bone**, New York, v. 36, n. 2, p. 323-330, Feb. 2005.

MATSUURA, M. et al. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components of normal and healing periodontal tissues in the beagle dog. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 66, n. 7, p. 579-593, Jul. 1995.

MEIRELLES, L. S.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, London, v.119, n. 1, p. 2204-2213, Jun. 2006.

MCTAGGART, S. J.; ATKINSON, K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. **Nephrology**, Carlton, v. 12, n. 1, p. 44-52, Feb. 2007.

MUSHLER, G. F.; BOEHM, C.; EASLEY, K. Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. **The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume.**, Boston, v. 79, n. 11, p. 1699-1709, Nov. 1997.

MYGIND, T. et al. Mesenchymal Stem Cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. **Biomaterials**, Surrey, v. 28, n. 6, p. 1036-1047, Feb. 2007.

NAKAGE, A. P. M. et al. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-973, jul./aug. 2005.

NARDI, N. B; ALFONSO, Z. C. Células-tronco hematopoéticas. In: ZAGO, M. A. (Ed.); COVAS, D. T. (Ed.). **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. Cap. 4, p. 49-65.

NARDI, N. B.; MEIRELLES, L. S. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. **HEP**, v. 174, p. 249-282, 2006.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Department of Health and Human Services. **Stem cells: progress and future research directions**. June 2001. Capturado em 01 mar. 2007. Online. Disponível na Internet: <http://stemcells.nih.gov>.

NASR, H. N.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; YUKNA, R. A. Bone and bone substitutes. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 19, n. 1, p. 74-86, Feb. 1999.

OLIVEIRA, M. G. et al. Avaliação microscópica do processo de reparo ósseo em tíbias de ratos, usando implantes de osso liofilizado bovino. **Odonto Ciência**, Porto Alegre, v.16, n.34, p.242-250, out. 2001.

OLIVEIRA, G. K. **Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão.** 50 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2008.

OONISHI, H. et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Philadelphia, v. 334, n. 1, p. 316-325, Jan. 1997.

OREFFO, R. O. et al. Human bone marrow osteoprogenitors express estrogen receptor-alpha and bone morphogenetic proteins 2 and 4 mRNA during osteoblastic differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v. 75, n. 3, p. 382-392, Dez. 1999.

OTTO, W. R.; RAO, J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. **Cell Proliferation**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 97-110, Feb. 2004.

PARKKALI, T. et al. Collection of autologous blood for bone marrow donation: how useful is it? **Bone marrow transplantation**, Basingstoke, v.35, p.1035-1039, Apr. 2005.

PEREIRA, M. M. et al. Materiais cerâmicos – ciência e aplicação como biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; NASUR, H. S. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações.** Rio de Janeiro: Cultura médica, 2006, Cap. 3, p. 61-81.

PETITE, H. et al. Tissue-engineered bone regeneration. **Nature Biotechnology**, New York, v. 18, n. 9, p. 959-963, Sept. 2000.

PIATTELLI, A. et al. Clinical and histological results in alveolar ridge enlargement using coralline calcium carbonate. **Biomaterials**, Surrey, v. 18, n. 8, p. 623-627, Apr. 1997.

PIERI, F. et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, Philadelphia v. 67, n. 2, p. 265-272, Feb. 2009.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. Fraturas: classificação, diagnóstico e tratamento. In: _____; **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais.** 3 ed. São Paulo: Manole, 1999. Cap. 2, p. 24-138.

PITTENGER, M. F. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, New York, v. 284 n. 5411, p. 143-147, Apr. 1999.

REZENDE, C. M. F. et al. Aspectos clínicos-cirúrgicos e radiográficos da hidroxiapatita sintética na diáfise proximal da tíbia de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 50, n. 5, p. 537-545, set./out. 1998.

SA, M. J. C. et al. In vivo behavior of zirconia hydroxyapatite (ZH) ceramic implants in dogs: a clinical, radiographic, and histological study. **Journal of Biomaterials Applications**. London, v. 22, n. 5, p. 5-31, Jul. 2007.

