

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

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM FALHA MANDIBULAR COM
AUTO-ENXERTO ÓSSEO ASSOCIADO A SUSPENSÃO CELULAR DE MEDULA
ÓSSEA AUTÓGENA: ESTUDO EXPERIMENTAL

Cristiano Gomes

PORTO ALEGRE

2008

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

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM FALHA MANDIBULAR COM
AUTO-ENXERTO ÓSSEO ASSOCIADO A SUSPENSÃO CELULAR DE MEDULA
ÓSSEA AUTÓGENA: ESTUDO EXPERIMENTAL

Autor: Cristiano Gomes

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

Orientador: Prof. Dr. Emerson Antonio Contesini

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Meller Alievi

PORTO ALEGRE

2008

Cristiano Gomes

AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO ÓSSEA EM FALHA MANDIBULAR COM
AUTO-ENXERTO ÓSSEO ASSOCIADO A SUSPENSÃO CELULAR DE MEDULA
ÓSSEA AUTÓGENA: ESTUDO EXPERIMENTAL

APROVADO POR

Prof. Dr. EMERSON ANTONIO CONTESINI
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. NEY LUIS PIPPI
Membro da Banca

Profª. Dra. ELIZABETH OBINO CIRNE-LIMA
Membro da Banca

Prof. Dr. JOÃO BATISTA BURZLAFF
Membro da Banca

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, Roberto e Marília. Sem os seus esforços, muitas vezes abdicando dos próprios sonhos, esta nova conquista não seria alcançada. Toda a confiança em mim depositada, associada ao exemplo de pessoas que são me ensinaram o caminho para buscar todos os meus sonhos. Muito obrigado pelo amor, carinho e dedicação que sempre tiveram por mim. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Para a conclusão deste trabalho, várias etapas só puderam ser ultrapassadas mediante o auxílio de muitas pessoas. Por esta razão, quero homenagear e agradecer a todos que tornaram este sonho realidade.

Ao meu orientador, Prof. Emerson Antonio Contesini, pela confiança, apoio e amizade desde que iniciei minhas atividades na residência veterinária do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, bem como pelo conhecimento e oportunidades que me proporcionou.

Ao meu co-orientador, Prof. Marcelo Meller Alievi, pelos ensinamentos e constante disposição para ajudar em todas as dificuldades encontradas durante este período.

À Profa. Elizabeth Obino Cirne-Lima, que me abriu as portas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela amizade e pela oportunidade única em trabalhar com o tema deste trabalho.

Ao colega e amigo Lucas Marques Colomé, que percorreu comigo cada uma das etapas do trabalho, ajudando-me a superar as dificuldades encontradas neste longo caminho.

Às colegas do Laboratório de Embriologia e Diferenciação Celular, Ana Helena, Ana Ayala e Paula, pela amizade, preocupação e dedicação que tiveram comigo.

À colega Anelise Bonilla Trindade que, na primeira semana em que chegou à Universidade, já encarou comigo o desafio da realização de toda a fase experimental.

Ao colega André Ribeiro Corrêa, pela amizade e valiosa colaboração para a concretização deste trabalho.

À colega Denise Veiga, Mesquita e Fábio, pelos ensinamentos e disponibilidade na colaboração deste trabalho.

À minha equipe de cirurgia, Lisiane, Karina, Mariane, Grazi, Ruben, Nádia, pelo esforço de cada um de vocês em colaborar não somente nas cirurgias, mas em todas as fases; obrigado pela confiança e amizade.

Aos amigos da Escola Técnica Agrícola, Igor e Paulo: não tenho palavras para agradecer todos os esforços que vocês fizeram por mim, bem como os ensinamentos sobre esta nova espécie em que eu estava começando a trabalhar.

Ao amigo Medeiros, não somente pela colaboração no fornecimento das microplacas e parafusos, mas também pela amizade, apoio e incentivo à realização da presente pesquisa, bem como a de outros pós-graduandos, dando um exemplo de integração empresa-universidade com vista ao crescimento científico.

À equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Roseli Mölerke (*in memoriam*), Marco, Eduardo, Vânia e todos os estagiários.

Às profissionais estatísticas do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, pelo apoio técnico para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Afonso de Castro Beck, diretor do Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS, e a todos os funcionários, técnicos, residentes e estagiários, pela amizade e acolhimento.

Aos amigos e colegas, Daniel, Rafael, Alan, Márcio e tantos outros que, além de colegas e amigos, propiciaram momentos que vão ficar guardados para sempre na nossa memória.

A toda minha família, pais, irmãos, tios, avós, primos, por serem a base de tudo, pelo carinho e afeto sempre presentes.

Aos meus pequenos companheiros peludos, Shana, Sheila, Lalo e Tita, pela companhia constante e amor incondicional, por proporcionarem momentos tão alegres e mostrarem como é simples ser feliz.

À minha namorada Inaiá, por todo o amor e apoio nos melhores e piores momentos desta etapa, e que, mesmo estando por algum tempo distante, tem me enchido de alegria e felicidade.

“Quando você quer alguma coisa, todo o universo conspira para que você realize o seu desejo.”

(Paulo Coelho)

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.”

(Vinícius de Moraes)

RESUMO

Defeitos mandibulares secundários a traumas e neoplasias ou deformidades freqüentemente representam um desafio para cirurgiões bucomaxilofaciais e ortopedistas. O objetivo deste trabalho é avaliar a cicatrização óssea de auto-enxerto da crista ilíaca associado a terapia celular da medula óssea. Foi criado um defeito ósseo de 10x5x5mm na mandíbula de 28 coelhos, distribuídos em grupo controle (14 animais), reparados com auto-enxerto de crista ilíaca, e grupo experimental (14 animais), em que o auto-enxerto foi associado a células mononucleares da medula óssea autógena do fêmur. Foram realizadas radiografias semanais da região operada e análise histológica de sete animais de cada grupo aos 15 e 30 dias do pós-operatório. Houve um aumento gradativo da densidade óssea, com 85,71% dos animais do grupo experimental e 42,85% do grupo controle apresentando formação de ponte óssea 28 dias após a cirurgia. Na análise histopatológica aos 15 dias, os enxertos eram facilmente visualizados e a atividade das células fagocitárias era intensa. Já aos 30 dias, a sua visualização era mais difícil e, quando possível, apenas um resquício era visualizado. Os resultados sugerem que a adição de células mononucleares da medula óssea favorece a cicatrização do auto-enxerto em defeitos mandibulares de coelhos.

Palavras-chave: reconstrução mandibular, regeneração óssea, enxerto.

ABSTRACT

Bone defects secondary to tumor, trauma or deformity often presents a significant problem for oral and maxillofacial surgeons and orthopedists. The aim of the present study is to investigate the bone regeneration of the autograft from iliac creast associated to cellular therapy with bone marrow. A bone defect was created with 10x5x5mm in 28 rabbits mandible. The control group (14 animals) was repaired with autograft of the iliac creast and the experimental group (14 animals) was associated to mononuclear cells from the bone marrow of the femur. Weekly radiographs were done from the surgery region and histopathology analysis was made in seven animals of which group, in 15 and 30 days after surgery. A gradative increase of bone density was seen and the experimental animals presented the bone bridge in 85,71% of the cases, while in control group only 42,85% of the animals had the same found 28 days after surgery. The histopathologic analysis showed that in 15 days the autografts were easily seen and the phagocytary cells activity were intense. Although in 30 days it visualisation was more difficult and when possible, only a vestige was seen. The results of this study suggest that the mononuclear cells from the bone marrow can support the autograft regeneration in mandible defects in rabbits.

Keywords: mandibular reconstruction, bone regeneration, graft.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho ilustrativo demonstrando a propriedade fundamental das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006).....	26
Figura 2 - Técnica de isolamento das células mononucleares da medula óssea (Fonte: Fontes et al., 2006).....	31
Figura 3 - Luxação do dente incisivo esquerdo inferior com o auxílio de alavanca apical reta.....	39
Figura 4 - Extração do dente incisivo esquerdo inferior com a utilização de um fórceps	39
Figura 5 - Coleta da medula óssea do fêmur com o uso de uma agulha hipodérmica 40x12 heparinizada	41
Figura 6 - Coleta do auto-enxerto corticoesponjoso, de 10x5x5mm, da crista ilíaca	43
Figura 7 - Realização da falha mandibular de 10x5x5mm (seta) entre a sínfise da mandíbula e o primeiro molar com o auxílio de uma broca cônica de baixa rotação.....	43
Figura 8 - Fixação do auto-enxerto de crista ilíaca (seta) com a utilização de microplaca de titânio de quatro furos, sem espaçamento	44
Figura 9 - Imagem radiográfica de um coelho do grupo experimental (GCT15) no pós-operatório imediato. A seta mostra a região da falha mandibular que foi preenchida pelo enxerto ósseo.....	51
Figura 10 - Imagem radiográfica de um coelho GCT15 exibindo o aumento da densidade óssea (seta) no 14º dia pós-operatório	52
Figura 11 - Imagem radiográfica apresentando a união das extremidades do enxerto com o osso mandibular (setas) compatível com formação de ponte óssea (GCT30)	53
Figura 12 - Demonstração gráfica da evolução da consolidação óssea através da radiografia, onde os dias 7, 14 e 21 representam a presença de densidade óssea e o dia 28 a formação de ponte óssea.....	54
Figura 13 - Imagem histopatológica (HE obj 20x) de um coelho GCT15 apresentando remodelação óssea pelas células fagocitárias e formação vascular (setas).....	55
Figura 14 - Imagem histopatológica (HE obj 20x) de um coelho CGT30 mostrando remodelação (setas) e coaptação óssea por meio de tecido fibroso com atividade intensa de osteoblastos com formação vascular	55

