

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CORREÇÃO DE FENDA PALATINA COM REVESTIMENTO DE TELA DE
POLIPROPILENO ASSOCIADA A CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA EM SUÍNOS: ESTUDO *IN VITRO* E
IN VIVO

Priscilla Domingues Mörschbacher

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CORREÇÃO DE FENDA PALATINA COM REVESTIMENTO DE TELA DE
POLIPROPILENO ASSOCIADA A CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA EM SUÍNOS: ESTUDO *IN VITRO* E
IN VIVO

Autora: Priscilla Domingues
Mörschbacher

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor em
Ciências Veterinárias na área de
Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio
Contesini

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elizabeth
Obino Cirne-Lima

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Domingues Mörschbacher, Priscilla

Correção de fenda palatina com revestimento de tela de polipropileno associada a células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e selante de fibrina em suínos: estudo in vitro e in vivo / Priscilla Domingues Mörschbacher. -- 2016.

84 f.

Orientador: Emerson Antonio Contesini.

Coorientadora: Elizabeth Obino Cirne-Lima.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. fenda palatina. 2. tela de polipropileno. 3. células-tronco mesenquimais. 4. engenharia de tecidos. I. Contesini, Emerson Antonio, orient. II. ~~Obino Cirne-Lima, Elizabeth, coorient.~~ III. ~~Título.~~

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Priscilla Domingues Mörschbacher

CORREÇÃO DE FENDA PALATINA COM REVESTIMENTO DE TELA DE
POLIPROPILENO ASSOCIADA A CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE
TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA EM SUÍNOS: ESTUDO *IN VITRO* E
IN VIVO

APROVADO POR

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI

Orientador e Presidente da Banca

Prof. Dra. DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Membro da Banca (UFSM)

Dra. FERNANDA DOS SANTOS DE OLIVEIRA

Membro da Banca (HCPA)

Prof. Dr. MARCELO MELLER ALIEVI

Membro da Banca (UFRGS)

Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo dos animais. Nesse dia, um crime contra um animal será considerado um crime contra a própria humanidade.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

As fissuras palatinas são problemas frequentes na rotina hospitalar em humanos assim como nos animais. Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, entretanto, não possuem uma eficácia satisfatória em fendas que apresentam um grande defeito ósseo. Através do exposto acima, buscam-se novas alternativas para a reconstrução de fendas palatinas, sendo a engenharia de tecidos uma alternativa de tratamento para tal afecção. Este estudo possui a finalidade de avaliar a utilização da tela de polipropileno acrescida com MSC (células-tronco mesenquimais) e selante de fibrina em um modelo experimental de correção de fenda palatina em suínos, avaliando-se a cicatrização de tecido mucoso e ósseo do palato duro. Com isso, objetiva-se desenvolver uma nova técnica de reconstrução de fendas palatinas baseada na engenharia de tecidos. O estudo foi desenvolvido em duas etapas, uma *in vitro* e outra *in vivo*. O projeto *in vitro* avaliou duas técnicas de cultivo de MSC em diferentes placas de cultura, utilizando dois tipos de telas de polipropileno (macroporosa e microporosa) durante um período de quinze dias, para obter as melhores condições de interação entre a tela e as células. Em todas as formas de cultivo houve aderências das MSC, entretanto, o melhor protocolo foi na tela microporosa no período de sete dias de cultivo e em placas sem metacrilato. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 12 suínos, distribuídos em quatro grupos de igual número: grupo que utilizou somente tela de polipropileno (GT); tela de polipropileno associada à MSC e selante de fibrina (GTCF); tela de polipropileno e MSC (GTC); tela de polipropileno e selante de fibrina (GTF). Em todos os animais foi realizada a fenda palatina e colocação do enxerto conforme cada grupo. Os suínos foram avaliados quanto à presença de inflamação, cicatrização e deiscência de sutura no implante do palato. Após quinze dias os animais foram eutanasiados e os palatos avaliados por histologia pela coloração de HE e Picrosirius Red. A tela de polipropileno associada com MSC demonstrou ser melhor, entre os demais protocolos estudados neste trabalho, para correção de fenda palatina. Forneceu completa cicatrização óssea e da mucosa oral e nasal em um período de quinze dias, demonstrando ser uma nova técnica segura e eficaz, possuindo um potencial significativo para correção de fenda palatina.

Palavras-chave: fenda palatina, tela de polipropileno, células-tronco mesenquimais, engenharia de tecidos.

ABSTRACT

Cleft palates are common problems in the hospital routine in humans and animals. In recent decades, different surgical techniques were employed for the correction of palatal defects, however, do not have a satisfactory efficacy in cracks that have a large bone defect. Through the above, seek new alternatives for the reconstruction of cleft palates, and tissue engineering an alternative treatment for this condition. This study has the purpose of evaluating the use of enhanced polypropylene mesh with MSC (mesenchymal stem cell) and fibrin sealant in an experimental model of cleft palate repair in pigs, assessing the healing of mucosal tissue and bone of the hard palate. Thus, the objective is to develop a new technique for reconstruction of cleft palates based on tissue engineering. The study was conducted in two stages, one in vitro and another in vivo. The project in vitro evaluated two MSC cultivation techniques in different culture plates using two types of polypropylene meshes (macroporous and microporous) over a period of fifteen days, to get the best conditions for interaction between the screen and the cells. In all forms of cultivation were MSC adhesions; however the best protocol was the microporous screen in the seven days of culture plates and without methacrylate. For the in vivo study, we used 12 pigs, divided into four equal groups: group using only polypropylene mesh (GT); polypropylene mesh associated with MSC and fibrin sealant (GTCF); polypropylene mesh associated with MSC (GTC); polypropylene mesh and fibrin sealant (GTF). In all animals was performed cleft palate and graft placement as each group. The pigs were evaluated for the presence of inflammation, scarring and wound dehiscence in the palatal implant. After fifteen days the animals were euthanized and palates assessed by histology staining by HE and Sirius Red. The polypropylene mesh associated with MSC proved to be the best, among others protocols studied in this work, to cleft palate correction. Provided complete bone healing and oral and nasal mucosa in a period of fifteen days, proving to be a new safe and effective technique, having a significant potential for cleft palate correction.

Key words: cleft palate, polypropylene mesh, mesenchymal stem cell, tissue engineering.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

- FIGURA 1 -** Caracterização das ADSC obtidas a partir de tecido adiposo inguinal de camundongos C57Bl/6 GFP+. **(A)** Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 200X; **(B)** Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 100X; **(C)** Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 40X.....39
- FIGURA 2 -** Contagem em Câmara de Neubauer das ADSC aderidas nas telas microporosa **(A)** e macroporosa **(B)** durante o cultivo celular em placas de cultura convencional e com revestimento de metacrilato..40
- FIGURA 3 –** **(A)** Curva de crescimento realizada através da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT com quantidades conhecidas de ADSC; **(B)** Quantidade de ADSC aderidas nas telas microporosa e macroporosa durante os dias 3, 7, 11 e 15 de cultivo celular em placa de cultura convencional.....40
- FIGURA 4 -** Gráfico box plot do resultado do teste de MTT nas telas microporosa e macroporosa nos dias 3,7,11 e 15. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA com significância de 5% (n=3).....41
- FIGURA 5 -** Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno. **(A e B)** Aderência de ADSC (seta) em tela microporosa, em aumento de 40X. **(C)** Aderência de ADSC (seta) em tela macroporosa, em aumento de 40X.....41
- FIGURA 6 -** Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno, em aumento de 200X **(A)** Coloração de Panótico; **(B)** Coloração de HE; **(C)** Imuno-histoquímica com anticorpo anti CD29/integrina.....,42
- FIGURA 7 -** Microscopia de fluorescência das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI. **(A)** ADSC aderidas em tela macroporosa, em aumento de 100X; **(B e C)** ADSC aderidas em tela microporosa, em aumento de 100X.....42
- FIGURA 8 -** Microscopia confocal das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI e GFP+, em aumento de 200X.....42
- FIGURA 9 -** Microscopia de fluorescência das ADSC aderidas em tela de polipropileno, em aumento de 100X. **(A)** Marcação nuclear de DAPI; **(B)** Expressão celular GFP+; **(C)** Marcação com anticorpo primário anti-actina e secundário anti-IgG conjugado à R-fitoeritrin.....43

ARTIGO 2

- FIGURA 1 -** (A) Confeção de fenda palatina em suíno, remoção da mucosa oral, osso palatino e mucosa nasal. (B) Correção da fenda palatina com tela de polipropileno.....55
- FIGURA 2 -** Caracterização das ADSC obtidas de tecido adiposo de suíno. (A) Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 100X; (B) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 100X; (C) Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 100X.....57
- FIGURA 3 -** (A) Curva de crescimento realizada através da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT com quantidades conhecidas de ADSC. (B) Contagem na Câmara de Neubauer e pelo teste de MTT das ADSC aderidas na tela de polipropileno no sétimo dia de cultivo celular....58
- FIGURA 4 -** Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno. (A) Aderência de ADSC (seta) em tela de polipropileno, em aumento de 40X. (B) Coloração de Panótico, em aumento de 200X.....58
- FIGURA 5 -** Microscopia confocal das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI e GFP+, em aumento de 200X.....59
- FIGURA 6 -** Cicatrização macroscópica da fenda palatina em suínos nos diferentes grupos de tratamento no decorrer de 15 dias.....60
- FIGURA 7 -** Fotomicrografias de cortes histológicos da área de cicatrização de fenda palatina de suínos, coradas com HE (40X). (A) Palato normal, sem alterações (controle). (B) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GTC). (C) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GT), nota-se presença de tecido conjuntivo na área óssea.....61
- FIGURA 8 -** Fotomicrografias de cortes histológicos da área de cicatrização de fenda palatina de suínos, coradas pelo Picrosirius Red, sob luz polarizada (40X). (A) Palato normal, sem alterações (controle). (B) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GTC). (C) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GT), nota-se uma desorganização das fibras colágenas tipo I e III.....64

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

- TABELA 1 -** Análise de variância (ANOVA) da planimetria entre os grupos durante os dias 5, 10 e 15.....59
- TABELA 2 -** Análise de variância (ANOVA) da planimetria dentro do mesmo grupo durante os dias 0, 5, 10 e 15.....60
- TABELA 3 -** Teste de Kruskal-Wallis para a formação óssea nos diferentes grupos de tratamentos.....61
- TABELA 4 -** Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para a formação óssea (Simes-Hochberg).....61
- TABELA 5 -** Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para a formação óssea.....62
- TABELA 6 -** Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para presença de células inflamatórias (Simes-Hochberg).....62
- TABELA 7 -** Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para presença de células inflamatórias.....62
- TABELA 8 -** Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para presença de fibroblastos (Simes-Hochberg).....63
- TABELA 9 -** Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para presença de fibroblastos.....63
- TABELA 10 -** Análise de variância (ANOVA) da porcentagem da área com tonalidade vermelha alaranjada nos cortes histológicas corados com Picrosirius Red.....64
- TABELA 11 -** Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos da porcentagem da área com tonalidade vermelha alaranjada nos cortes histológicas corados com Picrosirius Red (Teste de Tukey).....64

LISTA DE ABREVIATURAS

ADSC	<i>Adipose derived stem cells</i>
BSA	Soro albumina bovina
BID	Duas vezes ao dia
°C	Graus Celsius
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FIPE	Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos
GFP	Green Fluorescent Protein
GT	grupo tela
GTC	grupo tela e ADSC
GTCF	grupo tela, ADSC e selante de fibrina
GTF	grupo tela e selante de fibrina
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
Ig	Imunoglobulina
IM	Intramuscular
IV	Intravenoso
kg	Quilograma
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mL	Mililitros
Mg	Miligrama
Mm	Milímetros
µL	Microlitros

µg	Micrograma
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
nm	Nanômetro
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Solução salina tamponada
PLGA	Poli- láctico-co-glicólico
PS	Penicilina-Streptomicina
RPM	Rotações por minuto
SC	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
TNF α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. Fendas palatinas	18
3.2. Reparo das fendas palatinas.....	21
3.3. Engenharia de tecidos.....	23
3.3.1. Terapia Celular.....	24
3.3.2. Arcabouço	27
3.3.2.1. Tela de Polipropileno.....	28
3.3.3. Selante de Fibrina.....	29
4. RESULTADOS	32
4.1. ARTIGO 1 - ESTUDO <i>IN VITRO</i> SOBRE A ASSOCIAÇÃO DE <i>SCAFFOLDS</i> DE POLIPROPILENO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS.....	32
4.1.1. Resumo.....	32
4.1.2. Abstract	33
4.1.3. Introdução	34
4.1.4. Materiais e Métodos	35
4.1.5. Análise Estatística	39
4.1.6. Resultados	39
4.1.7. Discussão	43
4.1.10. Referências.....	45
4.2. ARTIGO 2 - CORREÇÃO DE FENDA PALATINA COM REVESTIMENTO DE TELA DE POLIPROPILENO ASSOCIADA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA.....	48
4.2.1. Resumo.....	48
4.2.2. Abstract	49
4.2.3. Introdução	49
4.2.4. Materiais e Métodos	51

4.2.5.	Análise Estatística	57
4.2.6.	Resultados	57
4.2.7.	Discussão	65
4.2.8.	Conclusão.....	68
4.2.9.	Financiamento	69
4.2.10.	Referências.....	69
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1. INTRODUÇÃO

O palato é uma estrutura localizada na porção dorsal da cavidade oral, sendo responsável pela sua separação da cavidade nasal e orofaríngea (ROBERTSON, 1996; SILVA et al., 2006). Quando ocorre falha na fusão das cristas palatinas, podendo ser congênicas ou adquiridas, resulta na fenda palatina (NEVILLE et al., 2011). Em humanos, as fissuras palatinas são problemas médico-odonto-social que situam entre o 3º e 4º defeito congênito mais frequente (FIGUEIREDO et al., 2004; SILVA et al., 2008). Em pequenos animais, defeitos congênicos ou adquiridos do palato duro e/ou mole também são comuns na prática veterinária, onde muitas vezes se faz necessária a correção cirúrgica. As principais causas dos defeitos palatinos são: fator congênito, de origem traumática, infecções crônicas, odontopatias, neoplasias e complicações da cirurgia ou terapia de radiação (COOK & THOMSON, 2014). O palato fendido causa distúrbios orgânicos como pneumonia por aspiração, perda de condição corporal, rinite, descarga nasal entre outras patogenias (CONTESINI et al., 2003; SILVA et al., 2009).

A maioria dos defeitos no palato só pode ser corrigida cirurgicamente (SILVA et al., 2006). Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, fazendo uso de flapes mucosos, enxertos, tentativas de próteses e biomembranas (SILVA & MANISCALCO, 2013). Entretanto, apesar dos tratamentos atuais envolverem técnicas cirúrgicas bem descritas, a maioria delas rotacionam o tecido mole adjacente ao local do defeito e, em algumas técnicas, adicionam o enxerto de tecido duro autógeno ou alógeno, não possuindo uma eficácia satisfatória (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011).

Diante ao exposto acima, buscam-se novas alternativas para a reconstrução de fendas palatinas, tornando a engenharia de tecidos uma alternativa de tratamento para tal afecção. A engenharia de tecidos visa restaurar a função ou substituir tecidos danificados através da aplicação celular, *design* de arcabouços e utilização de moléculas que estimulem o tecido, neste caso tecido mole e ósseo (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011).

Este estudo possui duas propostas para desenvolver um método de correção de fenda palatina baseada na engenharia de tecidos. Primeiramente, definir um protocolo ideal de cultivo de células-tronco em malha de polipropileno, para avaliar duas técnicas de cultivo de células-tronco mesenquimais de origem adiposa (ADSC) de camundongo,

expressando a proteína GFP+ (Green Fluorescent Protein), utilizando-se placa de cultura de células com e sem colocação de metacrilato em seu interior, dois tipos de tela de polipropileno (macroporosa e microporosa) e em diferentes tempos de cultivo. Assim, obtendo as melhores condições de interação entre a tela de polipropileno e as células; definindo o melhor tempo de cultivo; a melhor placa de cultivo e tela de polipropileno, que permitam uma cobertura maior e mais homogênea dessas células na tela de polipropileno. A expectativa é que as células consigam interagir homogeneamente por toda a arquitetura do arcabouço, formando um verdadeiro sistema tridimensional para ser utilizado na engenharia de tecidos.

Após definido o melhor arcabouço, objetivou-se avaliar sua utilização clínica em um modelo experimental de fenda palatina em suínos. Para tal, foi utilizada a tela de polipropileno juntamente com ADSC de suíno e selante de fibrina para correção de fenda palatina, assim, avaliando-se a cicatrização de tecido mucoso e ósseo do palato duro e, com isso, desenvolver uma nova técnica de reconstrução de fendas palatinas baseada na engenharia de tecidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a biocompatibilidade da tela de polipropileno juntamente com ADSC e selante de fibrina quando aplicados na correção de fenda palatina.

2.2. Objetivos específicos

- a) Definir o protocolo de co-cultivo da tela de polipropileno com as ADSC, avaliando a tela de polipropileno (macroporosa ou microporosa), a placa de cultura e o tempo ideais de cultivo;
- b) Testar um novo método de correção de fenda palatina com uso de tela de polipropileno, ADSC e selante de fibrina, associados ou não;
- c) Avaliar a capacidade dos implantes na regeneração óssea e de mucosa do palato duro;
- d) Avaliar macro e microscopicamente as reações tissulares desencadeadas pela tela de polipropileno, ADSC e selante de fibrina quando colocado em palato, após eutanásia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Fendas palatinas

O palato é uma estrutura localizada na porção dorsal da cavidade oral, sendo responsável pela sua separação da cavidade nasal e orofaríngea. É constituído pelo palato primário (lábios, crista alveolar incisiva e pré-maxila), palato secundário (ossos palatino, maxilares e incisivos) e palato mole, que tem início no último molar e se estende até a cripta da tonsila (ROBERTSON, 1996; SILVA et al., 2006).

O palato duro é caracterizado por um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado ou paraqueratinizado, papilas conjuntivas numerosas, profundas e ramificadas, lâmina própria rica em fibras colágenas e ausência de fibras elásticas. Apresenta uma união firme e imóvel da mucosa (lamina própria) ao perióstio, denominando-se mucoperióstio. A submucosa está presente apenas nas regiões laterais do palato: região anterolateral (zona adiposa), onde a submucosa é predominantemente constituída de tecido adiposo, e região posterolateral (zona glandular) onde a submucosa é predominantemente constituída por tecido glandular do tipo mucoso. O palato mole apresenta um epitélio do tipo estratificado pavimentoso não queratinizado, possui, além da lâmina própria, uma camada distinta de fibras elásticas que separa a lâmina própria da submucosa. A submucosa é formada de tecido conjuntivo, relativamente frouxo com as glândulas salivares do tipo mucoso. A mucosa está firmemente aderida aos planos profundos através das fibras colágenas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1995).

O palato duro é delimitado lateralmente pelos sulcos palatinos, caudalmente pelos forames palatinos maiores e rostralmente pelas fissuras palatinas. A artéria palatina maior emerge no forame palatino e dirige-se rostralmente pelo respectivo sulco. Como é uma estrutura vascular fundamental para a mucosa, merece especial atenção durante os procedimentos cirúrgicos, de modo a garantir a sua integridade (GIOSO E CARVALHO, 2005).

A formação da face e da cavidade oral é de natureza complexa e envolve o desenvolvimento de múltiplos processos teciduais que devem se unir e fundir de modo muito ordenado. Distúrbios no crescimento destes processos teciduais ou nas suas fusões podem resultar na formação de fendas oronasais (NEVILLE et al., 2011).

O desenvolvimento da porção central da face tem início por volta do final da quarta semana de desenvolvimento humano, com o aparecimento dos placoides nasais

(olfatórios) de cada lado da parte inferior do processo frontonasal. A proliferação de ectomesênquima em ambos os lados de cada placóide resulta na formação dos processos nasal mediana e nasal lateral (AROSARENA, 2007; NEVILLE et al., 2011). No cão, por volta do 25º dia de vida do embrião, duas depressões olfatórias separam-se uma da outra por uma larga coluna de tecido, que é o primórdio da extremidade do septo nasal, das porções mediais do lábio superior e das porções associadas dos ossos incisivos, originando o palato primário (NELSON, 2007).

O palato primário é formado pela união dos processos nasais medianos para formar o segmento intermaxilar. Tal segmento dá origem à pré-maxila, uma estrutura óssea com formato triangular que abrigará os quatro incisivos superiores. O palato secundário, que constitui mais de 90% do palato duro e palato mole, é formado pelos processos maxilares do primeiro arco branquial (AROSARENA, 2007; NEVILLE et al., 2011).

Durante a sexta semana, projeções bilaterais emergem das porções medianas dos processos maxilares para formar as cristas palatinas. Inicialmente, estas cristas são orientadas em uma posição vertical de cada lado da língua em desenvolvimento. Conforme a mandíbula cresce, a língua assume uma posição mais inferior, permitindo que as cristas palatinas sofram rotação para uma posição horizontal e cresçam uma em direção à outra. Por volta da oitava semana, já ocorreu crescimento suficiente para permitir que as porções anteriores de tais cristas iniciem a fusão entre si. As cristas palatinas também se fusionam com o palato primário e com o septo nasal. Tal fusão inicia-se na porção anterior do palato e progride posteriormente, estando completa por volta da décima segunda semana de vida (AROSARENA, 2007; NEVILLE et al., 2011). No cão, o desenvolvimento do palato secundário sucede ao do palato primário, este evento ocorre por volta do 33º dia da gestação, onde há a separação das câmaras nasais da cavidade bucal e permitem que as atividades digestiva e respiratória prossigam independentes (NELSON, 2007).