SEIM III, H. B., Infecções cirúrgicas e seleção antibiótica. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Rocca, 2002, Cap. 10, p. 65-72.

VASCONCELOS, A. C. Processo inflamatório relacionado com a presença de biomateriais. In: ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; NASUR, H. S. **Biomateriais Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 2006, Cap. 10, p. 269-281.

VITAL, C. C. et al. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 2, p. 175-183, mar./abr. 2006.

_____. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 55, n. 1, p. 9-14, jan./fev. 2008.

WIKESJO, U. M.; SELVIG, K. A. Periodontal wound healing and regeneration. **Periodontology** 2000, Copenhagen, v. 19, n. 1, p. 21-39, Feb. 1999.

WILSON, L. F. et al. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. **The Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society**, v. 7, n. 4, p. 475-490, Jul./Aug. 2007.

WOODARD, J. C. Sistema esquelético. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. **Patologia Veterinária**. São Paulo: Manole, 2000, Cap. 19, p. 913-961.

YAMADA, Y. et al. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. **Tissue Engineering**, New York, v. 10, n. 5/6, p. 955-967, May/Jun. 2004

YAMAMOTO, T. et al. Use of hydroxyapatite to fill cavities after excision of benign bone tumours. **Journal of Bone & Joint Surgery**. London, v. 82-B, n. 8, p. 1117-1120, Nov. 2000.

YOSHIKAWA, H.; MYOUI, A. Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics. **Journal of Artificial Organs: the Official Journal of the Japanese Society for Artificial Organs**, v. 8, n. 3, p. 131-136, 2005.

YOSHIKAWA, H. et al. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. **Journal of the Royal Society Interface**, 2008. Doi: 10.1098/rsif.2008.0425.focus. Published online. Disponível em: <http://journals.royalsociety.org>. Acesso em: 8 fev. 2009.

YUAN, J. et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. **Biomaterials**, Surrey, v. 28, n. 6, p. 1005-1013, Feb. 2007.

ZAGO, M. A. Células-tronco: origens e propriedades. In: _____(Ed.); COVAS, D. T. (Ed.). **Células-tronco a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. Cap. 1, p. 3-20.

7 APÊNDICE

Apêndice A – Escores obtidos pelas análises histológicas para as variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC), e inflamação (INF).

	14 dias						45 dias						60 dias					
	GI			GII			GI			GII			GI			GII		
Animal	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
MOS	0 ^a	0	0	1 ^b	0	0	2 ^c	0	1	3 ^d	2	3	1	3	2	2	3	3
HA	2	3	2	3	3	3	2	2	2	1	2	1	1	1	2	1	1	2
TC	3	3	3	3	0	0	2	2	3	2	2	3	3	1	2	2	1	1
NV	3	2	3	2	3	3	2	3	3	1	2	2	2	2	3	2	1	3
OC	1	1	1	1	0	0	3	2	1	3	3	2	0	2	3	3	0	3
INF	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a – ausente

b – discreto

c – moderado

d – intenso

Apêndice B - Resumo da análise de variância das variáveis, matriz óssea (MOS), hidroxiapatita (HA), tecido conjuntivo (TC), neovascularização (NV), osteoclasto (OC).

F.V	G.L	Quadrados médios				
		MOS	HA	TC	NV	OC
Grupos (G)	1	3,5555*	0,0000 ^{NS}	3,5555*	0,2222 ^{NS}	0,55555
Dias (D)	2	7,7222**	2,8888**	0,6666 ^{NS}	1,0555 ^{NS}	4,3888
G X D	2	0,7222 ^{NS}	0,6666 ^{NS}	1,5555 ^{NS}	0,5555 ^{NS}	0,7222
Resíduo	12	0,5000	0,2222	0,8333	0,5555	1,1666
CV (%)		48,95	24,95	45,644	33,54	67,04

** F significativo ao nível de 1% de probabilidade.

* F significativo ao nível de 5% de probabilidade.

NS F não significativo ao nível de 5% de probabilidade.