Figura 15 - Valores da mediana das interfaces enxerto/osso e valores máximos e mínimos alcançados nos grupos controle e experimental	57
Figura 16 - Valores da mediana e escores máximo e mínimo de reação inflamatória, nos quatro grupos.....	58
Figura 17 - Valores da mediana e escores máximo e mínimo da taxa de reabsorção do enxerto nos quatro grupos	59
Figura 18 - Valores de mediana e escores máximos e mínimos de revascularização do enxerto nos quatro grupos	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escala semiquantitativa para avaliar histologicamente a união entre o enxerto ósseo corticoesponjoso e o leito receptor.....	47
Tabela 2 - Escala para avaliação da reação inflamatória, taxa de reabsorção e revascularização do enxerto.....	47
Tabela 3 - Valores das escalas histológicas obtidas nas avaliações das interfaces enxerto/osso, grau de reação inflamatória, taxa de reabsorção e taxa de reabsorção e revascularização do enxerto dos quatro grupos, com suas medianas e valores máximos e mínimos.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Geral	16
2.2	Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Reconstrução mandibular	17
3.1.1	Causas de falha mandibular	17
3.1.2	Mandibulectomia	18
3.1.3	Sistemas de fixação	20
3.1.4	Complicações da reconstrução	21
3.2	Enxertos ósseos	21
3.2.1	Tipos de enxertos ósseos	23
3.2.2	Locais de obtenção dos enxertos ósseos	23
3.3	Cicatrização óssea	24
3.4	Células-tronco	25
3.4.1	Classificação	26
3.4.2	Células-tronco adultas	27
3.4.3	Plasticidade	28
3.4.4	População de células na medula óssea	28
3.4.5	Processamento e isolamento das células da medula óssea	29
3.4.6	Utilização em ortopedia	32
3.5	Modelo experimental	35
4	MATERIAL E MÉTODO	37
4.1	Animais experimentais	37
4.2	Grupos	37
4.3	Extração do dente incisivo	38
4.4	Procedimento anestésico	39
4.5	Procedimento pré-operatório	40
4.6	Coleta e processamento das células-tronco da medula óssea	40
4.7	Procedimento cirúrgico	42
4.8	Procedimentos pós-operatórios	44

4.9	Avaliação clínica	45
4.10	Avaliação radiográfica	45
4.11	Eutanásia	45
4.12	Avaliação macroscópica	46
4.13	Avaliação histológica	46
4.14	Análise estatística	47
5	RESULTADOS	48
5.1	Modelo experimental	48
5.2	Anestesia para extração dentária	48
5.3	Extração dentária	48
5.4	Anestesia para procedimento cirúrgico	48
5.5	Coleta da medula óssea	49
5.6	Processamento da medula óssea	49
5.7	Coleta do auto-enxerto de crista ilíaca	49
5.8	Estabilização do implante	49
5.9	Avaliação clínica	50
5.10	Avaliação macroscópica	50
5.11	Avaliação radiográfica	50
5.12	Avaliação histopatológica	54
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As falhas ósseas da mandíbula, tanto em humanos quanto em animais, podem ser causadas pela remoção de neoplasias, por trauma e infecções ou constituir deformidade congênita. O tamanho dos defeitos varia consideravelmente, desde pequenas fissuras alveolares até mesmo resultar da mandibulectomia (YEH; HOU, 1994; ELLIS, 2005). Em cães, as falhas resultantes da mandibulectomia são fechadas com tecidos moles, e raramente é feita reconstrução mandibular (VERSTRAETE, 2005), o que é sempre priorizado em humanos (BRANDÃO; ARAÚJO, 1989).

É de extrema importância que o período de recuperação das funções orais seja breve, para uma melhor apreensão, mastigação e deglutição dos alimentos. Além disso, a falha produzida é de difícil cicatrização, principalmente nos idosos, onde a frequência de tumores é maior e a cicatrização óssea mais lenta (ELLIS, 2005).

As técnicas de reconstrução mandibular têm representado um desafio para os cirurgiões bucomaxilofaciais e ortopedistas (LI; LI, 2005). Para o preenchimento do defeito, geralmente opta-se pelo auto-enxerto, aloenxerto ou xenoenxerto, sendo o primeiro o que apresenta os melhores resultados, por não produzir rejeição e conter células vivas (GANDELMANN et al., 2003).

O uso potencial de células-tronco, tanto de origem embrionária quanto de organismo adulto, tem se expandido. Nos últimos anos, vários trabalhos têm relatado novas perspectivas com relação ao tratamento celular na medicina reparadora. Contudo, a questão ética referente à utilização de células-tronco embrionárias e o risco de formar teratocarcinomas ainda exigem cautela no procedimento (JONES; TRAINOR, 2004; SYLVESTER; LONGAKER, 2004; PASSIER; MUMERRY, 2005; RIVEROS et al., 2007).

As células-tronco agem no reparo e formação do osso mediante replicação e diferenciação celular, produção de citocinas regenerativas e matriz estrutural, que respondem à demanda mecânica para restaurar a função do osso (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006). Elas têm demonstrado capacidade de incrementar o efeito osteoindutor, além de fornecer células osteoprogenitoras, e propiciar fatores de crescimento que intensificam a atividade osteoindutora (RIZZO et al., 2005).

Entretanto, é necessário estudar com mais profundidade as propriedades biológicas das células-tronco adultas para esclarecer melhor os mecanismos de ação relacionados à diferenciação celular, bem como o tipo ideal a ser empregado em protocolos clínicos.

O presente trabalho vem contribuir para a avaliação do tempo da cicatrização óssea em falha mandibular experimentalmente induzida em coelhos utilizando-se auto-enxerto da crista ilíaca associado a transplante de suspensão celular de medula óssea autógena.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a cicatrização do tecido ósseo na falha mandibular de coelhos utilizando auto-enxerto da crista ilíaca associado a transplante de suspensão celular de medula óssea autógena.

2.2 Específicos

- Avaliar a reconstrução mandibular com auto-enxerto corticoesponjoso da crista ilíaca fixado com microplacas de titânio em falha óssea experimentalmente induzida em coelhos.
- Avaliar clinicamente o retorno às condições fisiológicas de restauração da mastigação e deglutição dos animais no pós-operatório.
- Avaliar radiograficamente aos 7, 14, 21 e 28 dias o processo de cicatrização do tecido ósseo e a fixação do enxerto à mandíbula.
- Avaliar macro e microscopicamente o processo cicatricial no 15° e 30° dias após a implantação do enxerto na mandíbula.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Reconstrução mandibular

A primeira descrição da utilização de enxertos ósseos na reconstrução de falhas ósseas data de 1668, quando um cirurgião russo implantou osso de um cão para reparar um defeito craniano de um soldado (HJORTING-HANSEN, 2002). Ollier desenvolveu trabalhos experimentais com enxerto autógeno em coelhos e cães em 1867 (WEIGEL, 1996). A primeira reconstrução mandibular foi reportada em 1892 por Bardenheuer, que realizou um transplante do próprio osso mandibular para preencher uma falha óssea nesse local. Com o advento da anestesia e a introdução das técnicas de anti-sepsia, o uso dos enxertos ósseos tornou-se cada vez mais freqüente, apresentando resultados clínicos satisfatórios (HJORTING-HANSEN, 2002).

As reconstruções mandibulares ainda hoje constituem num desafio para os cirurgiões, pois o procedimento pode acarretar defeitos estéticos que dificultam a integração do indivíduo à sociedade, interferem na qualidade de vida e na auto-estima, além de comprometer as funções orais como fonação e mastigação e demais funções da mandíbula. Por isso, o cirurgião deve ter uma preocupação especial com a reconstrução deste defeito para que ela restabeleça a função e harmonia facial, levando em conta o aspecto anterior à deformidade, para que os traços faciais e a função mandibular sejam devolvidos ou que fiquem o mais próximo possível das condições ideais (FREITAS et al., 2006).

3.1.1 Causas de falha mandibular

Na medicina veterinária, assim como em humanos, as principais causas de defeitos mandibulares são traumatismos, ressecções tumorais e osteomielites (YEH; HOU, 1994).

Os traumas mandibulares ocorrem, geralmente, em consequência de brigas e acidentes veiculares. Na maior parte dos casos, as fraturas apresentam-se abertas e contaminadas (PIERMATEI; FLO, 1999; LEGENDRE, 2005; LOPES et al., 2005). Dentre os métodos de estabilização das fraturas, destaca-se a utilização de fios metálicos, pino intramedular, fixador esquelético externo, resina acrílica e placas

metálicas (EGGER, 1998; MARRETA, 1998; GIOSO et al., 2001; LEGENDRE, 2005). Após a osteossíntese mandibular, muitas complicações podem ocorrer, tais como má-oclusão, osteomielite, não-união e união retardada (MARRETA, 1998).

A união retardada é definida como uma fratura que não se consolidou no tempo normal, e a não-união refere-se à fratura na qual cessaram todas as evidências de atividade osteogênica. As causas mais comuns destas condições são imobilização inadequada, presença de uma grande lacuna entre os fragmentos, aporte sanguíneo prejudicado, osteomielites e perda de fragmentos ósseos (PIERMATEI; FLO, 1999). O tratamento é o restabelecimento da estabilidade, utilização de enxertos ósseos e uso de antibióticos nos casos de osteomielite (LEGENDRE, 2005).

A cavidade oral é o quarto local mais comum de ocorrência de neoplasias em cães e gatos, representando 6% de todos os tumores em cães e 3% em gatos (FELIZZOLA et al., 1999; WHITE, 2003).

Aproximadamente 60% desses tumores são malignos, destacando-se o melanoma, o fibrossarcoma, o carcinoma de células escamosas e o osteossarcoma. Entre os principais tumores benignos, estão o épulis acantomatoso, o épulis fibromatoso e o ameloblastoma. O ameloblastoma e o épulis acantomatoso apresentam características infiltrativas com recorrências locais (KOSOVSKY et al., 1991; WALLACE et al., 1992; VERSTRAETE, 2005).

O tratamento mais efetivo para a maioria dos tumores orais é a mandibulectomia ou a maxilectomia; elas oferecem a melhor oportunidade para a cura, devendo ser considerada em todos os casos em que haja a necessidade de uma boa margem de segurança (WHITE, 2003). Muitos proprietários de animais têm uma aversão natural ao procedimento, necessitando de uma descrição detalhada dos resultados cosméticos e funcionais desse tipo de cirurgia (BERG, 2003).

3.1.2 Mandibulectomia

A mandibulectomia pode ser classificada como unilateral rostral, bilateral rostral, segmentar, caudal e unilateral total, conforme a porção a ser removida. A taxa de sucesso e o prognóstico vão depender do tipo tumoral. Em geral, os resultados obtidos são excelentes para tumores benignos, bons para carcinomas de células escamosas, regulares para fibrossarcomas e osteossarcomas e desfavoráveis para o melanoma (KOSOVSKY et al., 1991; WALLACE et al., 1992; VERSTRAETE, 2005).

A mandibulectomia também pode ser indicada em casos de fraturas cominutivas e infectadas, além de não-uniões. Entretanto, é um procedimento radical e econômico, podendo levar a algumas complicações (HOELLER; HOLMBERG, 2001; LEGENDRE, 2005).