A falha na fusão das cristas palatinas resulta na fenda palatina (NEVILLE et al., 2011). De acordo com as estruturas anatômicas envolvidas, a fenda pode ser classificada em primária se ocorrer no lábio e alvéolo; primária e secundária se envolve o lábio e o palato secundário; secundária, quando ocorre somente no palato secundário, podendo ou não existir envolvimento do palato mole (SILVA et al., 2006; MOREAU et al., 2007). A fenda do tipo primária é facilmente diagnosticada, porque o animal nasce com uma fissura anormal no lábio superior, conhecida como lábio leporino. As secundárias,

apesar de mais comuns, muitas vezes passam despercebidas por ocasião do nascimento e só são diagnosticadas quando o animal começa a apresentar alguns sinais clínicos da afecção, como escoamento de leite pelas narinas, tosse, engasgos ou espirros durante a alimentação, além das infecções do trato respiratório (SILVA et al., 2006). Em humanos, a fenda labial e a fenda palatina ocorrem mais frequentemente juntas, aproximadamente 45% dos casos são representados por fenda palatina e fenda labial, sendo 30% dos casos somente de fenda palatina (MOREAU et al., 2007; NEVILLE et al., 2011).

As principais causas dos defeitos palatinos em pequenos animais são os fatores congênito ou hereditário, origem traumática (GIOSO, 2003), nutricionais (deficiência de riboflavina, ácido fólico e vitamina A), mecânicos (no útero), hormonais ou tóxicos (ROBERTSON, 1996; NELSON, 2007), infecções crônicas, extrações dentárias ou outras odontopatias, ou ser secundárias a intervenções cirúrgicas anteriores, radioterapia ou neoplasias (SMITH, 2000; SIVACOLUNDHU, 2007). As neoplasias estão entre as principais causas de lesão óssea palatina, sendo as mais comuns o mastocitoma, a epúlida fibromatosa, o fibrossarcoma, o fibromeloblastoma e o osteossarcoma (CONTESINI et al., 2004). O tumor venéreo transmissível, apesar de menos frequente, também é causa de fenda palatina (PAPAZOGLU et al., 2001).

Em humanos, a formação de fendas é um dos defeitos congênitos craniofaciais mais frequentes. Uma considerável variação racial em relação à prevalência é observada nos indivíduos brancos, as fendas palatina e labial ocorrem em 0,5 a dois para cada 1000 nascimentos. A frequência nas populações asiáticas é aproximadamente 1,5 vezes maior do que nos indivíduos brancos; e em indivíduos negros a frequência é muito inferior, ocorrendo 0,4 caso a cada 1000 nascimentos (MOREAU et al., 2007; PANETTA et al., 2008; BUENO et al., 2009; NEVILLE et al., 2011). Em cães, as fendas palatinas congênicas apresentam maior incidência em raças braquicéfalas e em raças puras (HEDLUND, 2005, SILVA et al., 2009), sendo as raças de alto risco: Boston Terrier, Pequinês, Buldogue, Schnauzer miniatura, Beagle, Cocker Spaniel e Dachshund (HEDLUND, 2005). Entre os gatos, as raças mais acometidas são a Abissínio e a Siamesa (NELSON, 2007). Já as fendas palatinas adquiridas não apresentam predisposição racial, sexual ou etária (HEDLUND, 2005).

Os sinais clínicos mais frequentes são rinite, descarga nasal serosa ou mucopurulenta, tosse, espirros (LEE et al., 2006), pneumonia por aspiração e perda de

condição corporal (SILVA et al., 2009). O diagnóstico da afecção é realizado mediante a inspeção direta da cavidade oral, durante o exame físico (SILVA et al., 2006).

3.2. Reparo das fendas palatinas

A maioria dos defeitos no palato, independente de serem consequências de traumas, infecções crônicas, neoplasias ou alterações congênicas, só pode ser corrigida cirurgicamente, visto que existe o risco de aspiração de alimentos para a via respiratória. A dimensão da lesão e a facilidade de acesso à região afetada é que vão determinar qual técnica cirúrgica é a mais recomendada para cada caso (HETTE & RAHAL, 2004), pois a mesma pode variar de uma pequena abertura no palato mole, até uma fissura completa desde o palato mole até a papila incisiva (SILVA et al., 2006).

Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, fazendo uso de flapes mucosos, enxertos, tentativas de próteses e biomembranas (SILVA & MANISCALCO, 2013).

Griffiths e Sullivan (2001), Contesini e equipe (2004), Sivacolundhu (2007) e Souza e equipe (2007) referem a utilização de enxertos mucoperiosteais, de enxertos da mucosa palatal ou gengival ou lingual, a aplicação de próteses de resina acrílica autopolimerizável, de cartilagem auricular ou outras membranas biológicas, ou de botões para septo nasal de silicone, entre outros.

A utilização de próteses de resina acrílica autopolimerizável está indicada em casos de recidivas de cirurgias corretivas (SMITH, 2000; ROEHSIG et al., 2001; LEE et al., 2006). Roehsig e equipe (2001) utilizaram a resina acrílica diretamente no defeito do palato do animal para a sua obliteração, enquanto que Lee e equipe (2006) fixaram a prótese de resina com cola instantânea e bandas plásticas no seu paciente.

A maior complicação das palatoplastias é a deiscência e pode estar associada à movimentação, tensão ou suturas apertadas (SILVA & MANISCALCO, 2013), hemorragia, infecção e retração da ferida cirúrgica (CONTESINI et al., 2004). Outra complicação frequente das palatoplastias são as fístulas palatais, sendo relatadas suas ocorrências entre 11% a 35%, também devido à tensão após a reparação da fenda palatina, hemorragias, infecções, hipoxemia etc. (KIRSCHNER et al., 2006; STEELE & SEAGLE, 2006).

O sucesso da cirurgia reconstrutiva depende, em larga escala, da preservação da vascularização dos enxertos (SMITH, 2000) e da capacidade do enxerto resistir ao

estresse mecânico induzido pela mastigação, deglutição e movimentação traumática permanente da língua no palato regional (SIVACOLUNDHU, 2007). O prognóstico é favorável nos pacientes com pequenas fendas corrigidas cirurgicamente (SILVA et al., 2006).

Entretanto, apesar dos tratamentos atuais para fendas palatinas envolverem técnicas cirúrgicas bem descritas que, em geral, rotacionam o tecido mole adjacente ao local do defeito e, posteriormente, adicionam o enxerto de tecido duro na fenda, principalmente enxertos ósseos autógenos ou alógenos, percebe-se uma eficiência não satisfatória quando a fenda palatina apresenta um grande defeito ósseo (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011). Sendo que, a correção desses defeitos é um desafio, pois frequentemente os cirurgiões são confrontados com uma escassez de mucosa oral para corrigir o defeito. E também, é demonstrado que a correção primária de grandes defeitos orais é sempre mais vantajosa do que correções secundárias (SANCHEZ-QUEVEDO et al., 2007).

Como referenciado acima, uma série de materiais alo gênicos e sintéticos estão disponíveis atualmente para reconstrução de fendas palatinas, entretanto, eles também possuem suas desvantagens inerentes, incluindo o risco de infecção, problemas imunológicos, anormalidades estruturais de integridade e de contorno (PANETTA et al., 2008).

A utilização de transplante ósseo autólogo é atualmente a primeira escolha para procedimentos de enxerto para reparar uma fenda palatina. Enxertos deste tipo proporcionam um alto potencial osteogênico, assim formando um novo tecido ósseo (LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005; BUENO et al., 2009). No entanto, a morbidade do sítio doador, a limitada quantidade de áreas doadoras, a reabsorção do enxerto, além de que os procedimentos podem provocar dor no local doador e podem levar a complicações anatômicas e funcionais, devem ser consideradas nesse tipo de procedimento (PANETTA et al., 2008; BUENO et al., 2009; BELOTI et al., 2011).

A complexidade dos tecidos e estruturas envolvidas em fendas palatinas representam um desafio significativo para o tratamento cirúrgico. Claramente, a aplicação da engenharia de tecidos poderia aumentar significativamente o tratamento de fendas palatinas, através da regeneração de tecidos moles e a regeneração do osso alveolar (MOREAU et al., 2007).

3.3. Engenharia de tecidos

O campo da engenharia de tecidos tem como objetivo restaurar a função ou substituir tecidos danificados ou doentes através da aplicação dos princípios da engenharia e da biologia, sendo uma área de pesquisa associada à medicina regenerativa. Esses princípios incluem a seleção e manipulação de células, design de matrizes de arcabouços e a utilização de moléculas que estimulem o tecido, como fatores de crescimento e podem ser utilizados isoladamente ou em combinação (SEGUNDO & VASCONCELOS, 2007; BELOTI et al., 2011).

A baixa disponibilidade de tecidos e órgãos disponíveis para transplantes, somado a condições adversas como contaminação do tecido hospedeiro e problemas imunológicos resultam em severas limitações às técnicas tradicionais de tratamento. Dessa forma, a engenharia de tecidos procura preencher essa lacuna e solucionar parte dessas limitações das técnicas tradicionais (KOH & ATALA, 2004).

Para a produção de um novo tecido, três aspectos gerais são considerados: células ou substitutos celulares; arcabouços tridimensionais (3D) e compostos que possam estimular o tecido, como os fatores de crescimento. Além dos itens citados, uma técnica cirúrgica adequada é pré-requisito para a aplicação clínica dos conceitos da engenharia de tecidos. Experimentalmente, tal técnica tem sido utilizada com o objetivo de reparar diferentes tecidos, como epitélios de revestimento e osso. Na engenharia de tecido ósseo a maioria dos estudos está focada na fabricação de arcabouços, seleção das células e construção do novo tecido ósseo. (BELOTI et al., 2011). Assim, o resultado pretendido da implantação da engenharia de tecidos é uma construção de um novo tecido que é estruturalmente e funcionalmente integrado ao tecido hospedeiro (MOREAU et al., 2007).

Em relação às fendas palatinas, apesar do desenvolvimento da engenharia de tecidos ser comum atualmente, ainda existem poucos trabalhos aplicados na correção dessa patologia oral. A aplicação de enxertos baseados na engenharia de tecidos para correção de fendas palatinas oferece vantagens adicionais de uma abordagem simplificada e fechamento sem tensão (KIRSCHNER et al., 2006; SANCHEZ-QUEVEDO et al., 2007). Alguns trabalhos demonstram a utilização de matriz dérmica descelularizada (CLARK et al., 2003; KIRSCHNER et al., 2006; STEELE & SEAGLE, 2006) podendo ser cultivadas com queratinócitos (OPHOF et al., 2008); matriz extracelular de fibrina-agarose cultivadas com queratinócitos (SANCHEZ-QUEVEDO

et al., 2007); biomembrana natural de látex com polilisina (SILVA & MANISCALCO, 2013); células-tronco mesenquimais (MSC) e fatores de crescimento derivados de plaquetas em arcabouços de hidroxiapatite bifásica/fosfato tricálcico (BEHNIA et al., 2012); MSC juntamente com plasma rico em plaquetas (PRP) (HIBI et al., 2006); e muitos autores sugerem a utilização das MSC nas fendas e fistulas orais (CARSTANJEN et al., 2006; PAGANELLI et al., 2006; MOREAU et al., 2007; RESEL et al., 2007; MCGUIRE et al., 2008; BEHNIA et al., 2009; BUENO et al., 2009).

3.3.1. Terapia Celular

As pesquisas na área de engenharia de tecido ósseo concentram-se, com relação às células a serem utilizadas, em células indiferenciadas com potencial para adquirir o fenótipo osteoblástico sob estímulos adequados e em células da linhagem osteoblástica (BELOTI et al., 2011). De acordo com Handschel e equipe (2006), três grupos distintos de células podem ser determinados com relação à capacidade de diferenciação: (1) células irrestritas capazes de diferenciação para todos ou a maioria dos tipos celulares (células-tronco embrionárias), (2) células progenitoras multipotentes que adquirem um fenótipo específico dependendo de seu estágio de maturação (células-tronco multipotentes) e (3) células diferenciadas (da linhagem osteoblástica, incluindo osteoblastos). Deve-se levar em consideração para a escolha da célula algumas características, como: nenhuma rejeição imunológica, nenhuma doença enxerto versus hospedeiro, não ser tumorigênico, disponibilidade imediata, disponibilidade em grandes quantidades, taxa de proliferação celular controlada, potencial osteogênico previsível e integração controlada com os tecidos circundantes (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005).

As células-tronco são boas candidatas para as terapias de engenharia de tecidos celular, pois é um dos tipos celulares que são recrutados pelo corpo para a reparação de tecidos lesionados (MOREAU et al., 2007). Considerando a origem, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias totipotentes (embrião), embrionárias pluripotentes (blastocisto) e multipotentes (isoladas de tecidos adultos). As células-tronco embrionárias apresentam a maior plasticidade e são totipotentes ou pluripotentes, dependendo do estágio embrionário em que foram isoladas, podendo diferenciar-se em qualquer tipo celular (CIRNE-LIMA, 2007; FONTANA, 2009). Tem sido demonstrado

que essas células diferenciam-se em osteoblastos quando cultivadas em condições osteogênicas (DUPLOMB et al., 2007). Dois principais desafios estão relacionados ao uso de células-tronco embrionárias: reações imunológicas e formações tumorais após cultura e transplante (BELOTI et al., 2011).

Entre os diferentes tipos de células-tronco adultas, as mais estudadas são células-tronco mesenquimais (MSC) ou células estromais multipotentes, primeiramente identificadas e descritas por Friedenstein e colaboradores (1968). São células indiferenciadas, sendo que as principais características que as tornam extremamente interessantes são: sua capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar, mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma população ativa de maneira constante nos tecidos e *in vitro*; e, mais interessante ainda, sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos de tecidos (BYDLOWSKI et al., 2009; CHENG et al., 2011).

As MSC são um grupo de células clonogênicas (ABDALLAH & KASSEN, 2008), capazes de suportar a hematopoiese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares (COVAS, 2006) e, possivelmente, em diferentes tipos celulares não mesodérmicos. MSC é um termo comumente aplicado para referir-se a células com alta plasticidade, aderentes, isoladas tanto da medula óssea, do tecido adiposo (PEREIRA et al., 2008) e de outros tecidos, com capacidade de diferenciação multipotente *in vitro*, tendo morfologia semelhante ao fibroblasto (BYDLOWSKI et al., 2009).

As MSC constituem uma pequena população celular na medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (COVAS, 2006). Contudo, podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência e induzidas a se diferenciarem em múltiplas linhagens em condições de cultura definidas (COVAS, 2006; NARDI & MEIRELLES, 2006; BYDLOWSKI et al., 2009). Relatos sugeriram que a capacidade de diferenciação das MSC pode contribuir para resultados observados, ou seja, elas podem se diferenciar em células específicas e não específicas de um tecido *in vitro e in vivo*, e têm a tendência de adquirirem características tecido-específica quando cultivadas com tipos de células especializadas ou quando expostas a extratos teciduais *in vitro* (NARDI & MEIRELLES, 2006).

As MSC derivadas da medula óssea (BMSC) têm servido como fonte tradicional de células progenitoras de tecido ósseo. Entretanto, seu isolamento é considerado invasivo, buscando-se, assim, outras fontes dessas células (BUENO et al., 2009). Desde a primeira descrição de MSC derivadas de tecido adiposo (ADSC),

aumentou o interesse por esse tipo celular para aplicações em engenharia de tecidos (ZUK et al., 2002). Isto ocorreu devido a sua melhor acessibilidade, segurança da colheita e abundância da gordura subcutânea (PANETTA et al., 2008).

O tecido adiposo encontra vantagens incontestáveis como fonte de MSC indiferenciadas por causa de sua fácil obtenção (por meio de lipoaspiração ou lipectomia), baixas taxas de morbidade e pelo alto rendimento (NAMBU et al., 2009; HASSAN et al., 2014). Pela colheita de tecido adiposo podem-se obter 2 a 3×10^8 células-tronco por 300 ml de material aspirado quando comparado à medula óssea, que pode produzir uma célula tronco por 10^5 células estromais (ZUK et al., 2001).

Estudos prévios indicaram que as MSC são potentes inibidoras da proliferação das células T induzindo sua apoptose e bloqueando a maturação de células dendríticas (NEWMAN et al., 2009), prevenindo a doença contra o hospedeiro em casos de transplante de medula e prolongando a sobrevivência de enxertos em modelos experimentais (SBANO et al., 2008; KUO et al., 2012).

Também, as MSC secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem a migração e a expansão celular, exercem atividades imunomoduladoras (GAO et al., 2011; GEBLER et al., 2012), modulam a angiogênese e a apoptose celular e suportam a migração e a diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (GEBLER et al., 2012). Sua capacidade de secreção de citocinas e outros fatores parácrinos no sítio da lesão pode melhorar significativamente a cicatrização (GAO et al., 2011).

A terapia com MSC cresce não somente pelo fácil isolamento e cultivo, potencial de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas, mas também pelo seu potencial imunomodulatório. Estudos comparando os transplantes homólogos e autólogos de MSC não encontram diferenças terapêuticas significativas e, além disso, não se observa rejeição das mesmas (PLANKA et al., 2007; CHEN et al., 2009; WAN et al., 2013). E isso se deve ao fato de as MSC apresentarem baixa imunogenicidade (MCFARLIN et al., 2006; HASSAN et al., 2014).

Existem pelos menos duas possibilidades pelas quais as MSC possam promover a cicatrização: por sinalização parácrina e por diferenciação. A primeira mostra que elas tem a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Pode ser que após a migração para a ferida, elas sejam ativadas ao encontrar o meio repleto de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das MSC poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no

microambiente da ferida secretando fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a enorme plasticidade e habilidade que essas células têm para se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos (KIM et al., 2009; SORRELL & CAPLAN, 2010; WU et al., 2010; HASSAN et al., 2014).

3.3.2. Arcabouço

A bioengenharia tecidual introduz uma dicotomia em potencial entre a necessidade de sofisticação e a facilidade de produção. Suas estratégias compreendem além de metodologias de isolamento e de cultura de células, o desenvolvimento de polímeros e de arcabouços tridimensionais, aos quais as células serão associadas. O arcabouço deve ser um dispositivo estrutural que além de definir a geometria do tecido substituído, forneça sinais para a promoção da regeneração tecidual. O maior desafio dessa estratégia é recriar espacialmente e temporalmente os eventos de diferenciação celular e de organogênese (AHMED & HINCKE, 2010).

Um grande esforço tem sido despendido no desenvolvimento de matrizes artificiais, desde materiais inertes até materiais dinâmicos, que interagem com o organismo, a fim de se promover a recuperação do tecido ou órgão lesado. O foco é permitir ao organismo se apropriar dessas matrizes, reconhecendo-as e as utilizando no processo de recuperação da região lesada. Portanto, a concepção das matrizes artificiais é permitir às células um ambiente propício ao seu desenvolvimento (ZHANG et al., 2009).

Diversas características devem ser consideradas durante o desenvolvimento de uma matriz. O arcabouço deve fornecer uma estrutura sólida para o crescimento e a diferenciação celular no sítio, permitindo a fixação e a migração celular. O arcabouço tem que poder ser implantado sozinho para induzir a migração da célula hospedeira para a ferida local e iniciar a regeneração de tecido, ou pode servir como um suporte para as células implantadas (SHARMA & ELISSEFF, 2004; MOREAU et al., 2007). Também deve ser biocompatível, deve fornecer uma plataforma na qual as células podem se aderir e proliferar, ter uma estabilidade mecânica suficiente e ser fácil de fabricar, esterilizar e manipular no sítio da cirurgia (LOGEART-AVRAMOGLU et al., 2005; MOREAU et al., 2007). Além disso, é desejável a interconectividade entre os poros para a semeadura uniforme de células e distribuição e difusão de nutrientes bem

como, a remoção de metabólitos (LIU & MA, 2004; LIAO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

Até o presente momento, os biomateriais que têm sido avaliados como potenciais arcabouços para serem utilizados em engenharia de tecido ósseo incluem: (1) metais como o titânio; (2) materiais sintéticos orgânicos, incluindo polímeros e copolímeros; (3) materiais sintéticos inorgânicos, como hidroxiapatita e compostos de fosfato de cálcio; (4) materiais naturais orgânicos, como colágeno, ácido hialurônico e quitosana; e (5) materiais inorgânicos naturais, como hidroxiapatita coralina (BELOTI et al., 2011).

Por ter grande aceitação e aplicabilidade em outras especialidades médicas (TUNN et al., 2007; SIVASLIOGLU et al., 2008), a tela de polipropileno é facilmente encontrada nos centros cirúrgicos, sendo uma alternativa a mais disponível ao cirurgião bucomaxilofacial (SILVA, 2009).

3.3.2.1. Tela de Polipropileno

O Polipropileno descoberto em 1954, pelos ganhadores do Prêmio Nobel de química, Giulio Natta e Karl Ziegler (CODA et al., 2012) passou a ser amplamente empregado após a publicação de Usher em 1958 (BROWN & FINCH, 2010) e, é até os dias de hoje, o material mais utilizado nas cirurgias de restauração de hérnias em razão de seu baixo custo, não biodegradabilidade e extensa incorporação tecidual (HUBER et al., 2012).

Segundo Vaz e colaboradores (2009), a tela de polipropileno é tecida com fio monofilamentar e entremeada por poros. Possui uma superfície áspera que permite não apenas a infiltração de fibroblastos, mas também a produção de colágeno, além de oferecer uma resposta inflamatória moderada do tipo corpo estranho. Apresenta ainda inexpressivo nível de reatividade e relativamente baixo potencial de aderência bacteriana. Mesmo quando colocada em ambiente altamente contaminado, a tela aceita total incorporação por tecido de granulação. Os autores desse trabalho destacam ainda que o fato do material utilizado ser de polipropileno, ou seja, não absorvível, permite a deposição de tecido fibroso, que permanecerá por tempo indeterminado nesse local, garantindo a barreira mecânica (ARAÚJO et al., 2010).

Estudos realizados em animais vêm demonstrando resultados animadores, como menor índice de rejeição, menor taxa de inflamação e processo de cicatrização mais rápido, além de menos complicações (PUNDEK et al., 2010; SINISCALCHI et al., 2011).

A tela ideal impede a aderência bacteriana e permite que os macrófagos entrem no interstício. Portanto, a tela monofilamentar e com macroporos é preferível (FOON & SMITH, 2009). Quatro características da tela que integradas trazem melhores resultados: polipropileno, elasticidade, macroporos e monofilamentos (ANTUNES et al., 2012).

Outra característica importante observada na tela de polipropileno é a facilidade da adaptação no sítio receptor devido à sua maleabilidade. O entrelaçamento em forma de malha permite a imbricação de tecidos em seus espaços (SILVA, 2009).

A tela de polipropileno possui seu uso consagrado em outras especialidades cirúrgicas, por sua capacidade de substituir tecidos moles. Sua constituição química lhe confere baixa reação tecidual pelo hospedeiro, sua forma física permite maleabilidade e sua tecelagem deixa espaços que permitem o crescimento de tecido em seu interior (SILVA, 2009). Esse conjunto de características torna seu uso possível, mesmo em sítios infectados, ao permitir formação de tecido de granulação que envolve o material e atinge a área infectada através dos orifícios de sua malha. Além disso, a tela de polipropileno é de baixo custo e está disponível nos centros cirúrgicos, visto que seu uso na reconstrução de tecidos moles já é consagrado e tem demonstrado bons resultados (SHESTAK et al., 2000; YOSHINO et al., 2006).

A tela de polipropileno associada às MSC proporcionam um suporte mais funcional para estas células, sendo capaz de estimular o crescimento de fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização e estabelecimento de defesas naturais do hospedeiro (DOLCE et al., 2010).

3.3.3. Selante de Fibrina

Selantes de fibrina, também conhecido como cola de fibrina ou adesivo tecidual de fibrina, foram utilizados pela primeira vez para estabelecer a hemostasia no início do último século. Em 1940, foi produzido o primeiro adesivo biológico, mas o método de isolamento utilizado na época não forneceu uma concentração suficiente de fibrinogênio. No decorrer dos anos, o progresso no fracionamento do plasma foi se

aperfeiçoando até atingir concentrações elevadas de fibrinogênio, e selantes de fibrina têm sido disponibilizados comercialmente na Europa desde o final da década de 1970 (SOFFER et al., 2003).

Este vedante tecidual é composto por fibrina, fator XIII e trombina humana. A fibrina é uma substância produzida pelo fibrinogênio humano submetido a um rigoroso processo de purificação, depois é concentrado e pasteurizado. Na reconstituição são utilizadas soluções de aprotinina, que é um agente antifibrinolítico com função de estabilizar o coágulo formado, e cloreto de cálcio. A reconstituição do material reproduz os últimos passos da coagulação o que representa um mecanismo fisiológico na hemostasia (FAGUNDES et al., 2002; SILVA et al., 2007).

O processo de reconstituição do material mimetiza os últimos passos da cascata de coagulação, que ocorre normalmente no organismo, ou seja, o fibrinogênio interage com a trombina e libera uma fibrina monomérica, que na presença do fator XIII e do cálcio transforma esta fibrina em polimérica por meio de diversas pontes (SILVA et al., 2007).

Sua principal função é a de agente cirúrgico hemostático derivado do plasma sanguíneo, também promove melhora e aceleração da cicatrização local ou tecidos enxertados, selamento tecidual e suporte para sutura (MAGRO et al., 2011). Ele age positivamente na cicatrização da ferida porque produz hemostasia local e estimula o fluxo de macrófagos com formação de fatores como a angiotensina, que liberados favorecem a angiogênese, induz a proliferação de fibroblastos e a produção de colágeno (PRADO FILHO et al., 2002). Além de não provocar reação inflamatória e tecidual no local da aplicação, possui baixo efeito tóxico e carcinogênico e é biodegradável. Seu mecanismo de liberação nos tecidos é lento, não gera produtos de degradação tóxicos, sendo que 20% de sua massa original são desintegrados por fibrinólise, em 72 horas, após a aplicação (SILVA et al., 2007), e é totalmente degradada em duas semanas (GOSAIN & LYON, 2002). Tem sido proposto seu uso como substituto do estroma para a reconstrução de diferentes tecidos. Possui as vantagens de baixo custo, disponibilidade e boa tolerância às células (SANCHEZ-QUEVEDO et al., 2007).

Selantes de fibrina são atualmente utilizados em cirurgias cardiovascular e torácica, neurocirurgia, cirurgia oftálmica, cirurgia reconstrutiva, cirurgias oral e maxilofacial (SOFFER et al., 2003). Os resultados também são positivos quando se utiliza o adesivo em superfície radicular de replante dentário tardio, mioescleropenia posterior, tratamento periodontal (BECKER, 2005), ressecção de linfangiomas

(BOULOS et al., 2005), fistula nefrocutânea persistente (BRADFORD & WOLF JR, 2005), fistula gastro-jejunal (GARCIA-CABALLERO et al., 2005), ulcera e perfurações de córnea, transplante de córnea (PFISTER & SOMMERS, 2005), cirurgia endonasal (VAIMAN, et al., 2005) e em fistula anal (VITTON et al., 2005).

4. RESULTADOS

4.1. ARTIGO 1 - ESTUDO *IN VITRO* SOBRE A ASSOCIAÇÃO DE *SCAFFOLDS* DE POLIPROPILENO E CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS PARA USO EM ENGENHARIA DE TECIDOS

IN VITRO STUDY CONCERNING POLYPROPYLENE SCAFFOLDS ASSOCIATED WITH MESENCHYMAL STEM CELLS FOR USE IN TISSUE ENGINEERING

4.1.1. Resumo

A engenharia de tecidos tem como objetivo substituir tecidos danificados com a manipulação de células, confecção de arcabouços e a utilização de moléculas que estimulem o tecido. As células-tronco mesenquimais (MSC) são boas candidatas para as terapias de engenharia de tecido celular, pois é um dos tipos celulares que são recrutados pelo corpo para a reparação de tecidos lesionados além de secretarem um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que melhoram a cicatrização. O arcabouço deve ser um dispositivo estrutural que, além de definir a geometria do tecido substituído, forneça uma estrutura para o crescimento e a diferenciação celular no sítio, permitindo a fixação e a migração celular, sendo a tela de polipropileno um bom exemplo de arcabouço. A proposta deste estudo foi avaliar duas técnicas de cultivo de MSC em diferentes placas de cultura, utilizando dois tipos de telas de polipropileno (macroporosa e microporosa) durante um período de quinze dias, para obter as melhores condições de interação entre a tela e as células, e definir uma proposta de protético para engenharia de tecidos. As telas de polipropileno foram cultivadas com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (ADSC) isoladas de camundongos C57Bl/6 GFP+ durante quinze dias em placas revestidas, ou não, com metacrilato. A quantidade de ADSC aderidas foram verificadas diariamente em Câmara de Neubauer e através de uma curva de crescimento realizada através de ensaio de MTT. As ADSC aderidas nas telas foram visualizadas com a marcação de DAPI, panótico, hematoxilina e eosina, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Em todas as formas de cultivo e nos dois tipos de telas de polipropileno houve aderências das

ADSC. Entretanto, o melhor protocolo, onde as ADSC se aderiram mais, foi na tela microporosa, no período de sete dias de cultivo e em placas sem metacrilato. Conclui-se que a tela de polipropileno oferece um bom arcabouço para as ADSC se aderirem podendo ser utilizada na engenharia de tecidos.

Palavras-chave: arcabouço, tela de polipropileno, células-tronco mesenquimais, engenharia de tecidos.

4.1.2. Abstract

The tissue engineering aims to replace damaged tissue with cell handling, scaffolds design and use of molecules that stimulate tissue. Mesenchymal stem cells (MSC) are good candidates for the tissue engineering therapies, because they are one of cell types that recruited by the body to repair damaged tissues as well as secrete a number of growth factors, cytokines and chemokines to improve healing. The scaffold must be a structural device, in addition to defining the geometry of the replaced tissue, provide a structure for cell growth and differentiation at the site, allowing attachment and cell migration, and the polypropylene mesh, a good example of scaffold. The purpose of this study was to evaluate two MSC cultivation techniques in different culture dishes, using two types of polypropylene meshes (macroporous and microporous) for a period of fifteen days, to get the best conditions for interaction between the mesh and the cells. The meshes were cultured with adipose derived stromal cells (ADSC) from C57B1/6 GFP + for fifteen days in plates coated, or not, with methacrylate. The amount of adhered ADSC were checked daily using a Neubauer Chamber and through a growth curve performed through the MTT assay. Verification of ADSC adhered on the meshes were visualized with DAPI marking, Panotic, hematoxylin and eosin, immunohistochemistry and immunofluorescence. In all forms of culture and two types of meshes there were adhesions the ADSC, however, the best protocol, where the ADSC is adhered more, was the microporous mesh in the seven-day culture period and without methacrylate plates. It concludes that the polypropylene mesh provides a good scaffold for the ADSC to adhere can be used in tissue engineering.

Key words: scaffold, polypropylene mesh, mesenchymal stem cell, tissue engineering.

4.1.3. Introdução

O campo da engenharia de tecidos tem como objetivo restaurar a função ou substituir tecidos danificados ou doentes através da aplicação dos princípios da engenharia e da biologia, sendo uma área de pesquisa associada à medicina regenerativa. Esses princípios incluem a seleção e manipulação de células, confecção de matrizes de arcabouços e a utilização de moléculas que estimulem o tecido (SEGUNDO & VASCONCELOS, 2007; BELOTI et al., 2011).

A baixa disponibilidade de tecidos e órgãos disponíveis para transplantes, somado a condições adversas como, contaminação do tecido hospedeiro e problemas imunológicos, resultam em limitações às técnicas tradicionais de tratamento. Dessa forma, a engenharia de tecidos procura solucionar parte dessas limitações das técnicas tradicionais (KOH & ATALA, 2004).

As células-tronco mesenquimais (MSC) são boas candidatas para as terapias de engenharia de tecido celular, pois é um dos tipos celulares que são recrutados pelo corpo para a reparação de tecidos lesionados (MOREAU et al., 2007). As MSC secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem a migração e a expansão celular, exercem atividades imunomoduladoras, modulam a angiogênese e a apoptose, além de possuírem o potencial de diferenciação celular, assim melhorando a cicatrização (GEBLER et al., 2012; GAO et al., 2014).

O arcabouço deve ser um dispositivo estrutural que além de definir a geometria do tecido substituído, forneça sinais para a promoção da regeneração tecidual (AHMED & HINCKE, 2010). O arcabouço deve fornecer uma estrutura para o crescimento e a diferenciação celular no sítio, permitindo a fixação e a migração celular. (SHARMA & ELISSEEFF, 2004; MOREAU et al., 2007). Também deve ser biocompatível, fornecer uma plataforma na qual as células possam se aderir e proliferar, ter uma estabilidade mecânica e ser fácil de fabricar, esterilizar e manipular no sítio da cirurgia (MOREAU et al., 2007). Além disso, é desejável a interconectividade entre os poros para a semeadura uniforme de células e distribuição e difusão de nutrientes bem como, a remoção de metabólitos (LIU & MA, 2004; LIAO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

A tela de polipropileno é o material mais utilizado nas cirurgias de restauração de hérnias em razão de seu baixo custo, não biodegradabilidade e extensa incorporação tecidual (HUBER et al., 2012). É tecida com fio monofilamentar e entremeada por poros, possuindo uma superfície áspera que permite não apenas a infiltração de

fibroblastos, mas também a produção de colágeno (VAZ et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010). Assim, a tela de polipropileno associada às MSC proporciona um arcabouço mais funcional para estas células, sendo capaz de fomentar o crescimento de fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização e estabelecimento de defesas naturais do hospedeiro (DOLCE et al., 2010).

A proposta deste estudo foi avaliar duas técnicas de cultivo de MSC em diferentes placas de cultura, utilizando dois tipos de telas de polipropileno (macroporosa e microporosa), assim obtendo as melhores condições de interação entre a tela e as células; o melhor tempo e a melhor concentração de MSC. A expectativa é que as células consigam aderir na arquitetura do arcabouço, formando um sistema tridimensional para ser utilizado na engenharia de tecidos.

4.1.4. Materiais e Métodos

Todos os animais foram mantidos e manipulados segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e da Comissão de Ética no Uso de Animais, com base na Lei nº. 11.794, de 8 de Outubro de 2008. Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o protocolo 15-104.

Isolamento, expansão e caracterização das ADSC

O isolamento das células-tronco mesenquimais adiposo derivadas foi realizado a partir da gordura inguinal de camundongos C57Bl/6 GFP+. Após a indução de morte dos animais por meio de sobredose anestésica por isoflurano, a gordura foi retirada e processada em capela de fluxo laminar. O tecido adiposo coletado foi digerido com solução de colagenase tipo I (1mg/mL) e a suspensão celular obtida foi centrifugada e posteriormente plaqueada em placas de seis poços com meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)¹ suplementado com HEPES 9mM, 1% de solução antibiótica de penicilina e estreptomicina, e 20% de soro fetal bovino² (SFB), sendo mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Transcorridas 24 horas de cultivo, o meio de cultivo foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura celular apresentou

¹ Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen – CA, USA.

² Soro Fetal Bovino, Invitrogen – CA, USA.

confluência aproximada de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de tripsina-EDTA 0,05%³ para posterior subcultivo em DMEM suplementado com 20% SFB (meio completo). Atingindo-se a quarta passagem, as células foram caracterizadas de acordo com as normas da *International Society for Cell Transplantation*, realizando-se a diferenciação *in vitro* nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica.

Cultura celular sobre a tela

Após a caracterização das ADSC na quarta passagem, estas foram plaqueadas em dois tipos de tela de polipropileno: macroporosa⁴ (1,1 a 1,3mm) e microporosa⁵ (0,09 a 0,6mm), e cultivadas de duas formas: em placas de 24 poços convencionais e revestidas com metacrilato⁶ para as células não se aderirem no fundo da placa. As telas foram cortadas de forma asséptica obtendo o tamanho de 0,5x0,5cm, colocadas nas placas e, posteriormente, adicionou-se 1×10^4 ADSC e 500µL de meio de cultivo DMEM suplementado com 1% de antibiótico e 20% de SFB, sendo mantidas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultivo era trocado a cada três dias durante 15 dias, e diariamente se fazia contagem das células aderidas na malha em Câmara de Neubauer, em triplicata, visando estabelecer o melhor tempo de cultivo. Para realizar esta contagem, retirou-se a malha do poço e colocou-a em uma nova placa, adicionou-se 200µL de tripsina-EDTA 0,05% durante 1 minuto em temperatura ambiente. Após, acrescentou-se 1mL de meio de cultivo fresco, aspirou-se todo o conteúdo, inclusive a tela, colocando em um tubo para centrifugação. Depois de centrifugar em 2000 RPM durante cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100µL de meio de cultivo ressuspendendo o *pellet* formado pelas células. Aspirou-se 20µL e a suspensão celular foi quantificada em Câmara de Neubauer em microscópio óptico⁷ com objetiva de 10X.

Ensaio de MTT

Para confirmar o número de células aderidas nas telas, realizou-se uma curva de crescimento através da atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio de MTT⁸ (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio), com quantidades conhecidas de

³ Tripsina, Gibco – NM, USA.

⁴ SulMedical (SM3015-501).

⁵ IntraCorp, Venkuri.

⁶ Adper Scotchbond.

⁷ Nikon Eclipse.

⁸ Sigma (M2128).

ADSC. Doze diferentes concentrações de células foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^2 ; 8×10^2 ; 1×10^3 ; $1,5 \times 10^3$; 2×10^3 ; 5×10^3 ; 1×10^4 ; $1,4 \times 10^4$; 3×10^4 ; $4,4 \times 10^4$; $5,9 \times 10^4$; $7,4 \times 10^4$), acrescidos de 1mL de meio de cultivo completo. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 12 horas. Cento e onze microlitros de MTT foram adicionados em cada poço sendo as placas, envoltas por papel alumínio, reincubadas por mais quatro horas. Removido o meio de cultivo com MTT, acrescentou-se 300µL de DMSO (dimetilsulfóxido) que ficou agindo por 30 minutos com leve agitação a cada três minutos. Foram transferidos 100µL dessa solução para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro⁹ com absorvância de 550nm. A leitura da densidade óptica foi, então, representada graficamente em função do número de células para obter a curva de crescimento baseada na atividade mitocondrial.

Os ensaios de MTT nas telas em cultivo com as ADSC foram realizadas nos dias 3, 7, 11 e 15. Para remover as células aderidas nas malhas, realizou-se o mesmo procedimento descrito para a contagem na Câmara de Neubauer. E para obter a leitura da densidade óptica, foi realizado o mesmo procedimento descrito para a realização da curva de crescimento, todos em triplicata.

DAPI

A coloração nuclear com DAPI¹⁰ (4,6-diamidino-2-fenilindol) foi utilizada para ajudar a visualizar e destacar as células aderidas nas telas de polipropileno. As telas foram removidas para uma nova placa e lavadas com PBS. Adicionaram-se duas gotas de DAPI, cobriu-se a placa com papel alumínio e deixou-se agir durante 20 minutos. Após, lavou-se duas vezes com PBS e realizou-se a leitura em microscópio de fluorescência¹¹ e confocal¹².

Colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) e Panótico

As colorações de HE e Panótico¹³ foram realizadas diretamente na tela para visualização das ADSC aderidas. Para a coloração rápida de Panótico, primeiramente, lavou-se a tela com PBS e em seguida utilizaram-se os seguintes reagentes, na ordem

⁹ Spectramax M3 software Pro 6.22.

¹⁰ Sigma (F6057).

¹¹ Olympus IX71.

¹² Leica TCS SP5.

¹³ Kit Panótico Rápido LB Laborclin.

em que seguem: solução de triarilmetano a 0,1%, solução de xantenos a 0,1% e solução de tiazinas a 0,1%. Cada tela ficou submersa durante cinco segundos em cada solução e após foram lavadas com água e visualizadas em microscópio¹⁴ óptico.

Na coloração de HE, utilizou-se o seguinte protocolo: fixação das ADSC nas telas com formol tamponado 10% durante oito horas, hidratação da amostra com álcool etílico em concentrações decrescentes, lavagem da amostra com água, coloração com hematoxilina durante três minutos, lavagem da amostra com água, coloração de eosina durante sete minutos, lavagem da amostra com água e visualização em microscópio óptico.

Imuno-histoquímica (Integrina)

A imuno-histoquímica foi realizada diretamente na tela para visualização das ADSC aderidas. Estas foram fixadas em metanol, após foram submetidas à recuperação antigênica, realizada em banho-maria por uma hora a 95°C no tampão citrato. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol por 30 minutos. As células foram incubadas *overnight* a 4°C, com o anticorpo primário CD29/Integrina¹⁵ na diluição 1:100. Após a incubação foi aplicado o sistema de detecção anticorpo secundário *goat anti-mouse* IgG-HRP¹⁶ e a visualização da reação foi obtida com Liquid Dab¹⁷, conforme recomendações do fabricante. Após a visualização, as células foram contra-coradas com hematoxilina de Harris e diferenciadas em água amoniacal 2%.

Imunofluorescência (Actina)

A imunofluorescência foi realizada diretamente na tela para visualização das ADSC aderidas. Estas foram fixadas em metanol, após foram lavadas com PBS três vezes. A atividade de peroxidase endógena foi bloqueada com solução de BSA a 2% em PBS durante 30 minutos. As células foram incubadas *overnight* a 4°C, com o anticorpo primário anti-actina Ab-5¹⁸ na diluição 1:100. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas durante três horas com o anticorpo secundário

¹⁴ Nikon Eclipse.

¹⁵ BD Transduction Laboratories (610468).

¹⁶ Santa Cruz Biotechnology (2005).

¹⁷ Dako (K3468).

¹⁸ BD Transduction Laboratories (612657).

anti-mouse IgG F(ab')₂ fragment-R-Phycoerythrin¹⁹, sendo lavadas com PBS três vezes após a incubação. Os núcleos foram corados com DAPI por 20 minutos e, após este período, lavados com PBS três vezes.

4.1.5. Análise Estatística

Para análise estatística, foi utilizado software IBM SPSS versão 22 (SPSS Inc. IBM Company). Os dados do teste do MTT foram comparados por ANOVA complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5%.

4.1.6. Resultados

A caracterização das ADSC realizada através do ensaio de indução de diferenciação celular *in vitro*, obteve resultado positivo, pois estas foram capazes de se diferenciarem em linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica (Fig. 1).

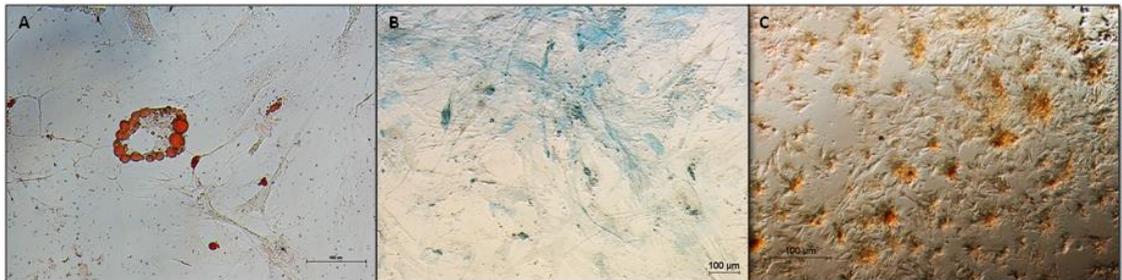


Figura 1 - Caracterização das ADSC obtidas a partir de tecido adiposo inguinal de camundongos C57Bl/6 GFP+. (A) Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 200X; (B) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 100X; (C) Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 40X.

A contagem diária em Câmara de Neubauer demonstrou que o sétimo dia de cultivo foi o período no qual as ADSC mais se aderiram em ambas as telas. E a tela que obteve maior número de células aderidas foi a microporosa (Fig. 2). A curva de crescimento que foi gerada utilizando a avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT, obteve os mesmos resultados, assim confirmando os dados (Fig. 3). A análise estatística do ensaio de MTT está representada na figura 4.

¹⁹ Sigma-Aldrich (P8547).