Os aspectos funcionais e cosméticos que podem ocorrer após este procedimento são inflamação da região nos primeiros dias, edema sublingual e protusão da língua quando o animal abre a boca. Podem também surgir traumatismos no palato e a apreensão dos alimentos ficar temporariamente prejudicada, sendo às vezes necessária uma assistência na alimentação dos animais. A excessiva salivação tende a diminuir com o tempo. Pode ainda ocorrer má oclusão, devido à instabilidade da mandíbula, levando a uma lesão degenerativa na articulação temporo-mandibular (WHITE, 2003; VERSTRAETE, 2005).

Em um estudo realizado por Fox et al. (1997), 85% dos proprietários que tiveram seus cães submetidos a mandibulectomia e maxilectomia ficaram satisfeitos com o resultado. O percentual foi diretamente proporcional ao tempo de sobrevivência dos animais. Todos os proprietários acharam a aparência dos seus cães aceitáveis após o crescimento dos pêlos.

Em animais, o defeito criado após a mandibulectomia e maxilectomia é fechado com tecidos moles e geralmente nenhuma reconstrução é realizada (VERSTRAETE, 2005). A literatura apresenta raros relatos de reconstruções mandibulares em cães (BOUDRIEU et al., 1994; YEH; HOU, 1994; BEBCHUK et al., 2000; BOUDRIEU et al., 2004). Já em humanos, a meta não é só remover a lesão patológica, mas também facilitar o bem-estar funcional do paciente. Assim, é preciso um planejamento não somente da erradicação da doença, como também da efetiva reconstrução da mandíbula (BRANDÃO; ARAÚJO, 1989).

Os principais objetivos da reconstrução mandibular são a manutenção estável da ventilação, a restauração da mastigação, a deglutição e a função vocal, a possibilidade de aplicação de implantes dentários e o retorno do contorno mandibular normal (STRONG et al., 2003).

3.1.3 Sistemas de fixação

Para obter-se sucesso no procedimento, é fundamental que o enxerto apresente uma estabilidade que possibilite a revascularização do tecido. Ultimamente, tem-se utilizado osteossíntese rígida de titânio (GANDELMANN et al., 2003).

As placas de titânio são materiais biologicamente inertes e completamente biocompatíveis (WOLFF et al., 2005). Nos anos 1960, em uma experiência para estudar outros fenômenos, Branemark implantou titânio em fêmur de animais de laboratório e não conseguiu removê-lo, descobrindo então a propriedade de osteointegração deste material (MARQUES; FREITAS, 2006).

O desenvolvimento de miniplacas de diferentes formas e comprimentos possibilitou a adaptação dos princípios da fixação interna a ossos pequenos e finos da face, o que revolucionou o tratamento das fraturas maxilofaciais em humanos (BOUDRIEAU, 2004). Bilgili e Kurum (2003) ressaltam que o pequeno tamanho das miniplacas e parafusos permite uma fácil manipulação do material e mínimo dano ao tecido mole adjacente. Segundo Boudrieau (2004), elas também promovem uma adequada estabilidade tridimensional de todos os fragmentos do osso. Por terem um comportamento mecânico muito semelhante ao osso, não há a necessidade de remoção dessas placas após a incorporação do enxerto. Além disso, elas podem ser facilmente modeladas antes da ressecção mandibular para manutenção do plano oclusal (FREITAS et al., 2006).

Na medicina veterinária, nos poucos relatos de reconstrução mandibular, a maior parte descreve a utilização dessas placas (BOUDRIEAU et al., 1994; STRONG et al., 2001; BOUDRIEAU et al., 2004; GOMES et al., 2006). Nos trabalhos de Boudrieau et al. (1994; 2004), as três reconstruções descritas tiveram o objetivo de corrigir um caso de não-união mandibular e dois casos de má oclusão. Gomes et al. (2006) descreveram uma correção mandibular após a ressecção tumoral de um épulis acantomatoso. Strong et al. (2001) realizaram reconstrução mandibular para testar diferentes tipos de biomateriais, utilizando cães como modelo experimental.

Outro método de fixação em cães foi realizado, também em nível experimental, para avaliar a cicatrização óssea mediante uso de enxerto vascularizado da tibia com fixador esquelético externo associado a cerclagem (BEBCHUK et al., 2000). Por sua vez, Yeh e Hou (1994) relatam um caso de reconstrução mandibular utilizando vértebra coccígea vascularizada com o auxílio de pino intramedular de Steinmann.

3.1.4 Complicações da reconstrução

As complicações mais observadas na técnica de reconstrução mandibular se devem a falhas no sistema de fixação, a técnicas cirúrgicas inadequadas e a falhas no sistema de cobertura dos tecidos, acarretando um quadro de infecção e até perda do enxerto (GANDELMANN et al., 2003).

As falhas do sistema de fixação geralmente decorrem de reabsorção óssea do local, deixando o enxerto instável, de perda dos parafusos ou de erro na escolha do tipo de fixação. A deiscência de sutura leva à cobertura inadequada dos tecidos, podendo ocorrer necrose e exposição tecidual. Ela é causada por tensão excessiva da pele, por redução inadequada do espaço morto ou até mesmo pela presença de tecido desvitalizado. Nesses casos, o mais indicado é realizar uma nova intervenção cirúrgica que possibilite uma boa cicatrização. A infecção do enxerto é a causa mais comum de insucesso da técnica. Ela se dá pela contaminação durante o procedimento cirúrgico e no período pós-operatório. A reabordagem é de extrema importância nesses casos, a fim de estabelecer condições favoráveis para a integração do enxerto, além da administração de antibioticoterapia sistêmica (FREITAS et al., 2006).

Entretanto, apesar das complicações, Boudrieau et al. (2004) descreveram um caso de reconstrução mandibular em um cão com severa má oclusão, onde a única complicação foi a abrasão do quarto pré-molar superior na gengiva dorsolateral. A abrasão, recorrente após seis meses, levou à extração do primeiro e segundo molares superiores.

Segundo Strong et al. (2001), a única complicação ocorrida durante seus estudos com reconstrução mandibular em dez cães foi a deiscência de sutura em somente um animal, a qual foi tratada com antibióticos e limpezas locais.

3.2 Enxertos ósseos

O termo enxerto significa transferência de tecido vivo, enquanto implante implica uso de material não viável no corpo (STEVENSON, 1998). Quanto a sua estrutura, os enxertos ósseos são classificados em esponjosos e corticais. Enxertos da crista ilíaca e da costela são classificados como corticoesponjosos, por conterem tanto osso cortical quanto osso esponjoso (HULSE; JOHNSON, 2002).

O enxerto ósseo esponjoso é a porção óssea removida do osso esponjoso das metáfises dos ossos longos, como na tuberosidade coxal da pelve e nas esternebras (WEIGEL, 1996). Dois dias após a sua implantação, inicia-se a revascularização, que geralmente é concluída em duas semanas. As células osteogênicas transplantadas ou mesenquimais tornam-se osteoblastos ativos, que secretam osteóide trabecular. Este é então mineralizado e forma novo osso nos focos de fratura e incorpora o enxerto no osso hospedeiro. Por serem altamente celulares, mas mecanicamente fracos, os enxertos esponjosos apresentam uma capacidade osteocondutiva superior, mas não proporcionam o apoio da fratura (HULSE; JOHNSON, 2002).

O enxerto ósseo cortical, por sua vez, fornece osso compacto e denso com a finalidade de reconstrução e estabilidade mecânica (WEIGEL, 1996). A revascularização deste tipo de enxerto geralmente necessita o dobro do tempo que o enxerto esponjoso. Isto decorre de sua estrutura, pois a penetração vascular do transplante resulta da reabsorção osteoclástica periférica e da infiltração vascular dos canais de Volkmann e Havers. Outra diferença é que o reparo nos enxertos corticais inicia pela ação dos osteoclastos e não dos osteoblastos (STEVENSON, 1998).

Os enxertos podem promover a osteogênese, uma forma de enxerto que fornece células para a formação do osso. A osteoindução implica a presença de materiais com a capacidade de induzir a formação do osso através do recrutamento de células para a cicatrização. Já na osteocondução, o material oferece um suporte para as células migrarem e se proliferarem. E, por fim, a osteopromoção é obtida pela introdução de substâncias ou materiais que aumentam a regeneração óssea, ou por estratégias físicas ou mecânicas que induzem a proliferação e a diferenciação das células-tronco mesenquimais e suas progênes (HULSE; JOHNSON, 2002; KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

O surgimento do tecido de granulação ocorre após a fase inflamatória, quando inicia a vascularização do enxerto. Sem a vascularização, não terá início a osteogênese. Na osteogênese, as principais fontes de células são as osteogênicas e osteoprogenitoras do hospedeiro. A osteoindução torna-se parte importante dessa fase de atividade celular (WEIGEL, 1996).

3.2.1 Tipos de enxertos ósseos

Os enxertos, quanto à sua imunocompatibilidade, são de três diferentes tipos (WEIGEL, 1996). O enxerto autógeno é o transplante do enxerto de um ponto a outro do mesmo indivíduo; o enxerto alógeno é o transplante do enxerto de um indivíduo a outro da mesma espécie; e o enxerto xenógeno é o transplante entre animais de diferentes espécies (STEVENSON, 1998).

O enxerto corticoesponjoso autógeno, quando implantado no tecido hospedeiro, pode apresentar simultaneamente uma ação osteogênica, pelo fornecimento de células viáveis, uma ação osteocondutiva, através de sua matriz óssea, e uma ação osteoindutiva, devido à presença de proteínas nesta matriz. Embora somente uma pequena fração de células transplantadas em um segmento autógeno não vascularizado irá sobreviver, elas podem contribuir para uma melhora da resposta cicatricial (BAUER; MUSCHLER, 2000). Por essas características, os auto-enxertos corticoesponjosos são considerados o “padrão ouro” dentre os tipos de materiais disponíveis para as reconstruções ósseas (PORTINHO, 2006; HE et al., 2007; WOJTOWECZ et al., 2007).

A vantagem do enxerto alógeno em relação ao autógeno é que ele não necessita de sítio doador do hospedeiro e possibilita fornecimento de osso do mesmo tipo e forma daquele que irá ser substituído. Entretanto, ele não fornece células viáveis como o autógeno e pode promover reações imunológicas. Já os enxertos xenógenos também não requerem outro local cirúrgico do hospedeiro e podem fornecer grande quantidade de osso, necessitando, todavia, ser tratados rigorosamente para a redução da antigenicidade (ELLIS, 2005). Outra desvantagem desses dois métodos é a necessidade da obtenção de doadores e a formação de um banco de ossos (GANDELMANN et al., 2003).

O uso de enxertos ósseos é principalmente indicado na intensificação da consolidação, na reposição do osso perdido por traumatismos com fragmentos cominutivos ou por ressecção cirúrgica devido a tumores e cistos, em casos de osteomielites e nos processos de não-união óssea (STEVENSON, 1998).