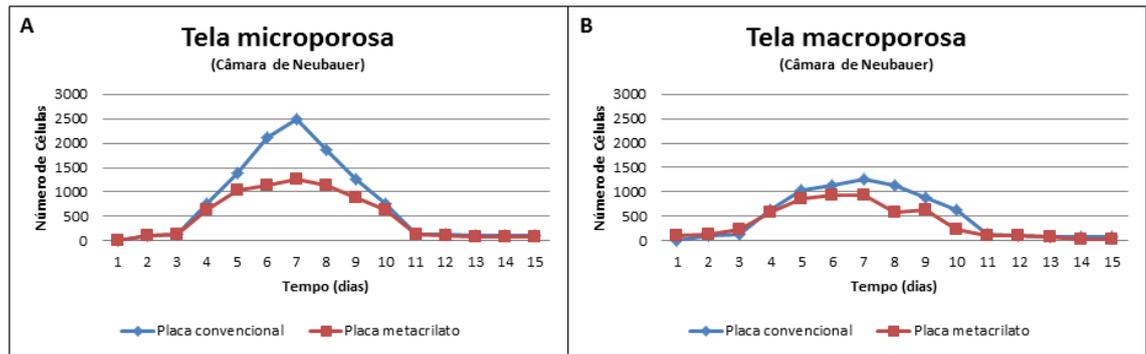


Figura 2 - Contagem em Câmara de Neubauer das ADSC aderidas nas telas microporosa (A) e macroporosa (B) durante o cultivo celular em placas de cultura convencional e com revestimento de metacrilato.

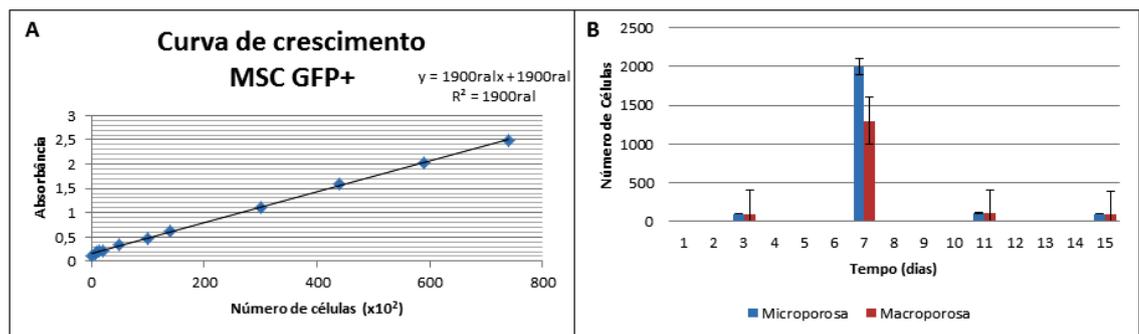


Figura 3 – (A) Curva de crescimento realizada através da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT com quantidades conhecidas de ADSC; (B) Quantidade de ADSC aderidas nas telas microporosa e macroporosa durante os dias 3, 7, 11 e 15 de cultivo celular em placa de cultura convencional.

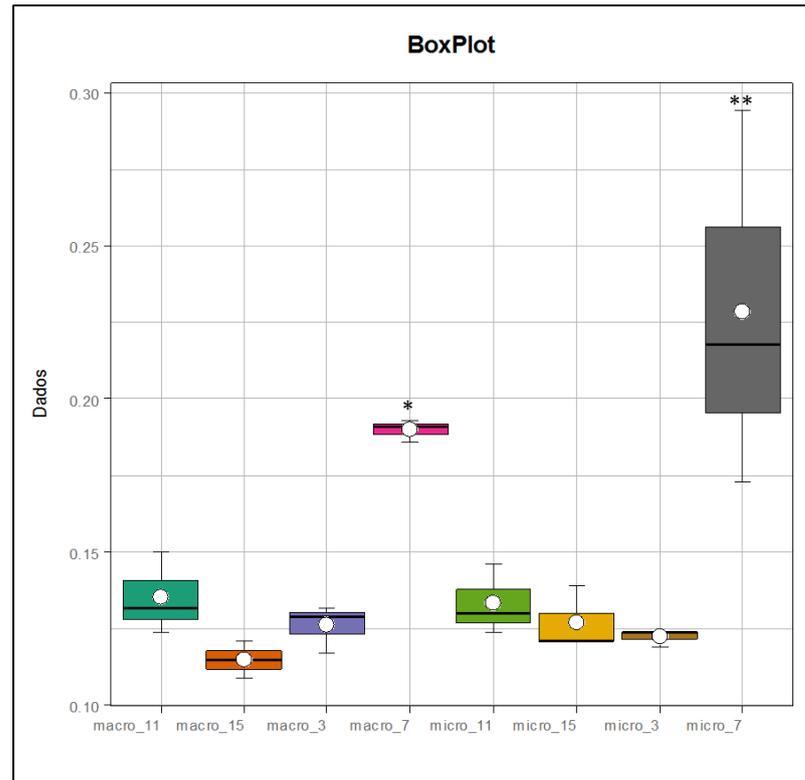


Figura 4 - Gráfico box plot do resultado do teste de MTT nas telas microporosa e macroporosa nos dias 3,7,11 e 15. Os dados foram analisados pelo teste de variância ANOVA complementado pelo teste de Tukey ($p=0,00000003$). (*;**) Indicam diferença estatística entre os grupos ($n=3$).

A incorporação bem sucedida das ADSC nas próteses também foi confirmada por microscopia (Fig. 5), que permitiu visualizar a aderência e o crescimento celular junto às telas. As colorações de Panótico, HE e imuno-histoquímica com anticorpo anti-integrina (Fig. 6), bem como a marcação com DAPI e imunofluorescência com anticorpo anti-actina, visualizadas em microscopia de fluorescência (Fig. 7 e 8), permitiram observar melhor as ADSC sobre as telas, evidenciando uma aderência com padrão irregular dessas células sobre a superfície das telas.

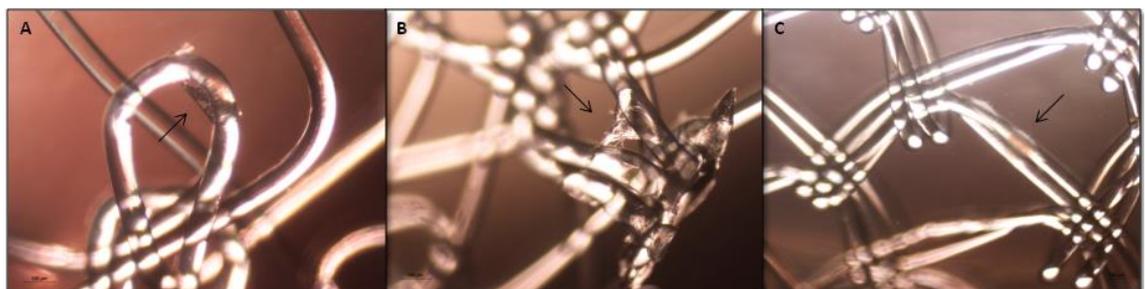


Figura 5 - Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno. (A e B) Aderência de ADSC (seta) em tela microporosa, em aumento de 40X. (C) Aderência de ADSC (seta) em tela macroporosa, em aumento de 40X.

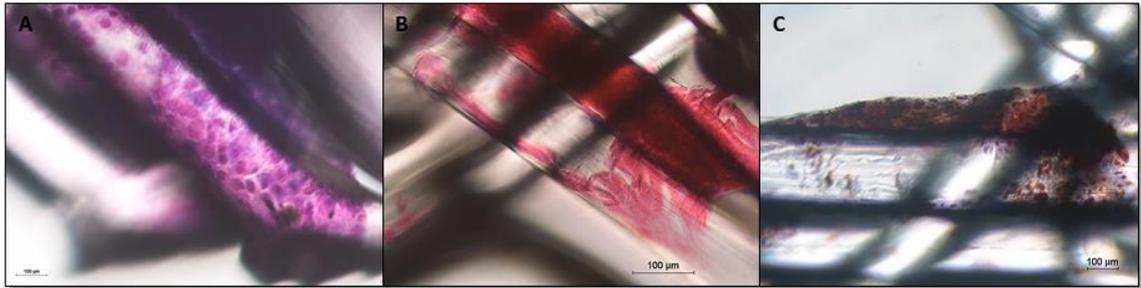


Figura 6 - Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno, em aumento de 200X (A) Coloração de Panótico; (B) Coloração de HE; (C) Imuno-histoquímica com anticorpo anti CD29/integrina.

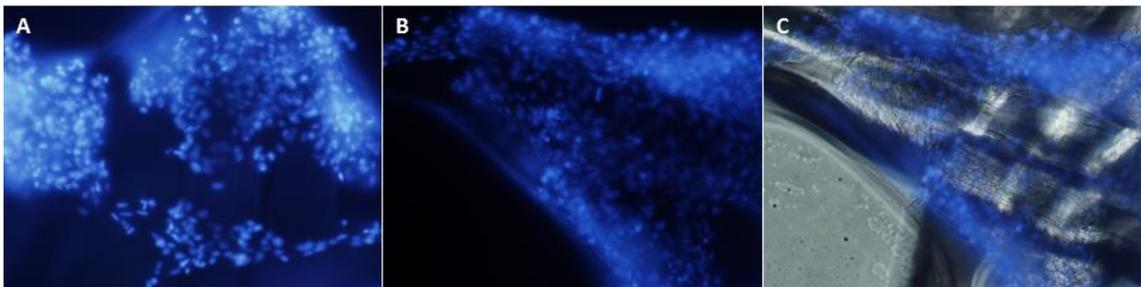


Figura 7 - Microscopia de fluorescência das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI. (A) ADSC aderidas em tela macroporosa, em aumento de 100X; (B e C) ADSC aderidas em tela microporosa, em aumento de 100X.

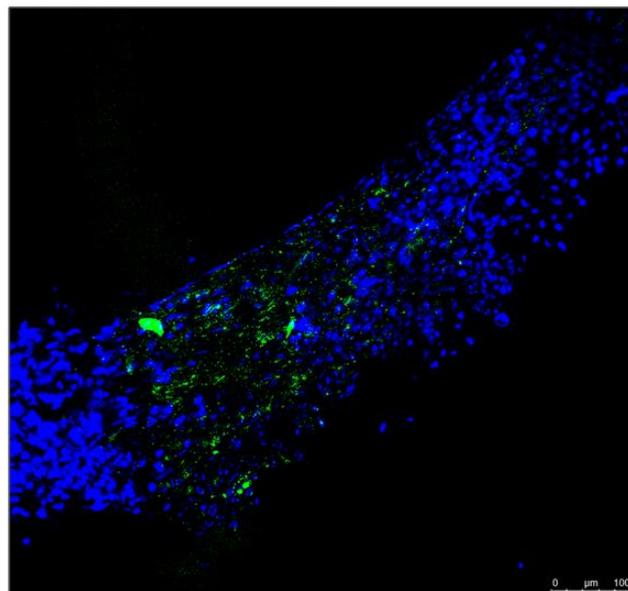


Figura 8 - Microscopia confocal das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI e GFP+, em aumento de 200X.



Figura 9 - Microscopia de fluorescência das ADSC aderidas em tela de polipropileno, em aumento de 100X. (A) Marcação nuclear de DAPI; (B) Expressão celular GFP+; (C) Marcação com anticorpo primário anti-actina e secundário anti-IgG conjugado à R-fitoeritrin.

4.1.7. Discussão

Neste estudo foi demonstrada a viabilidade da incorporação das ADSC em dois tipos de telas de polipropileno (macroporosa e microporosa) para utilização em engenharia de tecidos.

Optou-se em utilizar a tela de polipropileno devido às suas propriedades físico-químicas, como: baixa densidade, alta tenacidade, elevada resistência à abrasão e a ácidos e álcalis. Com isso, o polipropileno possui superioridade em relação aos outros materiais aloplásticos, como o poliéster e o politetrafluoroetileno (KAPISCHKE et al., 2005). Também é o material mais utilizado nas cirurgias de restauração de hérnias em razão de seu baixo custo, não biodegradabilidade e extensa incorporação tecidual (HUBER et al., 2012). A fixação térmica da tela permite uma estabilidade bidimensional do material, sua forma plana é essencial para utilização como implante médico (KAPISCHKE et al., 2005).

Outras características da tela de polipropileno que nos permitiu realizar este estudo é fato de ser tecida com fio monofilamentar e ser entremeadada por poros, possuindo uma superfície áspera que permite a infiltração de fibroblastos, colágeno, células-tronco e o crescimento interno de tecido após a implantação em seres humanos (VAZ et al., 2009; DOLCE et al., 2010).

Assim, a tela de polipropileno possui características de arcabouço a ser utilizado na engenharia de tecidos, pois o arcabouço deve fornecer uma estrutura sólida para o crescimento e a diferenciação de células aderentes no sítio, permitindo a fixação e a migração celular. (SHARMA & ELISSEFF, 2004; MOREAU et al., 2007). Também deve ser biocompatível, deve fornecer uma plataforma na qual as células possam se

aderir e proliferar, ter uma estabilidade mecânica suficiente e ser fácil de fabricar, esterilizar e manipular no sítio da cirurgia (MOREAU et al., 2007). Além disso, é desejável a interconectividade entre os poros para a semeadura uniforme de células e distribuição e difusão de nutrientes (LIU & MA, 2004; LIAO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

A escolha por utilizar MSC foi pelo fato de que a terapia com essas células tem ganhado muito atenção atualmente, não somente pelo fácil isolamento e cultivo, mas pelo seu potencial de aderência em plástico, e também, pela sua capacidade de diferenciação e produção de fatores de crescimento e citocinas (PEREIRA et al., 2008; AMORIN et al., 2012; MAXSON et al., 2012; HASSAN et al., 2014).

Dolce e colaboradores (2010) relataram o primeiro estudo sobre a incorporação de MSC em três tipos de protéticos: polipropileno (Marlex), poliglactina 910 (Vicryl) e poliglecaprone juntamente com polipropileno (Ultrapro). Esses pesquisadores demonstraram que tal incorporação varia dependendo do tipo de tela. A tela que obteve maior aderência celular foi o Vicryl, seguida da tela de polipropileno e, a tela Ultrapro obteve um número baixo de células aderidas. Uma das relações notadas por estes pesquisadores sobre a quantidade de MSC aderidas pode ser devido o tamanho do poro de cada tela. O protético Vicryl era o que possuía menor poro dentre os três, em média de 0,5mm, seguido do Marlex (1 a 2mm) e Ultrapro (3 a 4mm). Este dado confere com o que foi encontrado em nosso estudo, já que a tela de polipropileno microporosa (0,09 a 0,6mm) obteve maior número de células aderidas comparada com a tela macroporosa (1,1 a 1,3mm).

Em outro estudo que utilizou telas de polipropileno, foi demonstrada a viabilidade da aderência de fibroblastos humanos nessas telas. Este trabalho demonstrou a aderência dos fibroblastos de forma irregular nas telas de polipropileno observada pela expressão do Ki67 quando comparado com o cultivo dessas células em placas de cultura de poliestireno, ressaltando que estas placas são tratadas para uma melhor aderência celular e as telas de polipropileno não possuem propriedades especiais de cultivo (KAPISCHKE et al., 2005). Nós observamos os mesmos resultados; as MSC se aderiram mais nas placas de cultura e se fixaram de forma focal nas telas, não formando uma aderência homogênea em toda a tela, conforme dados obtidos com as colorações de HE, panótico, DAPI, imuno-histoquímica e imunofluorescência. Mesmo utilizando o revestimento de metacrilato sobre as placas de cultura para as células não se aderirem nestas, não houve maior número de células sobre as telas, as ADSC aderiram menos nas

telas quando comparadas com placas de cultivo convencionais. Acredita-se que os fatores de crescimento das ADSC aderidas sobre as placas podem ter influenciado no crescimento celular sobre a tela.

Um exemplo de melhoramento do cultivo de arcabouço com células ocorreu com o polímero PLGA (poli- lático-co-glicólico). Kay e colaboradores (2002) mostraram que o polímero PLGA é hidrofóbico, assim, limitando a adesão e proliferação de osteoblastos e condrócitos. Entretanto, estudos mais recentes têm modificado quimicamente o polímero PLGA com tratamento com NaOH para melhorar a adesão celular (PARK et al., 2005), ou utilização de fatores de crescimento associados ao polímero para promover a proliferação e diferenciação celular (LIU et al., 2007).

4.1.8. Conclusão

Os resultados obtidos demonstram que as ADSC podem se aderirem com sucesso em tela de polipropileno, sendo, a tela microporosa, cultivada durante sete dias em placas de cultura convencionais, o melhor resultado encontrado neste estudo. Portanto, a tela de polipropileno oferece um bom arcabouço para as ADSC se aderirem podendo ser utilizada na engenharia de tecidos. No entanto, mais estudos são necessários para melhor entender os fatores que aumentam ou inibem o crescimento de células-tronco em próteses e se esse crescimento pode ser induzido ou conduzido por outras formas de cultivo, uso de fatores de crescimento ou técnicas que melhorem a adesão das células nas telas.

4.1.9. Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

4.1.10. Referências

AHMED, T.A.; HINCKE, M.T. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. **Tissue Engineering Part B Reviews**, v.16, n.3, p.305-329, 2010.

AMORIN, B.; VALIM, V.S.; LEMOS, N.E.; JÚNIOR, L.M.; SILVA, A.M.P.; SILVA, M.A.L.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71–81, 2012.

ARAÚJO, U. R. M. F.; CZECZKO, N. G.; DEALLARMI, A.; HEMOVISKI, F. E.; ARAÚJO, H. V. C. P. Escolha do material da tela para disposição intraperitoneal na correção cirúrgica de defeitos herniários da parede abdominal. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v.23, n.2, p.118-121, 2010.

BELOTI, M.M.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA A.L. Engenharia de tecido ósseo em odontologia. *Revista ABO Nacional*, v.19, n.1, p.164-168, 2011.

DOLCE, C.J.; STEFANIDIS, D.; KELLER, J.E.; WALTERS, K.C.; NEWCOMB, W.L.; HEATH, J.J. et al.. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. **Surgical Endoscopy**, v.24, p.2687-2693, 2010.

GAO, W.; QIAO, X.; MA, S.; CUI, L. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.15, n.12, p.2575–2585, 2011.

GEBLER, A., ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, v.18, n.2, p.128–34, 2012.

HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.22, n.3, p.313–25, 2014.

HUBER, A.; BORUCH, A. V.; NIEPONICE, A.; JIANG, H.; MEDBERRY, C.; BADYLAK, S. F. Histopathologic host response to polypropylene-based surgical mesh materials in a rat abdominal wall defect model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.100, n.3, p.709-717, 2012.

KAPISCHKE, M.; PRINZ, K.; TEPEL, J.; TENSFELDT, J.; SCHULZ, T. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts. **Surgery Endoscopy**, v.19, p.791–797, 2005.

KAY, S.; THAPA, A.; HABERSTROH, K.M.; WEBSTER, T.J. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. **Tissue Engineering**, v.8, p.753–761, 2002.

KOH, C.J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine, **Journal of the American Society Nephrology**, v.15, p.1113–1125, 2004.

LIAO, S.; LI, B.; MA, Z.; WEI, H.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. **Biomedical Material**, v.1, p.45–53, 2006.

LIU, H.W.; CHEN, C.H.; TSAI, C.L.; LIN, I.H.; HSIUE, G.H. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis. **Tissue Engineering**, v.13, p.1113–1124, 2007.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.477, 2004.

MAXSON, S.; LOPEZ, E.A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; LEROUX, M.A. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem cells translational medicine**, v.1, n.2, p.142–49, 2012.

MOREAU, J.L.; JOHN F. CACCAMESE, J.F.; COLETTI, D.P.; SAUK, J.J.; FISHER, J.P. Tissue engineering solutions for cleft palates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, p.2503-2511, 2007.

PARK, G.E.; PATTISON, M.A.; PARK, K.; WEBSTER, T.J. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. **Biomaterials**, v.26, p.3075–3082, 2005.

PEREIRA, I.S.O. et al. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL - Técnica em otorrinolaringologia**, v.26, p.11-16, 2008.

SEGUNDO, A.V.L.; VASCONCELOS, B.C.E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Revista Ciências Médica**, v.16, n.1, p.23-30, 2007.

SHARMA, B.; ELISSEEFF, J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.148, 2004.

VAZ, M.; KREBS, R. K.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. Fibroplasia after polypropylene mesh implantation for abdominal wall hernia repair in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.1, p.19-25, 2009.

ZHANG, X.; REAGAN, M.R., KAPLAN, D.L. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.988–1006, 2009.

4.2. ARTIGO 2 - CORREÇÃO DE FENDA PALATINA COM REVESTIMENTO DE TELA DE POLIPROPILENO ASSOCIADA COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE TECIDO ADIPOSEO E SELANTE DE FIBRINA

CLEFT PALATE CORRECTION WITH POLYPROPYLENE MESH ASSOCIATE WITH ADIPOSE DERIVED STEM CELL AND FIBRIN SEALANT

4.2.1. Resumo

As fissuras palatinas são problemas frequentes na rotina hospitalar em humanos assim como nos animais. Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, entretanto, não possuem uma eficácia satisfatória em todos os casos cirúrgicos. Através do exposto acima, buscam-se novas alternativas para a reconstrução de fendas palatinas, sendo a engenharia de tecidos uma alternativa de tratamento para a referida afecção. Este estudo possui a finalidade de avaliar a utilização da tela de polipropileno acrescida com MSC e selante de fibrina em um modelo experimental de correção de fenda palatina em suínos, avaliando-se a cicatrização de tecido mucoso e ósseo do palato duro. Com isso, objetiva-se desenvolver uma nova técnica de reconstrução de fendas palatinas baseada na engenharia de tecidos. Foram utilizados 12 suínos, distribuídos em quatro grupos de igual número: grupo que utilizou somente tela de polipropileno (GT); tela de polipropileno associada com ADSC e selante de fibrina (GTCF); tela de polipropileno e ADSC (GTC); tela de polipropileno e selante de fibrina (GTF). Em todos os animais foi realizada a fenda palatina e colocação do enxerto conforme cada grupo. Os suínos foram avaliados quanto à presença de inflamação, cicatrização e deiscência de sutura no implante do palato. Após quinze dias os animais foram eutanasiados e os palatos avaliados por histologia pela coloração de HE e Picrosirius Red. A tela de polipropileno associada com MSC demonstrou ser o melhor protótipo, entre os demais estudados neste trabalho, para correção de fenda palatina. Forneceu completa cicatrização óssea e da mucosa oral e nasal em um período de quinze dias, demonstrando ser uma nova técnica segura e eficaz, possuindo um potencial significativo para correção de fenda palatina.

Palavras-chave: fenda palatina, tela de polipropileno, células-tronco mesenquimais, engenharia de tecidos.

4.2.2. Abstract

Cleft palates are common problems in the hospital routine in humans and animals. In recent decades, different surgical techniques were employed for the correction of palatal defects, however, do not have a satisfactory efficacy in are cases. Through the above, seek new alternatives for the reconstruction of cleft palates, and tissue engineering an alternative treatment for this condition. This study has the purpose of evaluating the use of enhanced polypropylene mesh with MSC and fibrin sealant in an experimental model of cleft palate repair in pigs, assessing the healing of mucosal tissue and bone of the hard palate. Thus, the objective is to develop a new technique for reconstruction of cleft palates based on tissue engineering. Twelve pigs were randomly divided into four equal groups: group only used polypropylene mesh (GT); polypropylene mesh associated with MSC and fibrin sealant (GTCF); polypropylene mesh associated with MSC (GTC); polypropylene mesh and fibrin sealant (GTF). In all animals was performed cleft palate and graft placement as each group. The pigs were evaluated for the presence of inflammation, scarring and wound dehiscence in the palatal implant. After fifteen days the animals were euthanized and palates evaluated by histology by HE staining and Sirius Red. The polypropylene mesh associated with MSC proved to be the best prototype, among others studied in this work, to cleft palate correction. Provided complete bone healing and oral and nasal mucosa in a period of fifteen days, proving to be a new safe and effective technique, having a significant potential for cleft palate correction.

Key words: cleft palate, polypropylene mesh, mesenchymal stem cell, tissue engineering.

4.2.3. Introdução

O palato é uma estrutura localizada na porção dorsal da cavidade oral, sendo responsável pela sua separação da cavidade nasal e orofaríngea (ROBERTSON, 1996; SILVA et al., 2006). Quando ocorre falha na fusão das cristas palatinas, podendo ser congênicas ou adquiridas, resulta na fenda palatina (NEVILLE et al., 2011). Em

humanos, as fissuras palatinas são problemas médico-odonto-sociais que se situam entre o 3º e 4º defeito congênito mais frequente (FIGUEIREDO et al., 2004; SILVA et al., 2008). Em pequenos animais, defeitos congênitos ou adquiridos do palato duro e/ou mole também são comuns na prática veterinária, nos quais, muitas vezes, se faz necessária a correção cirúrgica. As principais causas dos defeitos palatinos são: fator congênito, de origem traumática, infecções crônicas, odontopatias, neoplasias e complicações da cirurgia ou terapia de radiação (COOK & THOMSON, 2014).

A maioria dos defeitos no palato, só pode ser corrigida cirurgicamente (SILVA et al., 2006). Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, fazendo-se uso de flapes mucosos, enxertos, uso de próteses e biomembranas (SILVA & MANISCALCO, 2013). Entretanto, apesar dos tratamentos atuais envolverem técnicas cirúrgicas bem descritas, a maioria delas rotacionam o tecido mole adjacente ao local do defeito e, em algumas técnicas, adicionam o enxerto de tecido duro autógeno ou alógeno, não possuindo uma eficácia satisfatória (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011).

Através do exposto acima, buscam-se novas alternativas para a reconstrução de fendas palatinas. Neste cenário, a engenharia de tecidos poderia ser uma alternativa de tratamento para tal afecção. A engenharia de tecidos visa restaurar a função ou substituir tecidos danificados através da aplicação celular, confecção de arcabouços e utilização de moléculas que estimulem o tecido, neste caso tecido mole e ósseo (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011).

As células-tronco mesenquimais (MSC) são boas candidatas para as terapias de engenharia de tecidos, pois são uns dos tipos celulares que são recrutados pelo corpo para a reparação de tecidos lesionados (MOREAU et al., 2007). As MSC secretam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que permitem a migração e a expansão celular, exercem atividades imunomoduladoras, modulam a angiogênese e a apoptose, além de possuírem o potencial de diferenciação celular, assim melhorando a cicatrização (GEBLER et al., 2012; GAO et al., 2014).

O arcabouço deve ser um dispositivo estrutural que além de definir a geometria do tecido substituído, forneça sinais para a promoção da regeneração tecidual (AHMED & HINCKE, 2010). O arcabouço deve fornecer uma estrutura sólida para o crescimento e a diferenciação celular no sítio, permitindo a fixação e a migração celular (SHARMA & ELISSEEFF, 2004; MOREAU et al., 2007). Também deve ser biocompatível, deve fornecer uma plataforma na qual as células possam se aderir e proliferar, ter uma

estabilidade mecânica suficiente e ser fácil de fabricar, esterilizar e manipular no sítio da cirurgia (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005; MOREAU et al., 2007). Além disso, é desejável a interconectividade entre os poros para a semeadura uniforme de células e distribuição e difusão de nutrientes bem como, a remoção de metabólitos (LIU & MA, 2004; LIAO et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

A tela de polipropileno é o material mais utilizado nas cirurgias de restauração de hérnias em razão de seu baixo custo, não biodegradabilidade e extensa incorporação tecidual (HUBER et al., 2012). É tecida com fio monofilamentar e entremeada por poros, possuindo uma superfície áspera que permite não apenas a infiltração de fibroblastos, mas também a produção de colágeno (VAZ et al., 2009; ARAÚJO et al., 2010). Possui facilidade de adaptação no sítio receptor devido à sua maleabilidade. O entrelaçamento em forma de malha permite a imbricação de tecidos em seus espaços (SILVA, 2009). Assim, a tela de polipropileno associada às MSC proporciona um arcabouço mais funcional para estas células, sendo capaz de estimular o crescimento de fibroblastos, deposição de colágeno, neovascularização e estabelecimento de defesas naturais do hospedeiro (DOLCE et al., 2010).

Este estudo possui a finalidade de avaliar a utilização da tela de polipropileno microporosa (0,09 a 0,6mm) acrescida com MSC e selante de fibrina em um modelo experimental de correção de fenda palatina em suínos, avaliando-se a cicatrização de tecido mucoso e ósseo do palato duro. Com isso, objetiva-se verificar a eficácia de uma nova técnica de reconstrução de fendas palatinas baseada na engenharia de tecidos.

4.2.4. Materiais e Métodos

Foram utilizados 13 suínos mestiços (*Sus scrofa domestica*), do sexo feminino, com 34 a 36 dias de vida. De um animal coletou-se tecido adiposo abdominal para obtenção das células-tronco de origem adiposa (ADSC) e, os outros doze, foram utilizados para confecção e correção de fenda palatina. Os doze suínos foram divididos em quatro grupos de três animais, que foram nomeados de acordo com a correção da fenda palatina: tela de polipropileno (GT); tela de polipropileno e ADSC (GTC); tela de polipropileno e selante de fibrina (GTF); e tela de polipropileno, ADSC e selante de fibrina (GTCF).

Todos os animais foram mantidos e manipulados segundo normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e da Comissão de Ética no Uso de Animais, com base na Lei nº. 11.794, de 8 de Outubro de 2008. Este estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde está cadastrado sob o protocolo 15-390.

Coleta do Tecido Adiposo

O suíno foi pré-medicado com cloridrato de petidina²⁰ (5mg/kg), midazolam²¹ (0,5mg/kg) e quetamina²² (15mg/kg) por via intramuscular (IM), induzido com propofol para a realização da intubação orotraqueal e sua manutenção foi realizada com isoflurano²³ e oxigênio 100%. O animal foi posicionado em decúbito dorsal e, após antisepsia, realizou-se a coleta do tecido adiposo da região abdominal e a síntese do subcutâneo e da pele. Finalizado o procedimento cirúrgico, o suíno foi eutanasiado com sobre dosagem anestésica.

Isolamento, expansão e caracterização das ADSC

O tecido adiposo foi processado em capela de fluxo laminar, sendo digerido em solução de collagenase tipo I (1mg/mL) e incubado em banho-maria por 40 minutos, com agitação a cada 10 minutos. A suspensão celular obtida foi centrifugada e posteriormente semeada em placas de seis poços com meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)²⁴ suplementado com HEPES 9mM, 1% de solução antibiótica de penicilina e estreptomicina, e 20% de soro fetal bovino²⁵ (SFB), sendo mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Transcorridas 24 horas de cultivo, o meio de cultivo foi aspirado e meio fresco foi adicionado. Quando a cultura celular apresentou confluência aproximada de 80%, as células aderentes foram removidas com solução de tripsina-EDTA 0,05%²⁶ para posterior subcultivo em DMEM suplementado com 20% SFB (meio completo). Atingindo-se a quarta passagem, as células foram caracterizadas de acordo com as normas da *International Society for Cell Transplantation*, realizando-

²⁰ Cloridrato de Petidina, União Química, São Paulo – SP, Brasil.

²¹ Dormonid, Roche, São Paulo – SP, Brasil.

²² Cetamin 10%, Syntec do Brasil, Cotia – SP, Brasil.

²³ Isoforine, Cristália, Itapira – SP, Brasil.

²⁴ Dulbecco's modified Eagle's medium, Invitrogen – CA, USA.

²⁵ Soro Fetal Bovino, Invitrogen – CA, USA.

²⁶ Tripsina, Gibco – NM, USA.

se o ensaio de indução de diferenciação *in vitro* nas linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica.

Cultura celular sobre a tela

Após a caracterização das ADSC na quarta passagem, estas foram plaqueadas em telas de polipropileno microporosa²⁷ de 0,75x1,0cm de tamanho e cultivadas em placas de seis poços durante sete dias. Foram utilizadas 1×10^5 ADSC e 1000 μ L de meio de cultivo DMEM suplementado com 1% de antibiótico e 20% de SFB, sendo mantida em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. O meio de cultivo era trocado a cada três dias. Para verificar o número de ADSC aderidas na tela, realizou-se a contagem em Câmara de Neubauer, em triplicata, seguindo o seguinte protocolo: retirou-se a malha do poço e colocou-a em uma nova placa, adicionou-se 200 μ L de tripsina-EDTA 0,05% durante 1 minuto em temperatura ambiente. Após, acrescentou-se 1mL de meio de cultivo fresco, aspirou-se todo o conteúdo, inclusive a tela, colocando em um tubo de centrifugação. Depois de centrifugar em 2000 RPM durante cinco minutos, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de meio de cultivo ressuspendendo o *pellet* formado pelas células. Aspirou-se 20 μ L e contou-se em Câmara de Neubauer em microscópio óptico²⁸ com objetiva de 10X.

Ensaio de MTT

Para confirmar o número de células aderidas nas telas, realizou-se uma curva de crescimento através da atividade mitocondrial avaliada pelo ensaio de MTT²⁹ (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazólio) com quantidades conhecidas de ADSC. Sete diferentes concentrações de células foram plaqueadas em placas de 24 poços (5×10^3 ; 1×10^4 ; $2,5 \times 10^4$; 5×10^4 ; 1×10^5 ; 5×10^5 ; 1×10^6), acrescido de 1mL de meio de cultivo completo. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ durante 12 horas. Cento e onze microlitros de MTT foram adicionados em cada poço sendo as placas, envoltas por papel alumínio, reincubadas por mais quatro horas. Removido o meio de cultivo com MTT, acrescentou-se 300 μ L de DMSO (dimetilsulfóxido) que ficou agindo por 30 minutos com leve agitação a cada três minutos. Colocou-se 100 μ L

²⁷ IntraCorp, Venkuri.

²⁸ Nikon Eclipse

²⁹ Sigma (M2128).

dessa solução em uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em espectrofotômetro³⁰ com absorvância de 550nm. A leitura da densidade óptica foi, então, representada graficamente em função do número de células para obter a curva de crescimento baseada na atividade mitocondrial.

Para realizar o ensaio de MTT na tela em cultivo com as ADSC, foram removidas as células aderidas nas malhas utilizando-se o mesmo procedimento descrito para a contagem em Câmara de Neubauer. E para obter a leitura da densidade óptica, foi realizado o mesmo procedimento descrito para a realização da curva de crescimento, todos em triplicata.

DAPI

A coloração nuclear de DAPI³¹ (4,6-diamidino-2-fenilindol) foi utilizada para ajudar a visualizar e destacar as células aderidas nas telas de polipropileno. Para tanto, as telas foram removidas para uma nova placa e lavadas com PBS. Adicionaram-se duas gotas de DAPI, cobriu-se a placa com papel alumínio e deixou-se agir durante 20 minutos. Após, lavou-se duas vezes com PBS e realizou-se a leitura em microscópio confocal³².

Colorações de Panótico

A coloração de Panótico³³ foi realizada diretamente na tela para visualizar as ADSC aderidas. Primeiramente, lavou-se a tela com PBS e em seguida utilizaram-se os seguintes reagentes, na ordem em que seguem: solução de triarilmetano a 0,1%, solução de xantenos a 0,1% e solução de tiazinas a 0,1%. Cada tela ficou submersa durante cinco segundos em cada solução e após foram lavadas com água e visualizadas em microscópio óptico³⁴.

Confecção e correção das fendas palatinas

Os suínos foram pré-medicados com cloridrato de petidina (5mg/kg)³⁵, midazolam (0,5mg/kg) e quetamina (15mg/kg) IM. Procedeu-se a indução anestésica com propofol para a intubação orotraqueal, e foram mantidos com isoflurano

³⁰ Spectramax M3 software Pro 6.22.

³¹ Sigma (F6057).

³² Leica.

³³ Kit Panótico Rápido LB Laborclin.

³⁴ Nikon Eclipse.

³⁵ Cloridrato de Petidina, União Química, São Paulo – SP, Brasil.

vaporizado em oxigênio a 100%. Após antissepsia da mucosa oral com solução de clorexidina a 0,2%, realizou-se a confecção da fenda palatina no tamanho de 0,5x0,7cm com bisturi ultrassônico³⁶ no mucoperiósteo na rafe palatina (Fig. 1A). A fenda palatina foi corrigida com tela de polipropileno de 0,7x1,0cm, sendo suas bordas inseridas embaixo da mucosa e suturadas no mucoperiósteo com ponto isolado simples com fio de mononáilon 4-0 (Fig. 1B). Nos grupos GTC e GTCF, as telas de polipropileno estavam com as ADSC previamente cultivadas e aderidas. Nos grupos GTF e GTCF, após a sutura da tela, esta foi recoberta com selante de fibrina³⁷.

No pós-operatório os animais foram medicados com cloridrato de tramadol (3mg/kg) BID, durante três dias; amoxicilina com clavulanato (15mg/kg) e metronidazol (10mg/kg) BID, durante cinco dias.

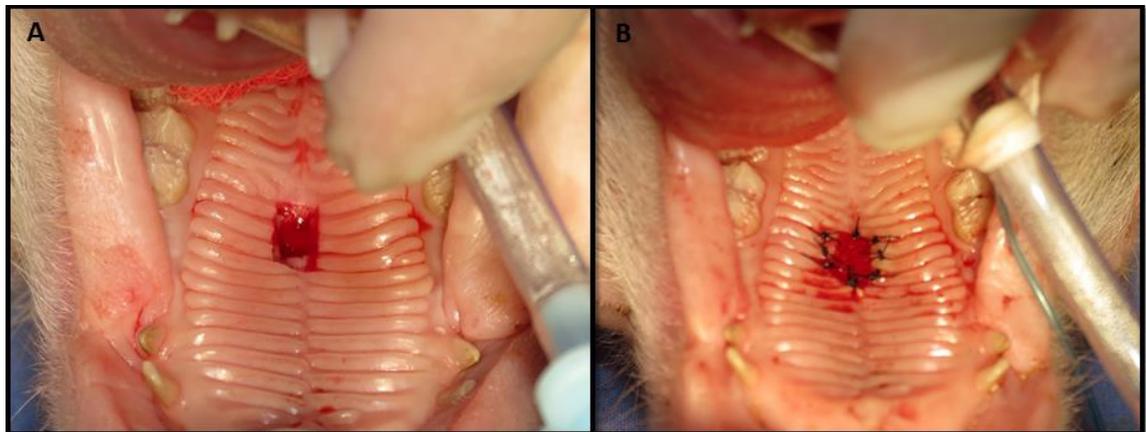


Figura 1 - (A) Confecção de fenda palatina em suíno, remoção da mucosa oral, osso palatino e mucosa nasal. (B) Correção da fenda palatina com tela de polipropileno.

Avaliações

Foram realizadas avaliações até o 15º dia, período no qual houve o fechamento do periósteo de todos os suínos. E, a cada cinco dias, os animais eram sedados para avaliação do implante e palato quanto à presença de inflamação, deiscência de sutura e mensuração do tamanho da cicatrização através de desenhos com filme transparente sobre a reparação da mucosa oral da fenda palatina para a realização da planimetria.

Para calcular a planimetria, as transparências foram digitalizadas e redesenhadas, sempre pelo mesmo observador, utilizando o *software* Image J 1.50g e uma mesa

³⁶ Piezosonic, VK Driller Equipamentos Elétricos Ltda, Jaguaré – SP.

³⁷ Beriplast®P, CSL Behring, Alemanha.

digitalizadora³⁸. Para o cálculo percentual, somente foi considerada a cicatrização da mucosa oral: (Área de cicatrização da mucosa oral/Área total da fenda palatina) x 100. Utilizando as medidas de área total, a taxa de cicatrização da mucosa foi calculada entre os intervalos d0–d5, d5-d10, d10-d15 e d0- d15, conforme a fórmula: (A0-A5)/A0) x 100.

Ao término dos quinze dias do período de avaliação, todos os suínos foram sedados com cetamina e midazolam e eutanasiados com sobre dosagem de propofol e administração de cloreto de potássio. Após confirmação do óbito, os palatos foram coletados. Estes foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 horas e, após, foram descalcificados com ácido nítrico a 10%, processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina e corados pelas técnicas Hematoxilina-Eosina (HE) e Picrosírius Red. O material foi examinado em microscópio óptico³⁹. Os parâmetros morfológicos avaliados nos cortes histológicos de HE foram: integridade da mucosa oral, regeneração do tecido ósseo, presença de fibroblastos na lâmina própria e o grau de inflamação. Essas análises foram realizadas por um patologista, que conferiu escores qualiquantitativos de 0 a 3 no local da fenda palatina, sendo: 0- ausente, 1- discreto, 2- moderado e 3- acentuado. Para a avaliação do osso o critério adotado foi: 0 presença somente de tecido de granulação (sem presença de osso); 1- presença de osso incompleto, 2- presença de osso completo porém imaturo; 3- osso completo e maduro. E para o epitélio da mucosa oral, seguiram-se os seguintes parâmetros: 0- não completo; 1- completo com áreas multifocais ulceradas; 2- completo com poucas áreas de ulcerações; 3- completo.

A coloração de Picrosírius red, analisada sob luz polarizada, teve por objetivo revelar a organização dos feixes de fibras colágenas. As lâminas coradas com o Picrosírius red foram observadas ao microscópio óptico⁴⁰, sob luz polarizada, para determinar a concentração de fibras colágenas do tipo I e do tipo III na área correspondente à cicatriz. As imagens digitalizadas das cicatrizes visualizadas com a lente polarizadora foram submetidas à avaliação pelo programa Image J 1.50g, que reconheceu regiões coradas de cor vermelha alaranjada (colágeno tipo I), calculando a concentração deste subtipo de colágeno na área estudada.

³⁸ Wacom, modelo ET-0405-U - Wacom Company LTDA, Saitama, Japão.

³⁹ Olympus IX71.

⁴⁰ Olympus IX71.

4.2.5. Análise Estatística

Para análise estatística, foi utilizado software IBM SPSS versão 23 (SPSS *Inc. IBM Company*). Para as amostras não paramétricas foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, e para amostras paramétricas foi utilizado ANOVA seguido de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância considerado foi de 5% ($p < 0,05$).

4.2.6. Resultados

A caracterização das ADSC realizada através do ensaio de indução de diferenciação celular *in vitro*, obteve resultado positivo, pois estas foram capazes de se diferenciarem em linhagens condrogênica, osteogênica e adipogênica (Fig. 2).

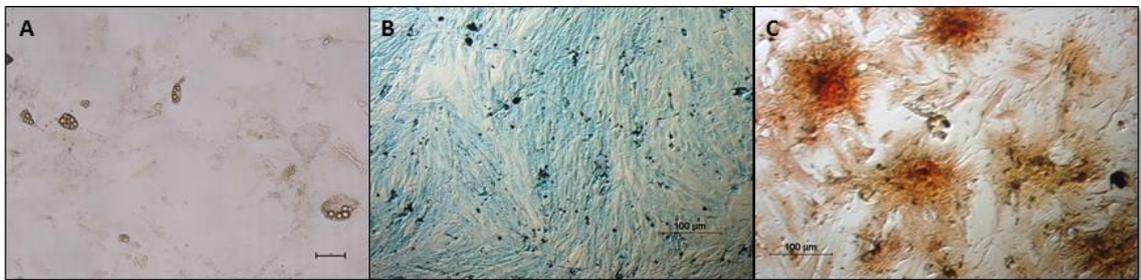


Figura 2 - Caracterização das ADSC obtidas de tecido adiposo de suíno. (A) Diferenciação adipogênica detectada pela coloração Oil Red O, em aumento de 100X; (B) Diferenciação condrogênica detectada pela coloração Alcian Blue, em aumento de 100X; (C) Diferenciação osteogênica detectada pela coloração Vermelho de Alizarin, em aumento de 100X.