3.2.2 Locais de obtenção dos enxertos ósseos

As principais regiões anatômicas que funcionam como sítios doadores são a crista ilíaca, a costela, o rádio, a fíbula, a escápula e o calvário (BEBCHUK et al., 2000).

A maior vantagem do enxerto de costela é a facilidade com que é modelado e sua anatomia curva similar à da região de sínfise mandibular, que é uma das áreas com maior dificuldade de reconstrução. Mas seu uso implica o risco de lesão pleural no transoperatório e algumas possíveis complicações no tratamento pós-operatório dessa lesão (GANDELMANN al., 2003). Os autores referidos afirmam que o enxerto mais usado atualmente é o da crista ilíaca, que, além de fácil obtenção, oferece os três tipos de enxerto: o cortical, o medular e o corticoesponjoso (GANDELMANN et al., 2003).

Outra técnica de reconstrução mandibular é o método de microcirurgia com enxerto vascularizado. Vários locais, como crista ilíaca, rádio, fíbula, costela e escápula, permitem o uso dessa técnica. Entretanto, a técnica mais consagrada é a utilização da fíbula (BEBCHUK et al., 2000). Esta técnica promove a cicatrização óssea primária e aumenta a resistência à infecção e à necrose causada pela radioterapia (FREITAS et al., 2006).

3.3 Cicatrização óssea

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por osteoblastos, que produzem a parte orgânica da matriz óssea, por osteócitos, que se situam em lacunas no interior da matriz, e por osteoclastos, que são células gigantes, móveis e multinucleadas que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação do osso e do material intracelular calcificado, ou seja, a matriz óssea (SOUZA; FREITAS, 2006).

A cicatrização pode ocorrer de forma direta, sem a formação de calo ósseo, ou indireta, com a formação de calo ósseo. Na forma direta, os dispositivos de fixação da fratura mantêm estabilidade absoluta do fragmento, não ocorrendo o estágio intermediário cartilaginoso (HULSE; HYMAN, 1998; HULSE; JOHNSON, 2002).

A cicatrização do enxerto depende da reação inflamatória do hospedeiro, da resposta imune ao material enxertado, do processo de proliferação, migração e diferenciação celular e da revascularização, resultando em neoformação óssea e união entre o hospedeiro e o enxerto (BAUER; MUSCHLER, 2000). Portanto, os principais componentes da incorporação do implante são a revascularização, a neoformação óssea e a união enxerto/hospedeiro (STEVENSON et al., 1996).

O processo cicatricial tem início logo após a formação do defeito ósseo, com o preenchimento do local com hematoma (HULSE; JOHNSON, 2002). Nesse período,

que varia entre 8 a 12 horas, inicia-se o processo de proliferação celular e a síntese de DNA das células da camada periosteal. Essas células são pluripotenciais, podendo diferenciar-se em osteoblastos, condroblastos e fibroblastos. Juntamente com este processo, inicia-se também a angiogênese (SOUZA; FREITAS, 2006).

Os fibroblastos formados nessa fase migram para o interior da ferida, depositando colágeno. A combinação do colágeno com uma rica rede capilar vai formar o tecido de granulação (SOUZA; FREITAS, 2006), que é substituído por fibrocartilagem (HULSE; JOHNSON, 2002). Nesse etapa, há a calcificação da cartilagem, aprisionando os condroblastos e convertendo-os em condrócitos. Ao mesmo tempo, há o aumento de osteoblastos e o aparecimento dos osteoclastos (SOUZA; FREIRE, 2006). Os osteoblastos depositam osteóide sobre as espículas cartilaginosas calcificadas, sofrendo a calcificação e formando o osso. A remodelagem óssea é o último estágio, no qual o calo ósseo é eliminado (HULSE; JOHNSON, 2002; SOUZA; FREIRE, 2006).

3.4 Células-tronco

As células-tronco são células primordiais indiferenciadas com capacidade de se diferenciar em diversos tipos de tecidos, como do fígado, sistema nervoso central, rins, pâncreas, pulmões, pele, trato gastrintestinal, coração e músculo esquelético (RIZZO et al., 2005; NAKAGE; SANTANA, 2006).

Elas se distinguem das outras células do organismo por apresentarem três características distintas. Elas são indiferenciadas e não especializadas; são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, podendo um pequeno número de células originar uma grande população de células semelhantes; e são capazes de se diferenciar em células especializadas em um tecido particular. Assim, as células-tronco podem realizar divisões assimétricas, ou seja, tanto podem originar células que permanecem indiferenciadas, repondo o *pool* de células-tronco, quanto podem se diferenciar em células especializadas (Figura 1) (ZAGO, 2006).

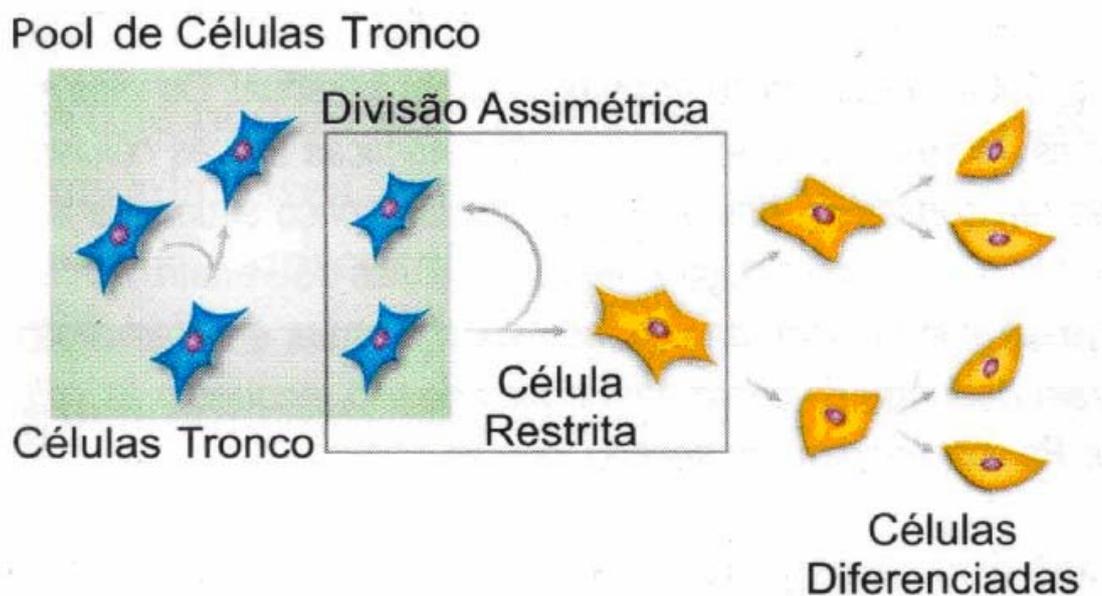


Figura 1 - Desenho ilustrativo demonstrando a propriedade fundamental das células-tronco de se dividirem assimetricamente (Fonte: Zago, 2006)

Já na década de 1940, sabia-se da existência de células indiferenciadas na medula óssea, as quais repõem as células maduras do sangue que vão sendo constantemente eliminadas. Essas células-tronco hematopoiéticas são raras e, por isso, sua identificação morfológica sempre foi muito difícil (ZAGO, 2006).

Estudos subseqüentes mostraram que os precursores hematopoiéticos e osteogênicos da medula óssea eram distintos. As células da medula óssea demonstraram ser capazes de regenerar novos tecidos ósseos em transplantes seriados com receptores secundários, confirmando a capacidade de auto-renovação das células osteogênicas e determinando seu status de células-tronco (COVAS, 2006).

Caplan (1991) verificou que as células-tronco isoladas da medula óssea de adultos poderiam ser correspondentes às células-tronco do embrião. Assim, essas células poderiam ser utilizadas terapeuticamente no tratamento de doenças ósseas e articulares, numa modalidade terapêutica denominada de terapia celular autóloga.

3.4.1 Classificação

Conforme a sua natureza, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias e como adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias são encontradas nos estágios embrionários iniciais pós-fecundação. As adultas podem ser

extraídas de diversos tecidos, como medula óssea, sangue, fígado, sistema nervoso, epitélio, cordão umbilical, placenta, entre outros (FRITSCH et al., 2007).

Quanto à sua capacidade de diferenciação, elas podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, oligopotentes ou unipotentes. As células totipotentes ou onipotentes são capazes de se diferenciar em todos os tecidos que formam um indivíduo, incluindo a placenta e os anexos embrionários necessários para a manutenção da gestação, podendo, assim, gerar um indivíduo completo. Elas são encontradas nos primeiros estágios embrionários, desde o oócito fertilizado até o embrião no estágio de mórula, o que corresponde a aproximadamente quatro dias após a fertilização na espécie humana. Células-tronco pluripotentes apresentam o potencial de se diferenciar em quase todas as células e tecidos do organismo, exceto a placenta e os anexos embrionários. Elas não têm a capacidade de formar um novo indivíduo. As células oligopotentes, por sua vez, possuem capacidade de diferenciação mais limitada, não podendo formar todos os tipos de tecido de um indivíduo. É neste grupo que se encontram as células-tronco adultas (FRISCH et al., 2007).

3.4.2 Células-tronco adultas

Assim como as células-tronco embrionárias, a característica fundamental da célula-tronco adulta é a sua habilidade de auto-renovação e de diferenciação em múltiplos tipos celulares. Vários mecanismos celulares regulam o balanço entre a auto-renovação e a diferenciação das células-tronco. Essa função de balanço é regulada pelo microambiente, também chamado de nicho. Ele tem se mostrado importante na proteção e perpetuação da capacidade de renovação e na manutenção do estado indiferenciado. Assim, o nicho pode sinalizar para uma especificidade celular em um determinado momento, de acordo com o contexto tecidual (FUCHS et al., 2004; MOORE; LEMISCHKA, 2006).

A quantidade de células-tronco adultas presentes nos organismos é considerada baixa, ou seja, elas são raras em tecidos ou órgãos. As suas funções parecem ser as de manter o equilíbrio celular constante e substituir células que morrem por lesões provocadas por ferimentos e doenças (FRITSCH et al., 2007).

Vários estudos têm demonstrado que, após o transplante, somente uma pequena proporção de células-tronco são incorporadas pelo tecido lesado e se diferenciam. Elas não explicam, assim, a melhora observada, podendo elas ter efeito protetor

(SVENDSEN et al, 2004). Existe a hipótese de que as células-tronco liberam citocinas e fatores tróficos no local da lesão. Outras possíveis funções seriam o recrutamento de células-tronco adjacentes ao local da lesão, a liberação de moléculas que previnam a morte celular, a interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual e o aporte de moléculas e enzimas que supram defeitos metabólicos (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006; FRITSCH et al., 2007).

3.4.3 Plasticidade

Plasticidade é definida como a capacidade de uma célula-tronco de um tecido poder gerar tipos diferenciados de células de um outro tecido (FRITSCH, 2007). As células-tronco adultas são capazes de se diferenciar em células especializadas do tecido do qual derivam. Assim, células-tronco hematopoiéticas da medula óssea são capazes de originar células maduras do sangue, como linfócitos, granulócitos, monócitos, eritrócitos e plaquetas. Entretanto, a concepção de que elas tenham capacidade de diferenciação limitada a um único tecido tem sido desafiada recentemente (ZAGO, 2006). Estudos têm demonstrado que as células-tronco poderiam se diferenciar em tipos celulares que derivam de uma camada germinativa diferente da própria célula originária. Assim, ao transplantar células-tronco hematopoiéticas, foi evidenciada a sua transformação em células epiteliais no fígado (JANG et al., 2004), no esôfago, no intestino, nos pulmões, no fígado e na pele (KRAUSE, 2001), bem como em células neuronais (MEZEY et al., 2000).

Zago (2006) relatou que a posição mais cautelosa é apoiar a continuidade das pesquisas que visem confirmar ou rejeitar a plasticidade das células-tronco adultas, por entender que os resultados obtidos até o momento são controversos em relação à interpretação e à validade desses dados.

3.4.4 População de células na medula óssea

O material obtido da medula óssea é bastante heterogêneo e contém uma grande diversidade de células, incluindo células maduras do sangue, linfócitos, fragmentos de estroma e gordura, além de células-tronco hematopoiéticas e mesenquimais (ZAGO, 2006).

As células-tronco hematopoiéticas são células de linhagem sanguínea responsáveis pela manutenção e proteção do sistema imune de todos os tipos celulares do corpo, sendo elas as responsáveis principalmente pela constante renovação e produção de bilhões de células sanguíneas a cada dia. Essas células são raras e representam de 0,05% a 0,1% das células da medula óssea (FRITSCH et al. 2007).

A sua utilização vem sendo realizada há décadas para o tratamento de vários tipos de doenças hematológicas, tais como leucemias, linfoma e mieloma, além de anemia aplásica, leucodistrofias e lúpus eritematoso sistêmico. Existe, no entanto, uma grande discussão em torno da plasticidade desse tipo celular. Trabalhos publicados há mais tempo sugeriram que elas poderiam originar músculo esquelético, miocárdio, hepatócitos e epitélio renal (FERRARI et al., 1998; LIN et al., 2000; ORLIC et al., 2001; PETERSEN et al., 1999). Entretanto, recentemente tem se dado especial atenção à heterogenicidade de tipos celulares presentes na medula óssea, levando à hipótese de que as células-tronco mesenquimais estejam mais diretamente envolvidas nos processos de reparo que as hematopoiéticas (NARDI; ALFONSO, 2006).

As células-tronco mesenquimais têm gerado uma grande euforia e expectativa com relação ao seu potencial de auto-renovação e diferenciação em células funcionais de diferentes tecidos. Após o seu isolamento e expansão mediante cultivo, elas são capazes de se diferenciar em vários tecidos, como osso, cartilagem, gordura, músculo, tendão, fígado, rim, coração e várias células neuronais (FRITSCH et al., 2007). Essas células constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (COVAS, 2006).

As células-tronco da medula óssea podem ser coletadas em diversos locais, sendo a crista ilíaca a fonte principal. A coleta é realizada com agulha de biópsia, realizando-se sucessivas aspirações em diferentes pontos com agulha heparinizada (DEL CARLO et al., 2004). Outros locais de fácil obtenção de células-tronco são a medula da tíbia, do fêmur, do úmero e da coluna vertebral lombar e torácica (COVAS, 2006; NAKAGE; SANTANA, 2006).

3.4.5 Processamento e isolamento das células da medula óssea

A terapia celular utilizada até o momento em humanos não separa as células-tronco hematopoiéticas das células-tronco mesenquimais, porque para a seleção das últimas faz-se necessário um período de cultivo celular *in vitro*. Esse tempo de cultivo

poderia ocasionar problemas no transplante ao paciente, por aumentar muito a chance de contaminação. Por isto, os ensaios clínicos utilizam a população celular mononucleada retirada, por exemplo, da medula óssea, onde ambos os tipos celulares estão presentes (PAZ; LUGO, 2007).

O procedimento para o isolamento das células mononucleares de medula foi descrito por Boyum em 1968, e consiste na separação celular através do gradiente de Ficoll-Hypaque de densidade 1.077 g/mL. Essa solução é formada por uma mistura de polímeros de carboidratos Ficoll e composto iodado de metrizamida. Em geral, o processo de separação inicia-se com a diluição do material coletado da punção da medula óssea em solução salina tamponada (*phosphate buffer saline* - PBS), o qual é transferido para um tubo cônico tipo Falcon. Em seguida, é adicionada vagarosamente a solução de gradiente Ficoll-Hypaque ao fundo do tubo. A separação ocorre à temperatura ambiente e após centrifugação a 700 g por 30 minutos. Durante a centrifugação a baixa velocidade, as hemácias e os leucócitos granulócitos atravessam a fase orgânica (Ficoll-Hypaque) e sedimentam. As células mononucleares localizam-se na interface entre as duas soluções, enquanto as plaquetas e as proteínas plasmáticas localizam-se na fase aquosa. Assim, as células mononucleares localizadas nesse anel celular na interface entre a fase aquosa e a fase orgânica são coletadas cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur e transferidas para outro tubo. Em seguida, essa porção é submetida à lavagem em solução salina e ressuspensa em pequeno volume de PBS para posterior contagem em câmara de Neubauer (Figura 2) (FONTES et al., 2006).

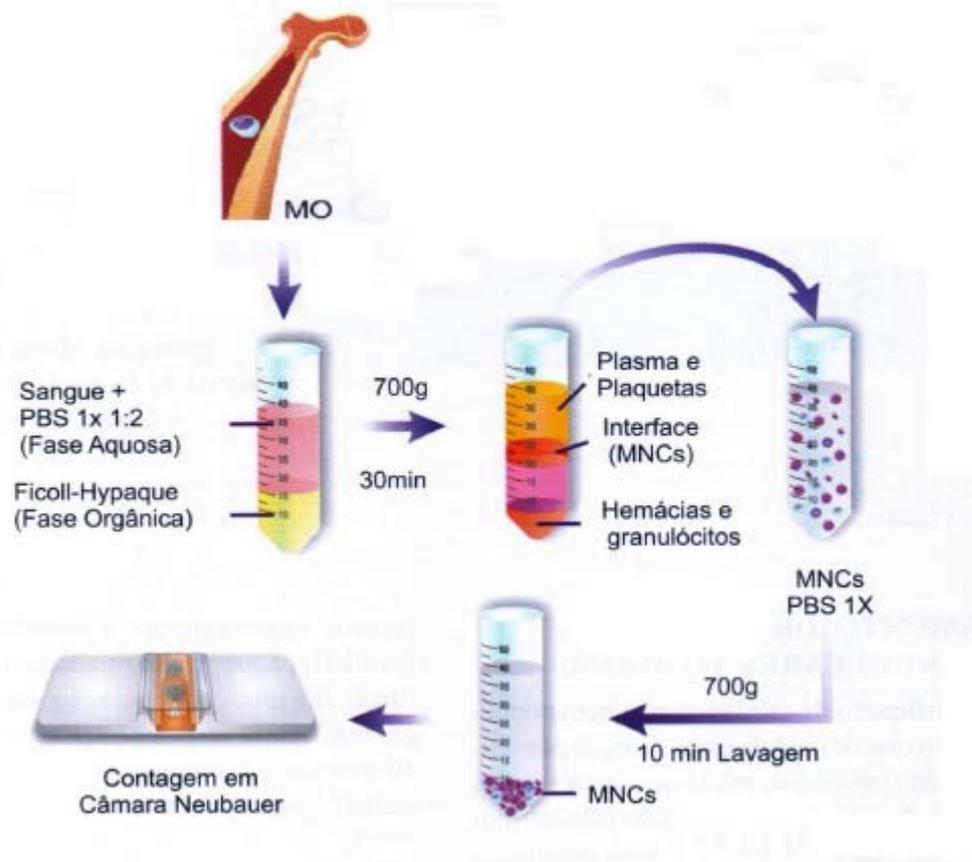


Figura 2 - Técnica de isolamento das células mononucleares da medula óssea (Fonte: Fontes et al., 2006)

Após esse processamento, as células-tronco mesenquimais podem ainda ser cultivadas e diferenciadas (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006; PAZ; LUGO, 2007). O principal método de isolamento é baseado na capacidade de aderência destas células ao plástico da garrafa de cultura descrito por Friedenstein (1970). As células mononucleadas retiradas e processadas são colocadas em meio de cultivo por 72 horas. Depois desse período, retira-se o meio de cultura e, com ele, as células não aderentes; em seguida, as células aderentes são submetidas a sucessivas passagens, a fim de obter o cultivo mais puro em células-tronco mesenquimais (PAZ; LUGO, 2007).

O processo de diferenciação dessas células é obtido por meio da adição de reagentes ao meio de cultura contendo dexametasona, ácido ascórbico e glicerofosfato, resultando em uma linhagem osteoblástica (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006).

3.4.6 Utilização em ortopedia

Muitos estudos vêm comprovando os efeitos benéficos do uso das células-tronco da medula óssea no processo de cicatrização óssea (BARROS et al., 2001a; DEL CARLO et al., 2003; RIZZO et al., 2005).

Já as células-tronco mesenquimais são células capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tenócitos e mioblastos. Essas células agem no reparo e formação do osso através da replicação e diferenciação celular, e da produção de citocinas regenerativas e matriz estrutural, a qual responde à demanda mecânica para restaurar a função do osso (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006). Além disso, elas têm demonstrado capacidade de fornecer células osteoprogenitoras e de incrementar o efeito osteoindutor (RIZZO et al., 2005).