A média da contagem na Câmara de Neubauer demonstrou a aderência de $1,1 \times 10^4$ células no sétimo dia de cultivo das ADSC sobre a tela. A curva de crescimento que foi gerada utilizando-se a avaliação da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT obteve resultados semelhantes, assim confirmando os dados (Fig. 3).

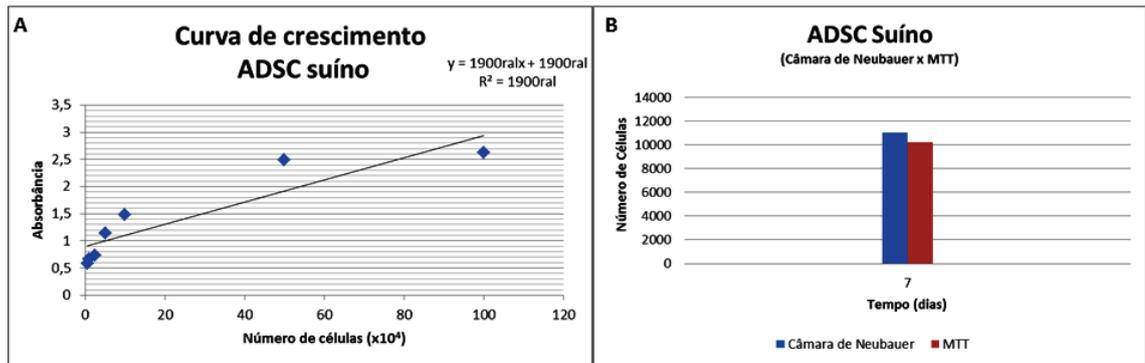


Figura 3 - (A) Curva de crescimento realizada através da atividade mitocondrial pelo ensaio de MTT com quantidades conhecidas de ADSC. **(B)** Contagem na Câmara de Neubauer e pelo teste de MTT das ADSC aderidas na tela de polipropileno no sétimo dia de cultivo celular.

A incorporação bem sucedida das ADSC nas próteses também foi confirmada por microscopia, que permitiu visualizar a aderência e o crescimento celular junto às telas. A coloração de Panótico (Fig. 4), bem como a marcação com DAPI visualizada em microscopia confocal (Fig. 5), permitiram observar melhor as ADSC sobre as telas.

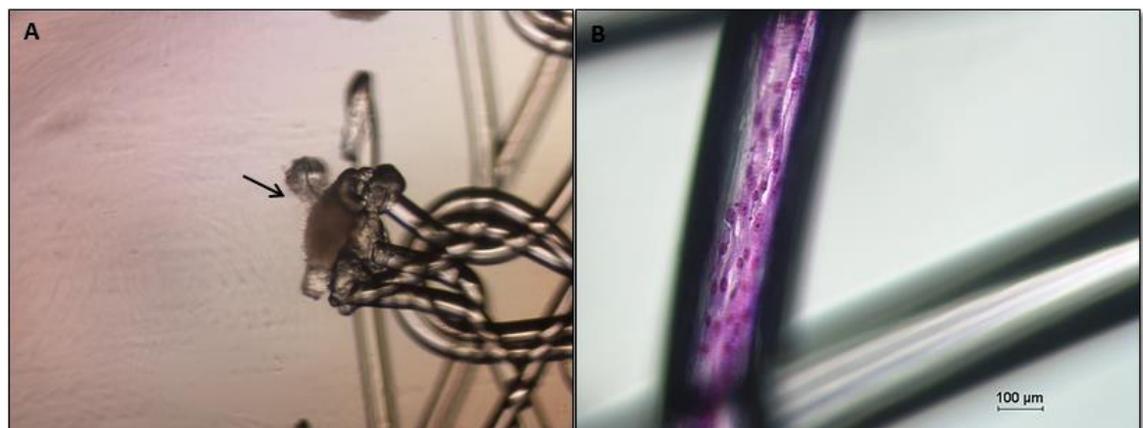


Figura 4 - Microscopia das ADSC aderidas em tela de polipropileno. **(A)** Aderência de ADSC (seta) em tela de polipropileno, em aumento de 40X. **(B)** Coloração de Panótico, em aumento de 200X.

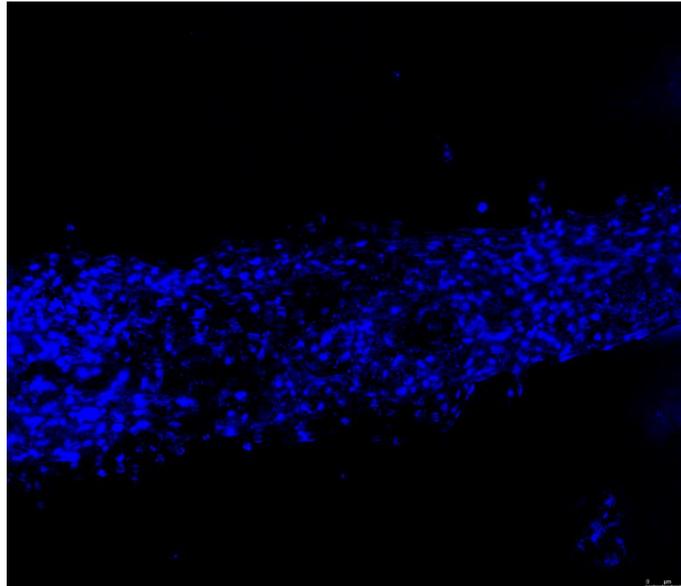


Figura 5 - Microscopia confocal das ADSC aderidas em tela de polipropileno com marcação de DAPI e GFP+, em aumento de 200X.

Durante as avaliações realizadas no palato durante os quinze dias, a mucosa palatina não apresentou infecção ou processo inflamatório exacerbado em nenhum grupo. Observou-se que, no decorrer da cicatrização das fendas palatinas, a tela de polipropileno era expelida conforme o palato cicatrizava.

Na planimetria, verificou-se uma cicatrização mais acelerada da mucosa nos grupos que utilizaram ADSC, entretanto, na análise estatística não houve diferença significativa entre os grupos durante cada período de análise (Tabela 1). Houve diferença estatística significativa quando comparados os dados da planimetria dentro do mesmo grupo no decorrer das avaliações (dias 0, 5, 10 e 15), mostrando um valor de p menor no grupo GTC.

Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) da planimetria entre os grupos durante os dias 5, 10 e 15.

	G.L.	Soma.de.Quadrados	Quadrado.Médio	Estat..F	P.valor
5 dias					
Fator	3	0,05641	0,01880	1,02539	0,43126
Resíduos	8	0,14671	0,01834		
10 dias					
Fator	3	0,00679	0,00226	1,21070	0,36661
Resíduos	8	0,01496	0,00187		
15 dias					
Fator	3	0,00173	0,00057	1,21218	0,36614
Resíduos	8	0,00381	0,00047		

Tabela 2 - Análise de variância (ANOVA) da planimetria dentro do mesmo grupo durante os dias 0, 5, 10 e 15.

	G.L.	Soma.de.Quadrados	Quadrado.Médio	Estat..F	P.valor
GT					
Fator	3	0,19581	0,06527	112,646	0,0000*
Resíduos	8	0,00463	0,00058		
GTF					
Fator	3	0,19367	0,06456	3,2918	0,078978
Resíduos	8	0,15689	0,0196		
GTC					
Fator	3	0,19469	0,06489	589,547	0,0000**
Resíduos	8	0,00088	0,00011		
GTCF					
Fator	3	0,21849	0,07283	62,0291	0,0000***
Resíduos	8	0,00939	0,00117		

*6,97E-07; **1,01E-09; ***6,99E-06

Também nos grupos que receberam a terapia celular, notaram-se mais suínos com uma melhor modelação da cicatriz da ferida palatina em comparação aos demais grupos (Figura 6).

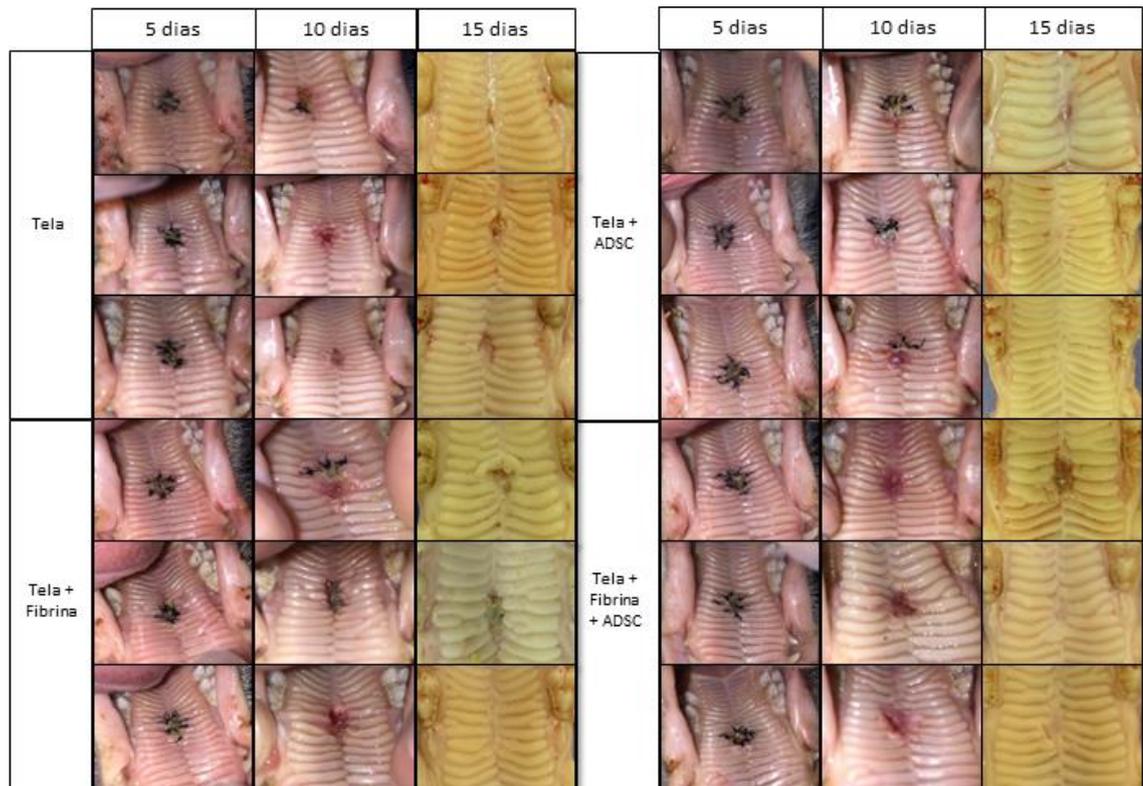


Figura 6 - Cicatrização macroscópica da fenda palatina em suínos nos diferentes grupos de tratamento no decorrer de 15 dias.

Os parâmetros morfológicos avaliados nos cortes histológicos de HE foram: integridade da mucosa oral, regeneração do tecido ósseo, presença de fibroblastos na lâmina própria e o grau de inflamação (Figura 7).

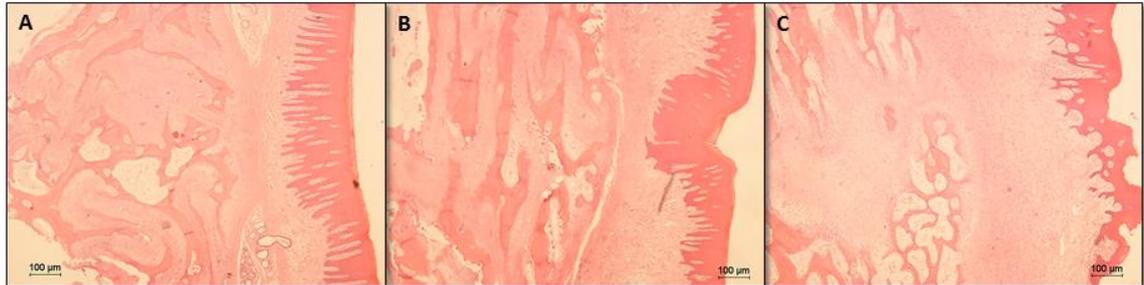


Figura 7 - Fotomicrografias de cortes histológicos da área de cicatrização de fenda palatina de suínos, coradas com HE (40X). (A) Palato normal, sem alterações (controle). (B) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GTC). (C) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GT), nota-se presença de tecido conjuntivo na área óssea.

Na avaliação da regeneração óssea, verificou-se que os animais dos grupos que receberam terapia celular apresentaram formação óssea completa (madura e imatura) em 15 dias após a realização da fenda palatina. Nos demais grupos, também havia presença da regeneração óssea, porém de maneira incompleta ou imatura. A avaliação estatística apresentou diferença significativa entre os grupos, possuindo representação maior no grupo GT contra os grupos GTC e GTCF (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3 - Teste de Kruskal-Wallis para a formação óssea nos diferentes grupos de tratamentos.

Informação	Valor
Kruskal-Wallis qui-quadrado	8,03673
Graus de Liberdade	3
P-valor	0,0452

Tabela 4 - Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para a formação óssea (Simes-Hochberg).

Fatores Comparados	Diferença Observada	Diferença Crítica	Estatística	P-valor
GT - GTC	6,16667	7,76682	2,09471	0,03619
GT - GTCF	6,16667	7,76682	2,09471	0,03619
GT - GTF	1,66667	7,76682	0,56614	0,57129
GTC - GTCF	0	7,76682	0	1
GTC - GTF	4,5	7,76682	1,52857	0,12637
GTCF - GTF	4,5	7,76682	1,52857	0,12637

Tabela 5 - Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para a formação óssea.

Fatores	Médias (Rank)	Grupos
GTC	9,166667	a
GTCF	9,166667	a
GTF	4,666667	b
GT	3	b

Em todos os palatos analisados, independente do grupo pertencente, houve cicatrização completa da mucosa oral. Para o critério inflamação, observou-se que o grupo GTF apresentou um maior grau de inflamação em relação aos demais grupos (Tabela 6 e 7), havendo diferença estatística na comparação desse grupo com o grupo GTC.

Tabela 6 - Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para presença de células inflamatórias (Simes-Hochberg).

Fatores Comparados	Diferença Observada	Diferença Crítica	Estatística	P-valor
GT - GTC	1,66667	7,76682	0,56614	0,57129
GT - GTCF	0	7,76682	0	1
GT - GTF	4,33333	7,76682	1,47196	0,14103
GTC - GTCF	1,66667	7,76682	0,56614	0,57129
GTC - GTF	6	7,76682	2,03809	0,04154
GTCF - GTF	4,33333	7,76682	1,47196	0,14103

Tabela 7 - Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para presença de células inflamatórias.

Fatores	Médias (Rank)	Grupos
GTF	10,166667	a
GT	5,833333	ab
GTCF	5,833333	ab
GTC	4,166667	b

Os grupos que não receberam a terapia celular apresentaram uma quantidade maior de fibroblastos, principalmente o grupo que recebeu selante de fibrina, sendo visualizadas nas tabelas 8 e 9 as comparações entre os grupos.

Tabela 8 - Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos para presença de fibroblastos (Simes-Hochberg).

Fatores Comparados	Diferença Observada	Diferença Crítica	Estatística	P-valor
GT - GTC	4,66667	7,76682	1,58519	0,11292
GT - GTCF	4	7,76682	1,35873	0,17423
GT - GTC	1,33333	7,76682	0,45291	0,65061
GTC - GTCF	0,66667	7,76682	0,22645	0,82084
GTC - GTF	6	7,76682	2,03809	0,04154
GTCF - GTF	5,33333	7,76682	1,81164	0,07004

Tabela 9 – Tabela dos agrupamentos das médias dos diferentes grupos de tratamento para presença de fibroblastos.

Fatores	Médias (Rank)	Grupos
GTF	9,666667	a
GT	8,333333	ab
GTCF	4,333333	b
GTC	3,666667	b

A coloração de Picrosírius Red, analisada sob luz polarizada, demonstrou maior presença de birrefringência de cor vermelha alaranjada do que esverdeada, em todos os palatos analisados, independente do grupo de tratamento. Assim, os locais de cicatrização das fendas palatinas apresentavam maior quantidade de fibras colágenas do tipo I. Entretanto, notou-se uma maior desorganização de ambas as fibras colágenas, tipo I e III, nos grupos que não receberam terapia celular (Figura 8).

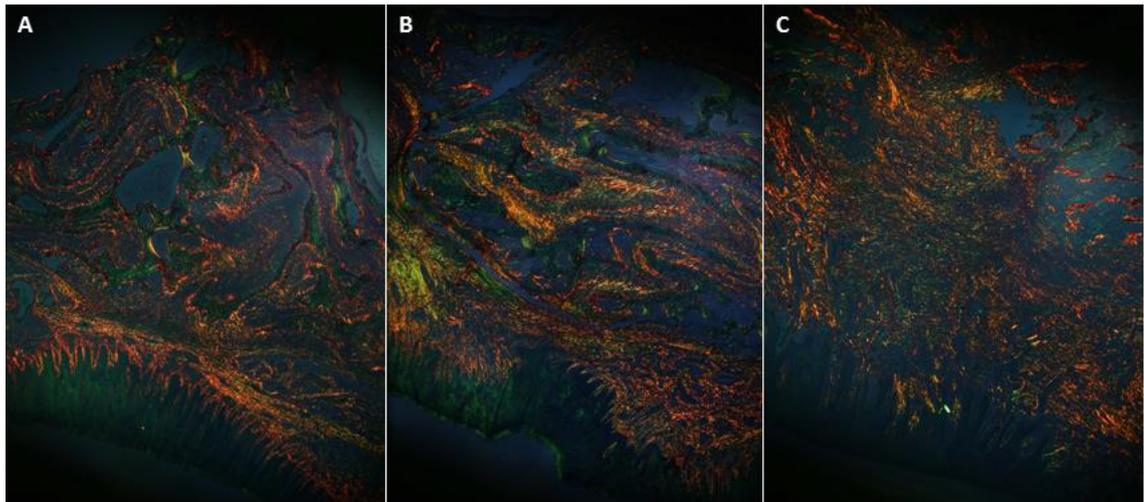


Figura 8 - Fotomicrografias de cortes histológicos da área de cicatrização de fenda palatina de suínos, coradas pelo Picrosirius Red, sob luz polarizada (40X). (A) Palato normal, sem alterações (controle). (B) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GTC). (C) Palato cicatrizado em 15 dias após fenda palatina (GT), nota-se uma desorganização das fibras colágenas tipo I e III.

Na análise estatística da porcentagem da área calculada pelo programa Image J 1.50g, que apresentava as tonalidades vermelhas alaranjadas (colágeno tipo I), não houve diferença significativa (Tabela 10 e 11).

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) da porcentagem da área com tonalidade vermelha alaranjada nos cortes histológicas corados com Picrosirius Red.

	G.L.	Soma.de.Quadrados	Quadrado.Médio	Estat..F	P.valor
Fator	3	18,94086	6,31362	0,98827	0,44572
Resíduos	8	51,10819	6,38852		

Tabela 11 – Comparações múltiplas entre os grupos de tratamentos da porcentagem da área com tonalidade vermelha alaranjada nos cortes histológicas corados com Picrosirius Red (Teste de Tukey).

Níveis	Centro	Limite Inferior	Limite Superior	P-valor
GTC-GT	2,33333	-4,27548	8,94214	0,68243
GTCTF-GT	0,732	-5,87681	7,34081	0,98360
GTF-GT	3,17133	-3,43748	9,78015	0,46131
GTCTF-GTC	-1,60133	-8,21015	5,00748	0,86322
GTF-GTC	0,838	-5,77082	7,44681	0,97587
GTF-GTCTF	2,43933	-4,16948	9,04814	0,65372

4.2.7. Discussão

O objetivo geral dessa pesquisa foi desenvolver uma nova técnica de reconstrução de fendas palatinas baseada na engenharia de tecidos. Nas últimas décadas, diferentes técnicas cirúrgicas foram empregadas para a correção dos defeitos palatinos, fazendo uso de flapes mucosos, enxertos, próteses e biomembranas (SILVA & MANISCALCO, 2013). Entretanto, apesar dos tratamentos atuais para fendas palatinas envolverem técnicas cirúrgicas bem descritas que, em geral, rotacionam o tecido mole adjacente ao local do defeito e adicionam enxerto de tecido duro na fenda, principalmente enxertos ósseos autógenos ou alógenos, percebe-se uma eficiência não satisfatória quando a fenda palatina apresenta um grande defeito ósseo (MOREAU et al., 2007; BELOTI et al., 2011).

Através da visão da engenharia de tecidos, que visa restaurar a função ou substituir tecidos danificados ou doentes através da aplicação dos princípios da engenharia e da biologia, utilizando a seleção e manipulação de células, confecção de matrizes de arcabouços e a utilização de moléculas que estimulem o tecido (SEGUNDO & VASCONCELOS, 2007; BELOTI et al., 2011), surgiu o interesse de pesquisar o uso da tela de polipropileno servindo como arcabouço para o crescimento de células, no caso ADSC, para agirem juntos na cicatrização de fendas palatinas. O arcabouço, além de manter as ADSC previamente cultivadas, também serve de arcabouço para as células da mucosa oral e óssea se proliferar e unir as duas bordas da ferida.

Optou-se pela tela de polipropileno por conferir baixa reação tecidual pelo hospedeiro, permitir maleabilidade pela sua tecelagem deixar espaços que permitem o crescimento de tecidos, como fibroblastos, colágeno e células-tronco, em seu interior (SILVA, 2009; DOLCE, et al., 2010; ARAÚJO et al., 2010). Também pelo fato do material utilizado ser de polipropileno, ou seja, não absorvível, permitindo a deposição de tecido fibroso, que permanecerá por tempo indeterminado nesse local, garantindo a barreira mecânica (ARAÚJO et al., 2010). Por fim, cabe ressaltar, que no manuscrito anterior (Estudo *in vitro* sobre a associação de *scaffolds* de polipropileno e células-tronco mesenquimais para uso em engenharia de tecidos), a tela de polipropileno demonstrou ser um arcabouço satisfatório para cultivo e aderência das MSC.