Em um experimento foram utilizadas células-tronco mesenquimais cultivadas e diferenciadas em osteoblastos no preenchimento de uma falha óssea mandibular de 10x5mm em coelhos, as quais foram associadas ao osso alógeno desmineralizado, utilizado como carreadores para essas células. Nas imagens radiográficas realizadas na 2ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas pós-operatórias, foi constatada uma diferença estatística na densidade entre o grupo experimental e o grupo controle, no qual foi usado somente o osso alógeno desmineralizado. Nas imagens da segunda semana, os grupos experimental e controle apresentavam uma imagem radiolucida no defeito, com o primeiro mostrando uma maior densidade óssea. Na quarta semana, no grupo experimental, o defeito estava preenchido de calo ósseo em ambas as margens e na região central; já os controles apresentavam pontos de formação de calo na região marginal próxima ao implante. As imagens radiográficas da oitava semana demonstravam a formação de calo ósseo em quase todo o defeito no grupo experimental, enquanto no grupo controle o calo se distribuía principalmente nas regiões das extremidades do osso hospedeiro. Na décima segunda semana, a falha era dificilmente observada no grupo experimental, tendo uma densidade parecida com a do osso mandibular do coelho; no grupo controle, regiões radiolúcidas ainda estavam presentes na porção abaixo da falha (LI; LI, 2005).

Barros et al. (2001a) aplicaram medula óssea integral e centrifugada, removendo o sobrenadante, introduzindo-o por via percutânea em falhas ósseas de rádio de coelhos.

Ocorreu reparação óssea em ambos os casos, havendo radiopacidade mais precoce nos animais tratados, quando comparados aos do grupo controle.

Em um trabalho realizado por Rizzo et al. (2005), a utilização de matriz óssea homóloga desmineralizada, associada a medula óssea autógena fresca, depositada sobre os processos transversos descortificados das vértebras lombares na artrodese vertebral dorsolateral lombar de coelhos, determinou a formação de tecido ósseo homogêneo em toda sua extensão, proporcionado ao segmento operado uma maior resistência mecânica em comparação aos segmentos adjacentes.

Del Carlo et al. (2003) utilizaram polímero de mamona acrescido de cálcio e associado a medula óssea autógena na reparação óssea de rádio de coelhos. Os autores constataram que o polímero de mamona acrescido de cálcio permite a ocorrência de osteogênese e osteocondução, com formação progressiva de osso novo, principalmente quando adicionado de células da medula óssea.

Em um estudo com ovelhas, Shang et al. (2001) realizaram defeitos cranianos bilaterais utilizando alginato de cálcio associado com células-tronco mesenquimais cultivadas e diferenciadas em células osteogênicas. Após seis semanas, houve crescimento ósseo considerável no grupo experimental em comparação com o grupo controle, sem células-tronco. Na avaliação com tomografia computadorizada, houve reparação quase completa após 18 semanas.

No experimento de Portinho (2006), foi procedida uma falha na calota craniana de ratos, que foi reconstruída com o emprego de osso liofilizado acrescido de células-tronco mesenquimais. Os resultados obtidos foram histologicamente superiores aos do uso isolado de osso liofilizado e semelhantes aos do uso de osso autógeno.

Dong et al. (2002), durante a análise da implantação de blocos de hidroxiapatita contendo células-tronco da medula óssea no tecido subcutâneo de ratos, constataram que, após 13 semanas da implantação, havia uma superfície porosa da matriz coberta por osteoblastos e colágeno. Na 26ª semana, a quantidade desses elementos e a de osso formado eram maiores.

Em outro experimento, foi avaliada a regeneração óssea com cerâmica e células ósseas autógenas cultivadas implantadas em cães. Na terceira semana, notou-se formação óssea nos poros da cerâmica e, em oito semanas, formação de osso lamelar com invasão vascular dos poros e presença de medula óssea (YOSHIKAWA et al., 2003).

Chang et al. (2003), após realizarem defeitos cranianos em suínos, utilizaram células-tronco transfectadas com um adenovírus carreador do gene para BMP-2 humana para a reconstrução. Foi constatada uma melhora significativa entre o grupo controle e o grupo experimental após três meses de avaliação, através da tomografia computadorizada.

Em um outro experimento, Ueda et al. (2005) fizeram uso de células-tronco mesenquimais, plasma rico em plaquetas e fosfato de beta-tricálcio na reconstrução alveolar, verificando um crescimento na altura da crista óssea do alvéolo.

Entretanto, alguns trabalhos não têm demonstrado resultados favoráveis com o uso de células-tronco. Follmar et al. (2007) implantaram tubos ósseos alógenos desvascularizados no subcutâneo de coelhos. Os animais foram divididos em quatro grupos: tubo vazio; com cola de fibrina; com células-tronco frescas derivadas do tecido adiposo associada a cola de fibrina; células-tronco pré-diferenciadas derivadas da gordura também associada a cola de fibrina. Os resultados mostraram uma resposta a corpo estranho, caracterizado pela formação de cápsula fibrosa, mínima angiogênese e sem evidência de atividade osteoblástica.

Orsi (2006) realizou um experimento semelhante inserindo no subcutâneo de ratos, osso liofilizado bovino acrescido de células mononucleares da medula óssea, de células-tronco mesenquimais cultivadas ou de células-tronco mesenquimais diferenciadas, para a formação de retalho osteocutâneo pré-fabricado. A avaliação histológica não mostrou diferença entre os grupos. Em todas as amostras, observou-se processo inflamatório crônico, com nítida reabsorção óssea e tecido conjuntivo fibroso circunjacente ao implante. Não foram visualizados osteoblastos e osteócitos viáveis nem neoformação óssea.

Wojtowicz et al. (2007) analisaram a cicatrização óssea alveolar após cistectomia em pacientes humanos utilizando medula óssea autógena, células mononucleares da medula óssea e plasma rico em plaquetas associados a osso liofilizado bovino. Os exames radiográficos mostraram que o plasma rico em plaquetas apresentou os melhores resultados na regeneração do osso alveolar.

Mesmo assim, a utilização de células-tronco tem sido encorajada em casos clínicos, especialmente por ser um procedimento usado há décadas no tratamento de doenças na área de hematologia (FRITSCH et al., 1997).

Smiller et al. (2007) utilizaram medula óssea autógena em cinco pacientes, cada um com um diferente tipo de enxerto com substâncias carreadoras. Os períodos de

cicatrização variaram entre quatro e sete meses. Kitoh et al. (2004) administraram plasma rico em plaquetas associada a células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos em três casos clínicos durante a osteogênese por distração. Em todos os casos, ocorreu a consolidação óssea. Lendeckel et al. (2004) relataram um caso de uso de células mononucleares derivadas do tecido adiposo associadas a cola de fibrina no preenchimento de falha na calvária de uma criança de sete anos de idade. Houve completa neoformação óssea do defeito três meses após a cirurgia. Mesmo sem ter havido qualquer complicação relacionada com as técnicas em nenhum dos casos descritos, não é possível saber se realmente as células-tronco auxiliaram nesses processos, assim como quantificar as melhoras.

Após oito anos de uma mandibulectomia subtotal em um paciente de 58 anos para a ressecção de um tumor maligno, Warnke et al. (2004) procederam a uma reconstrução mandibular com tela de titânio pré-moldada, blocos de osso mineral, BMP-7, colágeno bovino tipo 1 e aspirado de medula óssea. Essa composição foi colocada dentro do músculo grande dorsal por sete semanas e posteriormente transferida como retalho livre. Através da tomografia computadorizada e da cintilografia, foi possível observar remodelação e mineralização após a cirurgia, com melhora funcional e estética do paciente.

3.5 Modelo experimental

Aproximadamente meio milhão de coelhos é usado anualmente em pesquisa nos Estados Unidos, tanto como modelos experimentais, quanto para o fornecimento de anticorpos e soros para imunização (HARKNESS; WAGNER, 1993).

Esta espécie de animais tem sido amplamente utilizada como modelo experimental em diferentes processos que avaliam a cicatrização óssea. Aida et al. (2003) avaliaram o período de latência durante a osteogênese por distração. Para o trabalho, os autores realizaram a osteotomia transversal bilateral, anterior ao primeiro molar. Em seguida, colocaram dois pinos de Kirshner em cada lado da mandíbula e os acoplaram ao aparelho. CLARK et al. (2006) utilizaram o mesmo modelo para terapia hiperbárica em mandíbulas irradiadas submetidas a osteogênese por distração.

Kahnberg et al. (1998) publicaram um modelo experimental utilizando coelhos para estudar a cicatrização óssea em enxertos ósseos *onlay*. Esse tipo de enxerto é usado para reconstruir a forma da maxila, especialmente em casos de reabsorção óssea. Para o

procedimento, os autores removeram um segmento do rádio e o fixaram diretamente na mandíbula com o auxílio de parafusos de titânio.

Outro modelo experimental para o estudo da cicatrização óssea na maxila foi descrito por Lundgren et al. (1997). O procedimento consistia em promover um defeito na maxila dos coelhos, entre o incisivo e o primeiro molar, sem a colocação de nenhum material nesse local. Através desse método, foi possível observar uma falha de 11 mm de comprimento, 5 mm de altura e 3 mm de profundidade.

Outros autores analisaram o uso de hidroxiapatita instalado no enxerto de crista ilíaca na reconstrução mandibular. No experimento, eles promoveram a extração do dente incisivo 50 dias antes da cirurgia a fim de disponibilizar a área para a reconstrução (SHIROTA et al., 1991).

No trabalho de Ranta et al. (1981), promoveu-se o transplante direto de periósteo tibial para uma falha no osso alveolar da mandíbula de coelhos. Já Ueno et al. (2001) realizaram um estudo promovendo um defeito no periósteo da mandíbula, reconstruindo-o através da manutenção desse periósteo no músculo supra-hióideo para a sua revascularização e posterior preenchimento do defeito mandibular.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais experimentais

Para a elaboração do experimento, foram utilizados 28 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia albinos, hípidos, com massa corporal média de 3 kg e aproximadamente 90 dias de idade, provenientes da Escola Técnica Agrícola (ETA) de Viamão/RS. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A amostra foi definida com “n” fixo igual a sete coelhos por grupo. Com este número de animais em cada grupo, foi analisada a diferença entre as medianas dos escores de cicatrização de dois desvios padrões correspondentes a um tamanho de efeito grande considerando $\alpha=0,05$ e poder de 90%.

Os animais foram avaliados clinicamente e alojados em gaiolas individuais, onde receberam como alimento ração comercial específica para coelhos¹ e água *ad libitum*.

4.2 Grupos

Os 28 coelhos foram separados aleatoriamente em quatro grupos: grupo controle, ou grupo auto-enxerto corticoesponjoso, com animais abatidos aos 15 ou aos 30 dias (GC15 e GC30), e grupo auto-enxerto corticoesponjoso associado a suspensão de células da medula óssea autógena, com animais abatidos aos 15 ou aos 30 dias (GCT15 e GCT30).

Todos os animais foram submetidos a uma falha óssea de 10x5x5 mm na porção lateral da mandíbula esquerda na qual foi implantado o auto-enxerto corticoesponjoso da crista ilíaca. Para estabilização deste enxerto, utilizou-se microplaca de titânio de 2 mm de espessura com quatro furos para a entrada de

¹ Nutricoeelho, Nestlé Purina Petcare Company, Paulínia - SP.

parafusos corticais². No grupo experimental, ao auto-enxerto foi acrescentada a suspensão celular da medula óssea autógena.

4.3 Extração do dente incisivo

Todos os coelhos foram submetidos à extração do dente incisivo inferior esquerdo, tendo sido respeitado um período mínimo de 50 dias para recuperação do alvéolo dentário, a fim de liberar a região para realização da falha óssea.

As extrações dentárias foram feitas no Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS), após pré-anestesia com cetamina³ (40 mg.kg⁻¹), midazolam⁴ (2 mg.kg⁻¹) e fentanila⁵ (0,8 µg.kg⁻¹) por via intramuscular (IM), sendo os animais mantidos sob anestesia inalatória com a utilização de máscara de oxigênio a 100% e isoflurano⁶ ao efeito.

A extração foi promovida com o uso de uma alavanca apical reta para a luxação do dente incisivo até promover a mobilidade dentária (Figura 3) e, então, o dente era removido com auxílio de um fórceps (Figura 4). A sutura da mucosa era efetuada com fio absorvível sintético multifilamentar 4-0⁷ com pontos isolados simples.

² Promm Indústria de Materiais Cirúrgicos, Porto Alegre - RS.

³ Ketamina, Agener União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo - SP

⁴ Dormire, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

⁵ Fentanest, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

⁶ Isoforine, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

⁷ Vicryl, Ethicon, São José dos Campos - SP

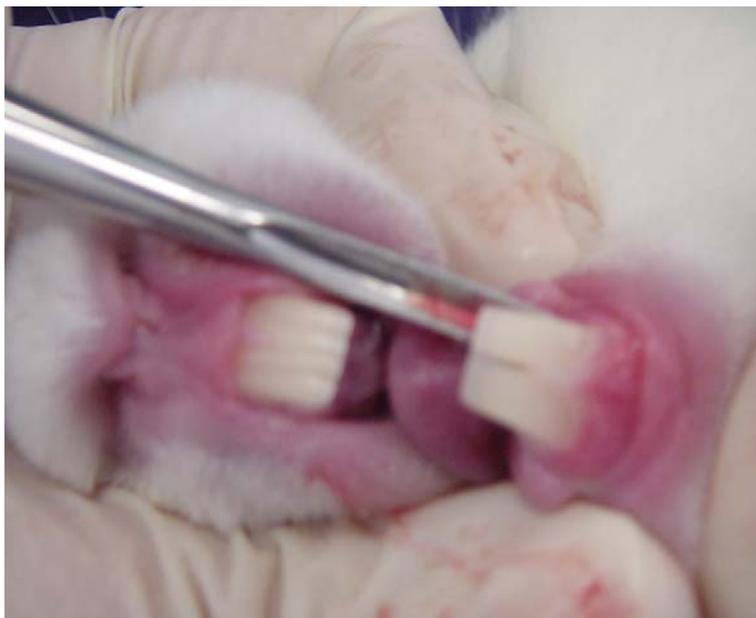


Figura 3 - Luxação do dente incisivo esquerdo inferior com o auxílio de alavanca apical reta

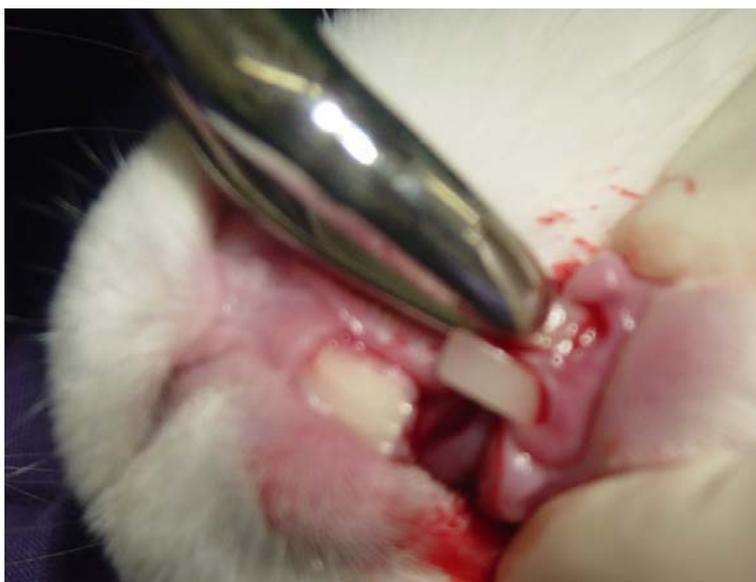


Figura 4 - Extração do dente incisivo esquerdo inferior com a utilização de um fórceps

4.4 Procedimento anestésico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde os animais permaneciam até a retirada dos pontos, no sétimo dia pós-operatório, retornando para a ETA até o final do tempo de avaliação.

O protocolo anestésico usado nesses procedimentos constou de medicação pré-anestésica com midazolam (2 mg.kg^{-1}), cloridrato de meperidina⁸ (5 mg.kg^{-1} IM) e cetamina (40 mg.kg^{-1}) por via intramuscular (IM).

Para a intubação, foi administrado 0,2 mL de lidocaína 1%⁹ na região da glote através da hiperextensão atlanto-occipital para facilitar a abertura da epiglote. Com a palpação da cartilagem laríngea, os animais foram intubados através de tubo endotraqueal de 3,5 mm de diâmetro e iniciada a anestesia inalatória, mantidos com isoflurano ao efeito, vaporizado em oxigênio a 100% , em circuito semifechado, com respiração espontânea. Durante o transoperatório, para ampliar o poder analgésico, utilizou-se o cloridrato de fentanila na dose de $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, por via intravenosa, a cada 30 minutos.

4.5 Procedimento pré-operatório

Os animais foram preparados para a cirurgia em jejum sólido de duas horas. Posteriormente à aplicação da medicação pré-anestésica, foi realizada a tricotomia ampla da porção lateral na região da crista do ílio, estendendo-se até a região proximal do fêmur, além da parte lateral da mandíbula esquerda. O acesso venoso foi obtido através da punção da veia marginal da orelha com cateter 24, por onde se procedeu à administração de solução salina¹⁰ (NaCl 0,9%) na dose de 5 mL/kg/h e ampicilina sódica (20 mg.kg^{-1} IV)¹¹, 20 minutos antes do procedimento cirúrgico.

Por fim, com o coelho em decúbito lateral, a anti-sepsia da pele foi promovida com o uso de solução de clorexidina a 0,12%, seguida pela colocação dos panos de campo plásticos estéreis.

4.6 Coleta e processamento das células-tronco da medula óssea

O processo de coleta da medula óssea nos coelhos do grupo GCT ocorreu antes de iniciar a cirurgia. A preparação anti-séptica da região proximal do fêmur foi realizada da mesma maneira descrita anteriormente.

⁸ Dolosal, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

⁹ Lidol, Hipolabor, Sabará - MG

¹⁰ Solução Fisiológica 0,9%, Farmacêutica Basa LTDA, Caxias do Sul - RS

¹¹ Cilinon, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

A coleta era realizada, através de punção percutânea, com agulha hipodérmica 40x12, lavada com heparina, penetrando na fossa trocântérica em direção ao canal medular (Figura 5).



Figura 5 - Coleta da medula óssea do fêmur com o uso de uma agulha hipodérmica 40x12 heparinizada

O volume mínimo coletado era de 2 mL por animal. O aspirado total de medula óssea, obtida do fêmur dos coelhos, foi processado com Ficoll-hypaque¹² a fim de separar a fração mononuclear. Para esse processo, inicialmente, o aspirado da medula foi homogeneizado e lavado por duas vezes com meio de cultura D-MEM¹³ com 10%

¹² Histopaque 1077, Sigma Aldrich, Sant Louis - EUA

¹³ Gibco 11885, Invitrogen, São Paulo - SP

de soro fetal bovino¹⁴ e 1% de penicilina¹⁵. A suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 rpm. Após a centrifugação, o *pellet* de células foi ressuscitado em 3 mL de meio D-MEM completo. Em um novo tubo falcon, adicionaram-se 3 mL de Ficoll-hypaque (proporção 1:1). A suspensão celular foi adicionada ao Ficoll-hypaque pela parede do tubo, evitando assim a mistura. As células foram centrifugadas por 20 minutos a 1.500 rpm a 18 graus Celsius.

As células mononucleares da interfase foram retiradas, colocadas em um novo tubo falcon e centrifugadas por 5 minutos, a 2.000 rpm.

O *pellet* celular foi ressuscitado em 1 mL de PBS. As células foram quantificadas e sua viabilidade testada por azul de trypan¹⁶. Um total de 1×10^6 células viáveis foram transplantadas às extremidades do auto-enxerto corticoesponjoso mandibular.

4.7 Procedimento cirúrgico

A coleta do auto-enxerto corticoesponjoso da crista íliaca era procedida com uma incisão vertical da pele nesta região. Em seguida, divulsionava-se o tecido subcutâneo até a localização da crista, removia-se uma porção de aproximadamente 10x5x5 mm, com o auxílio de uma broca diamantada cônica acoplada a um motor de baixa rotação (Figura 6), a qual era então acondicionada em cuba de solução salina (NaCl 0,9%) estéril e morna. O fechamento do subcutâneo e da pele era realizado com fio mononáilon 4-0¹⁷ em padrão interrompido simples.