Durante os quinze dias de avaliação não houve contaminação das feridas palatinas, mesmo a boca sendo um ambiente contaminado. Considerou-se um fator que determinou a ausência de infecção nas fendas palatinas o fato da tela de polipropileno

possuir baixo potencial de aderência bacteriana, permitindo seu uso em sítios infectados (SHESTAK et al., 2000; YOSHINO et al., 2006), aceitando total incorporação do tecido de granulação (ARAÚJO et al., 2010).

Também constatou-se que no decorrer da cicatrização, as telas foram sendo expelidas naturalmente, em todos os grupos de tratamento. Esta situação verificada demonstrou um evento diferente que ocorre quando estas telas são utilizadas em correção de hérnias, pois estão associadas à alta ocorrência de aderências peritoneais e fístulas secundárias (SAHIN et al., 2007).

A opção por utilizar as MSC decorreu em razão de essas células ajudarem a promover a cicatrização, não somente do tecido ósseo como, também, da mucosa. Observou-se que nos grupos que receberam terapia celular houve crescimento total da região óssea do palato. Em relação à lâmina própria, verificou-se que a cicatrização foi mais organizada deixando um aspecto mais estético quando comparado com os grupos que não receberam terapia celular. Pois, na visualização macroscópica, os grupos que receberam células eram visíveis a cicatrização completa da mucosa oral (inclusive o epitélio), o que não era nítido em alguns suínos dos grupos que não receberam células. Entretanto na análise histológica, todos os suínos apresentaram cicatrização completa de todas as camadas palatinas. Além de que a cicatrização da mucosa da fenda palatina, visualizada macroscopicamente e mensurada através da planimetria, foi mais rápida nos grupos que receberam MSC.

A causa para estes resultados observados, decorre do fato de acreditar-se que as MSC atuem na cicatrização através de sinalização parácrina e por diferenciação. A primeira mostra a capacidade de secretar vários fatores de crescimento e citocinas que são relevantes para o reparo ou regeneração tecidual. Pode ser que após a migração para a ferida, elas sejam ativadas ao encontrar o meio repleto de substâncias pró-inflamatórias. A ativação das MSC poderia potencializar a ação como pequenos “biorreatores” no microambiente da ferida secretando fatores de crescimento e citocinas. A segunda possibilidade estaria relacionada com a enorme plasticidade e habilidade que essas células têm para se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares e se integrar aos tecidos (KIM et al., 2009; SORRELL & CAPLAN, 2010; WU et al., 2010; HASSAN et al., 2014).

O fato de ter ocorrido crescimento ósseo neste modelo de correção de fenda palatina, fornece uma expectativa para abordar fendas que possuem uma grande perda óssea. Visto que, atualmente a utilização de transplante ósseo autólogo é a primeira

escolha para procedimentos de enxerto para reparar uma fenda palatina. Enxertos deste tipo proporcionam um alto potencial osteogênico, assim formando um novo tecido ósseo (LOGEART-AVRAMOGLOU et al., 2005; BUENO et al., 2009). No entanto, a morbidade do sítio doador, a limitada quantidade de áreas doadoras, a reabsorção do enxerto, além de que os procedimentos podem provocar dor no local doador e podem levar a complicações anatómicas e funcionais, devem ser consideradas nesse tipo de procedimento (PANETTA et al., 2008; BUENO et al., 2009; BELOTI et al., 2011). Assim, o uso de células-tronco para a estimulação do crescimento ósseo evitaria o uso de enxertos ósseos e todas as suas complicações inerentes. O uso de MSC para a regeneração óssea está se tornando uma prática popular. Seu potencial de diferenciação, a sua disponibilidade em termos de colheita de células e a sua capacidade de replicação sem perder seu potencial, torna-se uma fonte atraente para abordagens terapêuticas. Vários experimentos baseados em células demonstraram que as MSC podem ser induzidas a se transformarem em osteoblastos (BEHNIA et al., 2009).

Adicionalmente, estudos comparando os transplantes homólogos e autólogos de MSC não encontram diferenças terapêuticas significativas e, além disso, não se observa rejeição das mesmas (CHEN et al., 2009; PLANKA et al., 2007; WAN et al., 2013). E isso se deve ao fato das MSC apresentarem baixa imunogenicidade (HASSAN et al., 2014). As MSC expressam pequenas quantidades de complexo de histocompatibilidade principal (MHC-I) e/ou não expressão MHC-II em sua superfície. Durante o processo realizado pelas células de defesa do organismo (reconhecimento do próprio e do não próprio), essas células utilizam o MHC para realizar tal seleção. Logo, na ausência de MHC, como verificado nas MSC, o processo de seleção de não próprio não ocorre, impedindo que o organismo que recebeu essas células indiferenciadas as reconheça como não próprias e as rejeite (AMORIN et al., 2012; GEBLER et al., 2012).

A menor presença de células inflamatórias na cicatrização da fenda palatina no grupo GTC, pode ser em decorrência de que as MSC ajudam a diminuir a inflamação. As MSC aumentam a expressão das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, enquanto diminuem as citocinas pró-inflamatórias IL-2, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ), causando a supressão da reação inflamatória local (MAXSON et al., 2012; KIM et al., 2013).

Já o grupo que recebeu selante de fibrina, apresentou maior número de células inflamatórias. Alguns estudos descrevem reações inflamatórias mais intensas no sítio cirúrgico, nas primeiras semanas após a aplicação do selante de fibrina, podendo este

processo inflamatório persistir até 30 dias após a aplicação, seguida pela formação de um processo de inflamação crônico e por um tecido de granulação rico em fibroblastos. Esse infiltrado persistente rico em fibroblastos sugere que, em longo prazo, poderia haver a formação de um processo cicatricial rico em colágeno e, conseqüentemente, mais fibrose (PORTES et al., 2012). Hanson e Quinn (2001) realizaram um ensaio para demonstrar a influência da cola de fibrina sobre a quimiotaxia de neutrófilos durante o processo de cicatrização. Os autores observaram que a concentração de fibrina, variável em vários tipos de selante de fibrina disponíveis comercialmente, tem influência direta sobre a quimiotaxia. Quanto maior a concentração de fibrina, menor a quimiotaxia, sendo que concentrações maiores que 2mg/ml podem bloquear o processo. Os autores ainda consideram que a presença do fator XIII, presente em alguns tipos de selantes disponíveis no mercado, também possam exercer influência direta sobre o processo, permitindo maior quimiotaxia dos neutrófilos, explicando o maior processo inflamatório encontrado na presença da cola de fibrina e, conseqüentemente, maior fibroplasia num momento mais tardio da cicatrização. Marx e Mou (2002) também relataram a presença de um intenso infiltrado inflamatório na derme até o quarto dia do estudo que se normalizou ao redor do sétimo dia de avaliação, quando observaram completa reepitelização, com proeminente fibroplasia, deposição de colágeno e angiogênese ao longo da linha de incisão.

Assim, com o exposto acima, justifica-se também a maior presença de fibroblastos no grupo GTF. Entretanto, ao analisar os tipos de colágenos existentes na cicatrização da fenda palatina, não houve diferença entre os grupos. Em todos os grupos, verificou-se uma maior quantidade de fibras de birrefringência vermelha, isto significa, maior presença de colágeno tipo I e conseqüentemente, maior maturação do colágeno e cicatrização. A fase proliferativa ocorre de três a cinco dias após a lesão tecidual e se caracteriza por elevação na concentração de fibroblastos, que produzem e depositam grande quantidade de colágeno tipo III. Posteriormente ocorre a maturação, com remodelação e substituição das fibras colágenas do tipo III por fibras colágenas do tipo I, ocorrendo a maturação da cicatrização (RIBEIRO et al., 2015).

4.2.8. Conclusão

A tela de polipropileno associada com MSC demonstrou ser o melhor, entre os demais tratamentos estudados neste trabalho, para correção de fenda palatina. Forneceu

completa cicatrização óssea e da mucosa oral e nasal em um período de quinze dias. Esta nova técnica demonstrou ser segura e eficaz, possuindo um potencial significativo para correção de fenda palatina sem intercorrências futuras, como ocorrência de fístulas ou reintervenções cirúrgicas. Entretanto, estudos com fendas maiores são necessários para avaliar a cicatrização nesta situação.

4.2.9. Financiamento

Este trabalho foi apoiado pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA).

4.2.10. Referências

AHMED, T.A.; HINCKE, M.T. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. **Tissue Engineering Part B Reviews**, v.16, n.3, p.305-329, 2010.

AMORIN, B.; VALIM, V.S.; LEMOS, N.E.; JÚNIOR, L.M.; SILVA, A.M.P.; SILVA, M.A.L.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71–81, 2012.

ARAÚJO, U. R. M. F.; CZECZKO, N. G.; DEALLARMI, A.; HEMOVISKI, F. E.; ARAÚJO, H. V. C. P. Escolha do material da tela para disposição intraperitoneal na correção cirúrgica de defeitos herniários da parede abdominal. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v.23, n.2, p.118-121, 2010.

BEHNIA, H.; KHOJASTEH, A.; SOLEIMANI, M.; TEHRANCHI, A.; KHOSHZABAN, A.; KESHEL, S.H.; ATASHI, R. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.108, p.e1-e6, 2009.

BELOTI, M.M.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA A.L. Engenharia de tecido ósseo em odontologia. *Revista ABO Nacional*, v.19, n.1, p.164-168, 2011.

BUENO, D.F.; KERKIS, I.; COSTA, A.M.; MARTINS, M.T.; KOBAYASHI, G.S.; ZUCCONI, E.; FANGANIELLO, R.D.; SALLES, F.T.; ALMEIDA, A.B.; AMARAL, C.E.R.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M.R. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. **Tissue Engineering: Part A**, v.15, n.2, p.427-435, 2009.

CHEN, L. TREDGET, E.E.; LIU, C.; WU, Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. **PloS one**, v.4, n.9, p. e7119, 2009.

COOK, D.A.; THOMSON, M.J. Complications of the angularis oris axial pattern buccal flap for reconstruction of palatine defects in two dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.92, n.5, p.156-160, 2014.

DOLCE, C.J.; STEFANIDIS, D.; KELLER, J.E.; WALTERS, K.C.; NEWCOMB, W.L.; HEATH, J.J. et al.. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. **Surgical Endoscopy**, v.24, p.2687-2693, 2010.

FIGUEIREDO, I.M.B.; BEZERRA, A.L.; MARQUES, A.C.L.; ROCHA, I.M.; MONTEIRO, N.R. Tratamento cirúrgico de fissuras palatinas completas. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, n.3, p.154-160, 2004.

GAO, W.; QIAO, X.; MA, S.; CUI, L. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.15, n.12, p.2575-2585, 2011.

GEBLER, A., ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, v.18, n.2, p.128-34, 2012.
HANSON, A.J.; QUINN, M.T. Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.61, n.3, p.474-481, 2001.

HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.22, n.3, p.313-25, 2014.

HUBER, A.; BORUCH, A. V.; NIEPONICE, A.; JIANG, H.; MEDBERRY, C.; BADYLAK, S. F. Histopathologic host response to polypropylene-based surgical mesh materials in a rat abdominal wall defect model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.100, n.3, p.709-717, 2012.

KIM, W.-S.; PARK, B.-S.; PARK, S.-H.; KIM, H.-K.; SUNG, J.-H. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. **Journal of Dermatological Science**, v.53, n.2, p.96-102, 2009.

KIM, J.-W.; LEE, J.-H.; LYOO, Y.S.; JUNG, D.-I.; PARK, H.-M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary Dermatology**, v.24, p.242-253, 2013.

LIAO, S.; LI, B.; MA, Z.; WEI, H.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. **Biomedical Material**, v.1, p.45-53, 2006.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.477, 2004.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: Challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, n.9, p. 72-84, 2005.

MARX, G.; MOU, X. Characterizing fibrin glue performance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, n.3, p.152-160, 2002.

MAXSON, S.; LOPEZ, E.A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; LEROUX, M.A. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem cells translational medicine**, v.1, n.2, p.142-49, 2012.

MOREAU, J.L.; JOHN F. CACCAMESE, J.F.; COLETTI, D.P.; SAUK, J.J.; FISHER, J.P. Tissue engineering solutions for cleft palates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, p.2503-2511, 2007.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Defeitos do desenvolvimento da região bucal e maxilofacial. In: __. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.10-15, 2011.

PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; SLATER, B.J.; KWAN, M.D.; LIU, K.J.; LONGAKER, M.T. Tissue Engineering in Cleft Palate and Other Congenital Malformations. **Pediatric Research**, v.63, n.5, p.545-551, 2008.

PLANKA, L.; NEČAS, A.; GÁL, P.; KECOVÁ, H.; FILOVÁ, E.; KŘEN, L.; KRUPA, P. Prevention of bone bridge formation using transplantation of the autogenous mesenchymal stem cells to physeal defects: an experimental study in rabbits. **Acta Veterinaria Brno**, v.76, n.2, p.253-263, 2007.

PORTES, K.P.; DUPRAT, A.C.; LANCELLOTTI, C.L.P.; SILVA, L.; SOUZA, F.C. Influence of selant fibrin on the wound healing of the pigs vocal folds. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.78, n.1, p.51-56, 2012.

RIBEIRO, F.A.Q.; CARVALHO, M.F.P.; PEREIRA, C.S.B.; TATENO, D.A. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa de Casa São Paulo**, v.60, p.22-26, 2015.

ROBERTSON, J.J. Palato. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 1ª ed. São Paulo: Manole, p.225-228, 1996.

SAHIN, M.; CAKIR, M.; AVSAR, F.M.; TEKIN, A.; KUCUKKARTALLAR, T.; AKOZ, M. The effect of anti-adhesion materials in preventing postoperative adhesion in abdominal cavity (anti-adhesion materials for postoperative adhesions). **Inflammation**, v.30, n.6, p. 244-249, 2007.

SEGUNDO, A.V.L.; VASCONCELOS, B.C.E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Revista Ciências Médica**, v.16, n.1, p.23-30, 2007.

SHARMA, B.; ELISSEEFF, J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.148, 2004.

SHESTAK, K.C. et al.. Treatment of difficult TRAM flap hernias using intraperitoneal synthetic mesh application. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.107, n.1, p.63-65, 2000.

SILVA, D.P.; DORNELLES, S.; PANIAGUA, L.M.; COSTA, S.S.; COLLARES, M.V.M. **Aspectos patofisiológicos do esfíncter velofaríngeo nas fissuras palatinas**, v.12, n.3, p.426-435, 2008.

SILVA, M.R.; ALEIXO, G.A.S.; SÁ, F.B.; COELHO, M.O.C. Redução de fenda palatina secundária em um gato. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, n. 2/3, p.97-101, 2006.

SILVA, E.B.; MANISCALCO, C.L. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.785-792, 2013.

SILVA, E.P. **Tela de polipropileno: estudo da biocompatibilidade em modelo animal e da aplicabilidade na reconstrução de órbitas em humanos**. 2009. 139f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v.1, n.4, p.30, 2010.

YOSHINO, N. et al.. A case report on a full-thickness chest wall reconstruction with polypropylene mesh and stainless steel mesh concurrently using a transverse rectus abdominis myocutaneous flap. **Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.12, n.6, p.445-448, 2006.

VAZ, M.; KREBS, R. K.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. Fibroplasia after polypropylene mesh implantation for abdominal wall hernia repair in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.1, p.19-25, 2009.

WAN, J. XIA, L.; LIANG, W.; LIU, Y.; CAI, Q. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **Journal of Diabetes Research**, v.2013, p.1-11, 2013.

WU, Y.; ZHAO, R.C.H.; TREDGET, E.E. Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem Cells**, v.28, n.5, p.905–915, 2010.

ZHANG, X.; REAGAN, M.R., KAPLAN, D.L. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.988–1006, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Nos últimos anos os progressos na área da medicina regenerativa levaram ao uso de enxertos ósseos e de tecidos moles, constituindo atualmente uma terapêutica bem estabelecida, apesar de também apresentarem desvantagens. A fim de colmatar as restrições desta terapia emergiu a engenharia de tecidos, que tem como base o aumento dos conhecimentos relativos à composição e fisiologia dos tecidos, da terapia celular e de fatores de crescimento, além do desenvolvimento de novos biomateriais. Nesta área têm vindo a serem utilizadas matrizes tridimensionais conhecidas por arcabouços, usadas para estimular e auxiliar a reparação e reconstrução das lesões teciduais.

A tela de polipropileno é comumente utilizada em correções de hérnias, até então, não foi encontrado seu uso na boca ou para servir como arcabouço na engenharia de tecidos. Assim, como foi demonstrada que a tela de polipropileno é favorável para o crescimento de MSC, a mesma poderia ser utilizada com maior abrangência na engenharia de tecidos, pois a referida tela possui facilidade de ser encontrada nos centros cirúrgicos, é de baixo custo, fácil de esterilizar e sua maleabilidade permite ser utilizada em diversos locais para reparação cirúrgica.

Nos artigos da literatura consultada para esta tese, verificou-se que existem complicações cirúrgicas relacionadas às correções das fendas palatinas nas técnicas atualmente utilizadas, agravando-se conforme o tamanho da fenda. Os trabalhos relatam que a presença de fístulas ou reintervenções após a primeira cirurgia são comuns, sendo que estas reintervenções realizadas de forma demasiada prejudicam significativamente o sucesso da correção da fenda palatina. Adicionalmente, relatam o uso de enxertos autólogos ou heterólogos, como osso, cartilagem de orelha, pele etc; para ajudar na correção dessas fendas, que, além de prejudicarem o sitio doador bem como haver necessidade de dois procedimentos cirúrgicos, podem ser rejeitados pelo receptor, principalmente se for heterólogo. Assim, o uso de um arcabouço enriquecido com células, para promover a cicatrização de qualquer tipo celular, produzido em laboratório e que não cause rejeição pelo hospedeiro é a forma mais eficaz de reduzir as fendas palatinas.

Diante do exposto, foi desenvolvido neste trabalho um arcabouço contendo MSC fácil de reproduzir em laboratório de cultivo celular e que possuiu aceitação bem como um resultado positivo para a correção de fenda palatina.

Os resultados obtidos no primeiro experimento demonstram que as ADSC podem se aderir com sucesso em tela de polipropileno, sendo o melhor resultado de arcabouço a tela microporosa cultivada durante sete dias em placas de cultura convencionais. Já o segundo estudo demonstra que a tela de polipropileno pode ser utilizada na correção de fendas palatinas, sendo o referido material associado com MSC o melhor protótipo, entre os demais estudados neste trabalho. A tela associada às MSC forneceu completa cicatrização óssea e das mucosas oral e nasal, em um período de quinze dias. Na planimetria demonstrou uma cicatrização mais acelerada que os demais grupos. O uso do selante de fibrina na correção da fenda palatina causou maior presença de células inflamatórias e fibroblastos, assim indicando-se somente o uso das MSC sobre a tela de polipropileno.

Conclui-se, portanto, que a tela de polipropileno é um bom arcabouço para crescimento das MSC e que ambos associados representam ser uma nova técnica segura e eficaz, possuindo um potencial significativo para correção de fenda palatina sem intercorrências futuras, como ocorrência de fístulas ou reintervenções cirúrgicas.

Entretanto, mais estudos são necessários para melhor entender os fatores que aumentam ou inibem o crescimento de células-tronco em próteses e se esse crescimento pode ser induzido ou conduzido por outras formas de cultivo, uso de fatores de crescimento ou técnicas que melhorem a adesão das células nas telas. Também são necessários estudos com fendas maiores para averiguar a cicatrização nesta situação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, v.2, n. 15, p. 109-16, 2008.

AHMED, T.A.; HINCKE, M.T. Strategies for articular cartilage lesion repair and functional restoration. **Tissue Engineering Part B Reviews**, v.16, n.3, p.305-329, 2010.

AMORIN, B.; VALIM, V.S.; LEMOS, N.E.; JÚNIOR, L.M.; SILVA, A.M.P.; SILVA, M.A.L.; SILLA, L. Células-tronco mesenquimais – caracterização, cultivo, propriedades imunológicas e aplicações clínicas. **Revista HCPA**, v.32, n.1, p.71–81, 2012.

ANTUNES, F.M.V.; MOUALLEM, J.M.; SINISCALCHI, R.T. Uso de telas de polipropileno recobertas para tratamento de prolapso genitais femininos. **Revista Ciências em Saúde**, v.2, n.3, 2012.

ARAÚJO, U. R. M. F.; CZECZKO, N. G.; DEALLARMI, A.; HEMOVISKI, F. E.; ARAÚJO, H. V. C. P. Escolha do material da tela para disposição intraperitoneal na correção cirúrgica de defeitos herniários da parede abdominal. **Arquivo Brasileiro de Cirurgia Digestiva**, v.23, n.2, p.118-121, 2010.

AROSARENA, O.A. Cleft Lip and Palate. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v.40, p.27-60, 2007.

BECKER, W. Fibrin sealants in implant and periodontal treatment: case presentations. **Compendium of Continuing Education in Dentistry Department of Graduate Periodontics**, v.26, n.8, p.539-544, 2005.

BEHNIA, H.; KHOJASTEH, A.; SOLEIMANI, M.; TEHRANCHI, A.; ATASHI, A. Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: A preliminary report. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v.40, p.2-7, 2012.

BEHNIA, H.; KHOJASTEH, A.; SOLEIMANI, M.; TEHRANCHI, A.; KHOSHZABAN, A.; KESHEL, S.H.; ATASHI, R. Secondary repair of alveolar clefts using human mesenchymal stem cells. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.108, p.e1-e6, 2009.

BELOTI, M.M.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA A.L. Engenharia de tecido ósseo em odontologia. **Revista ABO Nacional**, v.19, n.1, p.164-168, 2011.

BOULOS, P.R.; HARISSI-DAGHER, M.; KAVALEC, C.; HARDY, I.; CODERE, F. Intralesional injection of Tisseel fibrin glue for resection of lymphangiomas and other thin-walled orbital cysts. **Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery**, v.21, n.3, p.171-176, 2005.

BRADFORD, T.J.; WOLF JR., J.S. Percutaneous injection of fibrin glue for persistent nephrocutaneous fistula after partial nephrectomy. **Urology**, v.65, n.4, p.799, 2005.

BROWN, C.N.; FINCH, J.G. Which mesh for hernia repair? **Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v.92, n.4, p.272-278, 2010.

BUENO, D.F.; KERKIS, I.; COSTA, A.M.; MARTINS, M.T.; KOBAYASHI, G.S.; ZUCCONI, E.; FANGANIELLO, R.D.; SALLES, F.T.; ALMEIDA, A.B.; AMARAL, C.E.R.; ALONSO, N.; PASSOS-BUENO, M.R. New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. **Tissue Engineering: Part A**, v.15, n.2, p.427-435, 2009.

BYDLOWSKI, S.P. et al.. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.31, p.25-35, 2009.

CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMATI, M.; BEHR, L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.143–147, 2006.

CHEN, L. TREDGET, E.E.; LIU, C.; WU, Y. Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. **PloS one**, v.4, n.9, p. e7119, 2009.

CHENG, K. KUO, T.L.; KUO, K.K.; HSIAO, C.C. Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and current application in regeneration medicine. **Genomic Medicine, Biomarkers, and Health Sciences**, v.3, n.2, p.53–62, 2011.

CIRNE-LIMA, E.O. Stem Cells. **Revista HCPA**, v.27, n.3, p.66-73, 2007.

CLARK, J.M.; SAFFOLD, S.H.; ISRAEL, J.M. Decellularized dermal grafting in cleft palate repair. **Archives of Facial Plastic Surgery**, v.5, p.40-44, 2003.

CODA, A.; LAMBERTI, R.; MARTORANA, S. Classification of prosthetics used in hernia repair based on weight and biomaterial. **Hernia**, v.16, n.1, p. 9-20, 2012.

COOK, D.A.; THOMSON, M.J. Complications of the angularis oris axial pattern buccal flap for reconstruction of palatine defects in two dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.92, n.5, p.156-160, 2014.

CONTESINI, E.A.; PIPPI, N.L.; BECK, C.A.C.; BRUN, M.V.; LEME, M.C.L.; RAISER, A.G.; et al.. Aspectos clínicos e macroscópicos da palatoplastia imediata com implante de cartilagem da pina articular, conservada em glicerina a 98%, após indução experimental de fenda palatina em cães. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.103-108, 2003.

CONTESINI, E.A.; PIPPI, N.L.; BECK, C.A.C.; BRUN, M.V.; LEME, M.C.; RAFFI, M.B.; GODOY, C.L.B.; BONFADA, A.T.; GOMES, K.; TRINDADE, A.B. Cartilagem homóloga conservada em glicerina para restauração de fenda de palato duro experimental em cães. **Revista da FZVA**, v.11, n.1, p.128-139, 2004.

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

DOLCE, C.J.; STEFANIDIS, D.; KELLER, J.E.; WALTERS, K.C.; NEWCOMB, W.L.; HEATH, J.J. et al.. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. **Surgical Endoscopy**, v.24, p.2687-2693, 2010.

DUPLOMB, L.; DAGOUASSAT, M.; JOURDON, P.; HEYMANN, D. Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation. **Stem Cells**, v.25, n.3, p.544-552, 2007.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O.; RIVOIRE, H.C. Adesivos cirúrgicos: revisão e atualização. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v.82, n.3, p.101-103, 2002.

FIGUEIREDO, I.M.B.; BEZERRA, A.L.; MARQUES, A.C.L.; ROCHA, I.M.; MONTEIRO, N.R. Tratamento cirúrgico de fissuras palatinas completas. **Revista Brasileira em Promoção da Saúde**, v.17, n.3, p.154-160, 2004.

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 128f. (Dissertação de Mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FOON, R.; SMITH, P. The effectiveness and complications of graft materials used in vaginal prolapsed surgery. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**. v.21, p.424-427, 2009.

FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, n.2, p.230-247, 1968.

GAO, W.; QIAO, X.; MA, S.; CUI, L. Adipose-Derived Stem Cells Accelerate Neovascularization in Ischemic Diabetic Skin Flap via expression of Hypoxia-Inducible Factor-1 α . **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.15, n.12, p.2575-2585, 2011.

GARCIA-CABALLERO, M.; CARBAJO, M.; MARTINEZ-MORENO, J.M.; SARRIA, M.; OSÓRIO, D.; CARMONA, J. A. Drain erosion and gastro-jejunal fistula after one-anastomosis gastric bypass: endoscopic occlusion by fibrin sealant. **Obesity Surgery**, v.15, n.5, p.719-722, 2005.

GEBLER, A., ZABEL, O.; SELIGER, B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. **Trends in molecular medicine**, v.18, n.2, p.128-34, 2012.

GIOSO, M. A. Defeitos do palato. In: ____. **Odontologia para o clínico de pequenos animais**. 5ª ed. São Paulo: I Editora, p.167-175, 2003.

GIOSO, M.; CARVALHO, V. Oral Anatomy of the Dog and Cat in Veterinary Dentistry Practice. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, n.35, p.763-780, 2005.

GOSAIN, A.K.; LYON, V.B. The Current Status of Tissue Glues: Part II. For Adhesion of Soft Tissues. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.110, n.6, p.1581-1584, 2002.

GRIFFITHS, L.G.; SULLIVAN, M. Bilateral Overlapping Mucosal Single-Pedicle Flaps for Correction of Soft Palate Defects. **Journal of the American Animal Hospital Association**, n.37, p.183-186, 2001.

HANDSCHEL, J.; WIESMANN, H.P.; DEPPRICH, R.; KÜBLER, N.R.; MEYER, U. Cell-based bone reconstruction therapies – cell sources. **International Journal of Oral and Maxillofacial Implants**, v.21, n.6, p.890-898, 2006.

HANSON, A.J.; QUINN, M.T. Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.61, n.3, p.474-481, 2001.

HASSAN, W. U.; GREISER, U.; WANG, W. Role of adipose-derived stem cells in wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.22, n.3, p.313–25, 2014.

HEDLUND, C.S. Cirurgia do sistema digestório. In: FOSSUN, T.W.; et al.. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 2ª ed. São Paulo: Roca, p.287-289, 2005.

HETTE, K.; RAHAL, S. C. Defeitos congênitos do palato em cães. **Clínica Veterinária**, n. 50, p.30-40, 2004.

HIBI, H.; YAMADA, Y; UEDA, M.; ENDO, Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v.35, p.551-555, 2006.

HUBER, A.; BORUCH, A. V.; NIEPONICE, A.; JIANG, H.; MEDBERRY, C.; BADYLAK, S. F. Histopathologic host response to polypropylene-based surgical mesh materials in a rat abdominal wall defect model. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v.100, n.3, p.709-717, 2012.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. O tubo digestivo. In: __. **Histologia Básica**. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 241, 1995.

KAPISCHKE, M.; PRINZ, K.; TEPEL, J.; TENSFELDT, J.; SCHULZ, T. Precoating of alloplastic materials with living human fibroblasts. **Surgery Endoscopy**, v.19, p.791–797, 2005.

KAY, S.; THAPA, A.; HABERSTROH, K.M.; WEBSTER, T.J. Nanostructured polymer/nanophase ceramic composites enhance osteoblast and chondrocyte adhesion. **Tissue Engineering**, v.8, p.753–761, 2002.

KIM, W.-S.; PARK, B.-S.; PARKB, S.-H.; KIMB, H.-K.; SUNG, J.-H. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. **Journal of Dermatological Science**, v.53, n.2, p.96–102, 2009.

KIM, J.-W.; LEE, J.-H.; LYOO, Y.S.; JUNG, D.-I.; PARK, H.-M. The effects of topical mesenchymal stem cell transplantation in canine experimental cutaneous wounds. **Veterinary Dermatology**, v.24, p.242-253, 2013.

KIRSCHNER, R.E.; CABILING, D.S.; SLEMP, A.E.; SIDDIQI, F.; LAROSSA, D.D.; LOSEE, J.E. Repair of oronasal fistulae with acellular dermal matrices. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.118, n.6, p.1431-1440, 2006.

KOH, C.J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, and cloning: opportunities for regenerative medicine, **Journal of the American Society Nephrology**, v.15, p.1113–1125, 2004.

KUO, Y. et al.. Immunomodulatory effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a swine hemi-facial allotransplantation model. **Plos one**, v.7, p.1-10, 2012

LEE, J.; KIM, Y.; KIM, M.; LEE, J.; CHOI, J.; YEOM, D.; PARK, J.; HONG, S. Application of a temporary palatal prosthesis in a puppy suffering from cleft palate. **Journal of Veterinary Science**, v.7, n.1, p.93-95, 2006.

LIAO, S.; LI, B.; MA, Z.; WEI, H.; CHAN, C.; RAMAKRISHNA, S. Biomimetic electrospun nanofibers for tissue regeneration. **Biomedical Material**, v.1, p.45–53, 2006.

LIU, H.W.; CHEN, C.H.; TSAI, C.L.; LIN, I.H.; HSIUE, G.H. Heterobifunctional poly(ethylene glycol)-tethered bone morphogenetic protein-2-stimulated bone marrow mesenchymal stromal cell differentiation and osteogenesis. **Tissue Engineering**, v.13, p.1113–1124, 2007.

LIU, X.; MA, P.X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.477, 2004.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: Challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, n.9, p. 72-84, 2005.

MAGRO, A.K.D.; RIBEIRO, A.A.R.; SHENKEL, A.; SAMUELSSON, M.; STUDZINSKI, M.S.; ALMEIDA, D. Manejo odontológico de pacientes com coagulopatias – revisão de literatura e relato de caso: síndrome de Bernard Soulier. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v.16, n.2, p.193-199, 2011.

MARX, G.; MOU, X. Characterizing fibrin glue performance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.140, n.3, p.152-160, 2002.

MAXSON, S.; LOPEZ, E.A.; YOO, D.; DANILKOVITCH-MIAGKOVA, A.; LEROUX, M.A. Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. **Stem cells translational medicine**, v.1, n.2, p.142–49, 2012.

McFARLIN, K.; GAO, X., LIU, Y.B.; DULCHAVSKY, D.S.; KWON, D.; ARBAB, A.S.; BANSAL, M.; LI, Y.; CHOPP, M.; DULCHAVSKY, S.A.; GAUTAM, S.C. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat. **Wound Repair and Regeneration**, v.14, n.4, p.471–478, 2006.

McGUIRE, M.K.; SCHEYER, E.T.; NUNN, M.E.; LAVIN, P.T. A pilot study to evaluate a tissue-engineered bilayered cell therapy as an alternative to tissue from the palate. **Tissue-Engineered Bilayered Cell Therapy**, v.79, n.10, p.1847-1856, 2008.

MOREAU, J.L.; JOHN F. CACCAMESE, J.F.; COLETTI, D.P.; SAUK, J.J.; FISHER, J.P. Tissue engineering solutions for cleft palates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, p.2503-2511, 2007.

NAMBU, M.; KISHIMOTO, S.; NAKAMURA, S.; MIZUNO, H.; YANAGIBAYASHI, S.; YAMAMOTO, N.; AZUMA, R.; NAKAMURA, S.; KIYOSAWA, T.; ISHIHARA, M.; KANATANI, Y. Accelerated wound healing in healing-impaired db/db mice by autologous adipose tissue-derived stromal cells combined with atelocollagen matrix. **Annals of Plastic Surgery**, v.62, n.3, p.317–21, 2009.

NARDI, N.B.; MEIRELLES, L.S. Mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion and characterization. **Handbook of Experimental Pharmacology Journal**, v.282, p.174-249, 2006.

NELSON, A.W. Sistema Respiratório. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 3ª ed. São Paulo: Manole, p.764, 2007.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Defeitos do desenvolvimento da região bucal e maxilofacial. In: __. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.10-15, 2011.

NEWMAN, R.E. et al.. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v.2, p.110-123, 2009.

OPHOF, R.; MALTHA, J.C.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; HOFF, J.W.V. Implantation of tissue-engineered mucosal substitutes in the dog palate. **European Journal of Orthodontics**, v.30, p.1–9, 2008.

PAGANELLI, C.; FONTANA, P.; PORTA, F.; MAJORANA, A.; PAZZAGLIA, U.E.; SAPELLI, P.L. Indications on suitable scaffold as carrier of stem cells in the alveoloplasty of cleft palate. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.33, p.625–629, 2006.

PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; SLATER, B.J.; KWAN, M.D.; LIU, K.J.; LONGAKER, M.T. Tissue Engineering in Cleft Palate and Other Congenital Malformations. **Pediatric Research**, v.63, n.5, p.545-551, 2008.

PAPAZOGLU, L.G.; KOUTINAS, A.F.; PLEVRAKI, A.G.; TONTIS, D. Primary Intranasal Transmissible Venereal Tumor in the Dog: A Retrospective Study of Six Spontaneous Cases. **Journal of Veterinary Medicine**, v.48, p.391-400, 2001.

PARK, G.E.; PATTISON, M.A.; PARK, K.; WEBSTER, T.J. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. **Biomaterials**, v.26, p.3075–3082, 2005.

PEREIRA, I.S.O. et al.. Protocolo piloto de separação e quantificação de células-tronco de tecido adiposo de coelhos para posterior uso em laringe. **Acta ORL - Técnica em otorrinolaringologia**, v.26, p.11-16, 2008.

PFISTER, R.R.; SOMMERS, C.I. Fibrin sealant in corneal stem cell transplantation. **Cornea**, v.24, n.5, p.593-598, 2005.

PLANKA, L.; NEČAS, A.; GÁL, P.; KECOVÁ, H.; FILOVÁ, E.; KŘEN, L.; KRUPA, P. Prevention of bone bridge formation using transplantation of the autogenous mesenchymal stem cells to physeal defects: an experimental study in rabbits. **Acta Veterinaria Brno**, v.76, n.2, p.253–263, 2007.

PORTES, K.P.; DUPRAT, A.C.; LANCELLOTTI, C.L.P.; SILVA, L.; SOUZA, F.C. Influence of selant fibrin on the wound healing of the pigs vocal folds. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.78, n.1, p.51-56, 2012.

PRADO FILHO, O.R.; FAGUNDES, D.J.; NIGRO, A.J.T.; BANDEIRA, C.O.P.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Estudo morfológico da anastomose esôfago-esofágica cervical com adesivo de fibrina em cães. **Acta Scientiarum**, v.24, n.3, p.679-701, 2002.

PUNDEK, M.R.Z.; CZECHKO, N.G.; YAMAMOTO, C.T.; PIZZATTO R.F.; CZECHKO, L.E.A.; DIETZ U.A. et al.. Estudo das telas cirúrgicas de polipropileno/poliglicaprone e de polipropileno/polidioxanona/celulose oxidada regenerada na cicatrização de defeito produzido na parede abdominal de ratos. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgias Digestivas**, v.23, n.2, p.94-99, 2010.

RESEL, E.; MARTÍNEZ-SANZ, E.; GONZÁLEZ, I.; TRINIDAD, E.; GARCILLÁN, B.; AMORÓS, M.; ALONSO-BAÑUELOS, C.; GONZÁLEZ-MELI, B.; LAGARÓN, E.; MURILLO, J.; DEL RÍO, A.; BARRIO, C.; LÓPEZ, M. In vitro manipulation of cleft palate connective tissue: setting the bases of a proposed new treatment. **Journal of Surgical Research**, v.138, p.111-120, 2007.

RIBEIRO, F.A.Q.; CARVALHO, M.F.P.; PEREIRA, C.S.B.; TATENO, D.A. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa de Casa São Paulo**, v.60, p.22-26, 2015.

ROBERTSON, J.J. Palato. In: BOJRAB, M.J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 1ª ed. São Paulo: Manole, p.225-228, 1996.

ROEHSIG, C.; RAISER, A.G.; MAZZANTI, A.; PORTELLA, L.C.V. Redução de fenda palatina com resina acrílica autopolimerizável em um gato. **Revista Hora Veterinária**, n.21, p.50-52, 2001.

SAHIN, M.; CAKIR, M.; AVSAR, F.M.; TEKIN, A.; KUCUKKARTALLAR, T.; AKOZ, M. The effect of anti-adhesion materials in preventing postoperative adhesion in

abdominal cavity (anti-adhesion materials for postoperative adhesions). **Inflammation**, v.30, n.6, p. 244-249, 2007.

SANCHEZ-QUEVEDO, M.C.; ALAMINOS, M.; CAPITAN, L.M.; MOREU, G.; GARZON, I.; CRESPO, P.V.; CAMPOS, A. Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs developed by tissue engineering. **Histology and Histopathology**, v.22, p.631-640, 2007.

SBANO, P. et al.. Use of donor bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of skin allograft rejection in a preclinical rat model. **Archives of Dermatological Research**, v.300, p.115-124, 2008.

SEGUNDO, A.V.L.; VASCONCELOS, B.C.E. Células-tronco e engenharia tecidual: perspectivas de aplicação em odontologia. **Revista Ciências Médica**, v.16, n.1, p.23-30, 2007.

SHARMA, B.; ELISSEEFF, J.H. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. **Annals of Biomedical Engineering**, v.32, p.148, 2004.

SHESTAK, K.C. et al.. Treatment of difficult TRAM flap hernias using intraperitoneal synthetic mesh application. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v.107, n.1, p.63-65, 2000.

SINISCALCHI, R.; PALMA, P.; RICCETTO, C.; MACIEL, L.; ENS, G.; DEL FABBRO, I. Efectos biomecánicos de la inclusión de orificios facilitadores de la integración en mallas de polipropileno monofilamento: estudio experimental. **Actas Urológicas Españolas**, v.35, n.10, p.599-604, 2011.

SILVA, D.P.; DORNELLES, S.; PANIAGUA, L.M.; COSTA, S.S.; COLLARES, M.V.M. **Aspectos patofisiológicos do esfíncter velofaríngeo nas fissuras palatinas**, v.12, n.3, p.426-435, 2008.

SILVA, M.R.; ALEIXO, G.A.S.; SÁ, F.B.; COELHO, M.O.C. Redução de fenda palatina secundária em um gato. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.9, n. 2/3, p.97-101, 2006.

SILVA, L.S.S.; FIGUEIRA NETO, J.B.; SANTOS, A.L.Q. Utilização de adesivos teciduais em cirurgias. **Bioscience Journal**, v.23, n.4, p.108-119, 2007.

SILVA, L.M.R.; MAGALHÃES, F.J.R.; OLIVEIRA, A.M.A.; COELHO, M.C.O.C.; SALDANHA, S.V. Redução de fenda palatina, secundária a tumor venéreo transmissível, com obturador palatino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.104, n.569-572, p.77-82, 2009.

SILVA, E.B.; MANISCALCO, C.L. Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. **Semina: Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.785-792, 2013.

SILVA, E.P. **Tela de polipropileno: estudo da biocompatibilidade em modelo animal e da aplicabilidade na reconstrução de órbitas em humanos**. 2009. 139f.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009.

SIVACOLUNDHU, R. Use of Local and Axial Pattern Flaps for Reconstruction of the Hard and Soft Palate. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.22, p.61-69, 2007.

SIVASLIOGLU, A.A.; UNLUBILGIN, I., DOLEN, I. A randomized comparison of polypropylene mesh surgery with site-specific surgery in the treatment of cystocele. **International Urogynecology Journal**, v.19, p.467-471, 2008.

SMITH, M. Oronasal Fistula Repair. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.15, n.4, p.243-250, 2000.

SOFFER, E.; OUHAYOUN, J.P.; ANAGNOSTOU, F. Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 95, n.5, p.521-528, 2003.

SORRELL, J.M.; CAPLAN, A.I. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. **Stem Cell Research & Therapy**, v.1, n.4, p.30, 2010.

SOUZA, H.J.M.; ALFELD, V.F.; CICARELLA, L.C.; GRILO, J.C.; CASTELAN, F.G. Oclusão de fístula oronasal crônica utilizando a "U"-Plastia da mucosa palatal em gato. **Acta Scientiae Veterinariae**, n.35, Supl.2, p.474-475, 2007.

STEELE, M.H.; SEAGLE, M.B. Palatal fistula repair using acellular dermal matrix The University of Florida experience. **Annals of Plastic Surgery**, v.56, n.1, p.50-53, 2006.

TUNN, A.P.; MARSCHKE, J.; GAURUDER-BURMESTER, A. Sonomorphological evaluation of polypropylene mesh implants after vaginal mesh repair in women with cystocele or rectocele. **Ultrasound Obstetrics and Gynecology**, v.29, p.449-452, 2007.

VAIMAN, M.; SARFATY, S.; SHLAMKOVICH, N.; SEGAL, S.; EVIATAR, E. Fibrin sealant: alternative to nasal packing in endonasal operations. A prospective randomized study. **Israel Medical Association Journal**, v.7, n.9, p.571-574, 2005.

VAZ, M.; KREBS, R. K.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. Fibroplasia after polypropylene mesh implantation for abdominal wall hernia repair in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.24, n.1, p.19-25, 2009.

VITTON, V.; GASMI, M.; BARTHET, M.; DESJEUX, A.; ORSONI, P.; GRIMAUD, J.C. Long-term healing of Crohn's anal fistulas with fibrin glue injection. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.21, n.12, p.1453-1457, 2005.

WAN, J. XIA, L.; LIANG, W.; LIU, Y.; CAI, Q. Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes delayed wound healing in diabetic rats. **Journal of Diabetes Research**, v.2013, p.1-11, 2013.

WU, Y.; ZHAO, R.C.H.; TREDGET, E.E. Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration. **Stem Cells**, v.28, n.5, p.905–915, 2010.

YOSHINO, N. et al.. A case report on a full-thickness chest wall reconstruction with polypropylene mesh and stainless steel mesh concurrently using a transverse rectus abdominis myocutaneous flap. **Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v.12, n.6, p.445-448, 2006.

ZHANG, X.; REAGAN, M.R., KAPLAN, D.L. Electrospun silk biomaterial scaffolds for regenerative medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.61, p.988–1006, 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211–228, 2001.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.4279–4295, 2002.