¹⁴ Gibco foetal Bovine Serum, Invitrogen, São Paulo - SP

¹⁵ Gibco 15140, Invitrogen, São Paulo - SP

¹⁶ Trypan Blue, Acros Organic, Geel - Bélgica

¹⁷ Mononylon Ethilon, Ethicon, São José dos Campos - SP

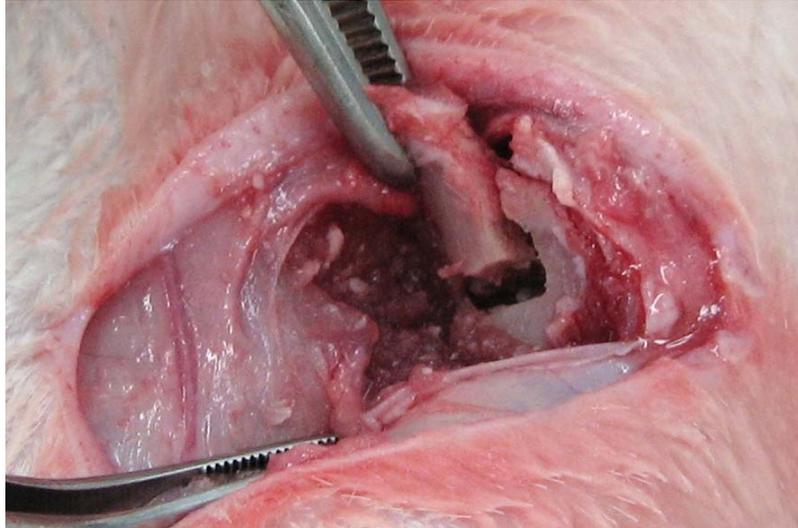


Figura 6 - Coleta do auto-enxerto corticoesponjoso, de 10x5x5 mm, da crista ilíaca

O acesso cirúrgico da mandíbula deu-se por uma incisão extra-oral, na parte lateral, a partir de $\frac{1}{2}$ cm da comissura labial até o último dente molar. O tecido subcutâneo era divulsionado até a localização do osso. Promovia-se a remoção de, aproximadamente, 10x5x5 mm de segmento entre a sínfise mandibular e o primeiro molar, com o auxílio de uma broca cônica de baixa rotação, sob refrigeração constante com solução salina (NaCl 0,9%) (Figura 7).

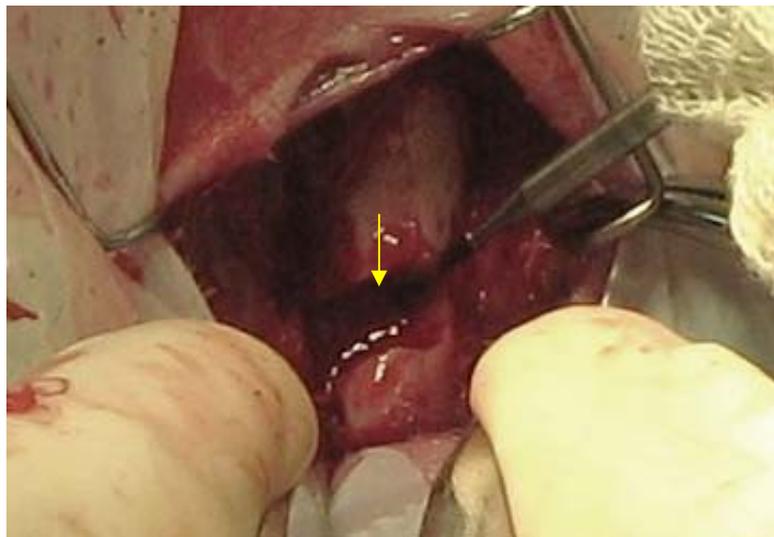


Figura 7 - Realização da falha mandibular de 10x5x5mm (seta) entre a sínfise da mandíbula e o primeiro molar com o auxílio de uma broca cônica de baixa rotação

Após essa etapa, a falha óssea foi preenchida com o enxerto, que foi fixado com microplaca de quatro furos sem espaçamento, de titânio, e dois parafusos de 5 mm, também de titânio, sendo um na porção cranial da mandíbula e outro no orifício seguinte, caudalmente ao primeiro parafuso, fixando assim o autoenxerto da crista ilíaca. Um outro parafuso de 7 mm, também de titânio, foi colocado no último orifício caudal da microplaca (Figura 8). Nesse momento, foram aplicadas, no grupo GCT, 1×10^6 células mononucleares extraídas da medula óssea autógena do fêmur, no autoenxerto da crista ilíaca. Por fim, o fechamento da ferida era promovido, com fio mononáilon 4-0, no padrão contínuo simples para a aproximação dos tecidos e com ponto isolado simples para o fechamento da pele.

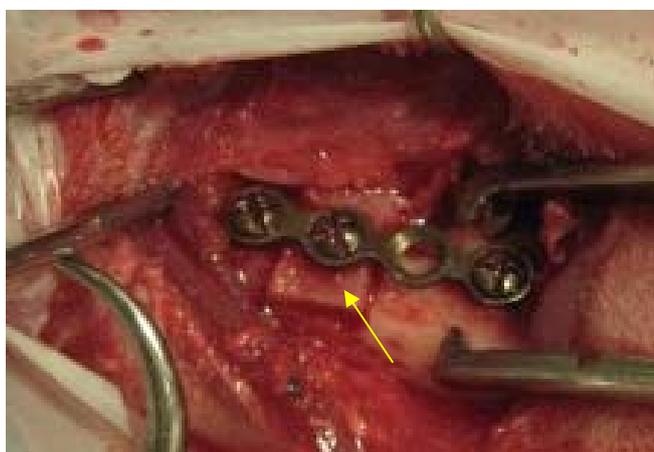


Figura 8 - Fixação do auto-enxerto de crista ilíaca (seta) com a utilização de microplaca de titânio de quatro furos, sem espaçamento

4.8 Procedimentos pós-operatórios

Os animais receberam, ao final da cirurgia e nos dois dias subsequentes, cetoprofeno¹⁸ na dose de $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ IV, em intervalos de 24 horas, e cloridrato de tramadol¹⁹, a cada 8 horas, na dose de 2 mg.kg^{-1} por via subcutânea (SC).

Foi utilizada, como antibioticoprofilaxia sistêmica, a enrofloxacina²⁰ na dose de 10 mg.kg^{-1} por via IM, uma vez ao dia, durante os primeiros sete dias de pós-operatório.

¹⁸ Ketofen, Rhodia Mérieus, Paulínia - SP

¹⁹ Tramadol, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

²⁰ Flotril, Indústria Química e Farmacêutica Schering-Plough S/A, Rio de Janeiro - RJ

Para a limpeza da ferida cirúrgica, foi usada solução salina a 0,9% e aplicada tintura de benjoim ao redor da ferida, com posterior colocação de micropore, com a finalidade de proteger a lesão.

4.9 Avaliação clínica

Para a avaliação clínica, os animais eram diariamente inspecionados, durante sete dias após o procedimento cirúrgico. Observava-se o comportamento dos coelhos quanto ao retorno da alimentação com ração comercial, restauração da mastigação e deglutição, dor e edema local.

4.10 Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica foi realizada aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias após a cirurgia, com o animal sob anestesia geral, utilizando-se cloridrato de xilazina²¹ na dose de 10 mg.kg⁻¹ e cetamina na dose de 40 mg.kg⁻¹, ambos por via IM.

Os exames radiográficos, de todos os animais, foram feitos no mesmo aparelho de raio-x, com carga padrão de 50 kilovoltagem e de 12 miliamperagem. Foram realizadas duas projeções, sendo uma lateral oblíquada a 45° e outra fronto-mandibular.

Através das radiografias, foi avaliado o alinhamento do enxerto ósseo em relação aos segmentos proximal e distal da mandíbula, a estabilidade da microplaca, a migração dos parafusos, os sinais de consolidação das interfaces osso/enxerto e a formação de ponte óssea.

A união radiográfica foi considerada presente quando existia continuidade cortical completa na interface osso/enxerto e os calos, periosteal e endosteal, se apresentavam com remodelamento ativo.

4.11 Eutanásia

Ao término dos períodos de avaliações (15 e 30 dias), todos os animais foram eutanasiados, utilizando-se tiopental sódico²² ao efeito, até que estivessem ausentes

²¹ Calmium, Agener União Química Farmacêutica Nacional, São Paulo - SP

²² Tiopental Sódico, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira - SP

reflexos palpebrais e corneal e dor. Com o animal em plano anestésico profundo, foi administrada, por via intravenosa, solução de cloreto de potássio até a parada cardiorrespiratória, seguindo as normas estipuladas para eutanásias em animais pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

4.12 Avaliação macroscópica

Após a eutanásia, a porção operada da mandíbula era avaliada quanto à existência de reação dos tecidos moles e qualidade do calo ósseo, sinais de infecção, aspecto e estabilidade da microplaca, dos parafusos e do enxerto ósseo. Após a remoção da microplaca e dos parafusos, a mandíbula foi colocada em solução de formalina tamponada a 10% para ser submetida à avaliação histológica.

4.13 Avaliação histológica

O material fixado permaneceu por um período mínimo de 72 horas em formol, sendo, posteriormente, descalcificado em solução de ácido nítrico a 10%. Os segmentos foram cortados longitudinalmente e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina.

Foram realizados cortes histológicos com espessura de 4 micras; as lâminas processadas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) e examinadas em microscópio óptico. Nessa análise, foi verificada a presença ou não de união óssea em cada interface, e mensuradas a reação inflamatória, a taxa de reabsorção e a revascularização do enxerto. Para avaliar a união óssea, foi considerada a Tabela 1 e, para os demais, a Tabela 2, abaixo.

Tabela 1 - Escala semiquantitativa para avaliar histologicamente a união entre o enxerto ósseo corticoesponjoso e o leito receptor*

Região	Aparência histológica	Escore (pontos)
Interface enxerto/receptor	Não-união completa	0
	União fibrosa	1
	União cartilaginosa	2
	Cartilagem com algum tecido ósseo	3
	União óssea completa	4

Fonte: adaptado de STEVENSON et al., (1997).

* Cada interface cranial, distal e medial foi considerada isoladamente. O número máximo possível do escore foi 12 pontos.

Tabela 2 - Escala para avaliação da reação inflamatória, taxa de reabsorção e revascularização do enxerto

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

4.14 Análise estatística

Inicialmente, foi realizada a análise descritiva das variáveis e testado o ajustamento de suas distribuições em relação à distribuição normal ($p < 0,05$). Foram descritas as variáveis quantitativas pela mediana e mínimo e máximo. As variáveis categóricas foram descritas por frequências absolutas e frequências relativas percentuais. Foram comparadas as variáveis pelo teste de Kruskal- Wallis e foi feita, na variável revascularização, uma transformação por postos para utilização do teste de Tukey para comparações múltiplas. Considerou-se um nível de significância de 5%.

Para as análises, foi utilizado o pacote estatístico SPSS v. 14.0.

5 RESULTADOS

Dos 31 animais selecionados para a realização deste experimento, foram contabilizados 28 coelhos da raça Nova Zelândia, obtendo-se os seguintes resultados.

5.1 Modelo experimental

O modelo animal escolhido para a realização deste trabalho demonstrou uma fácil manipulação destes animais durante todas as etapas, um baixo custo de manutenção, bem como permitiu uma boa estrutura anatômica para a elaboração dos procedimentos cirúrgicos e radiográficos.

5.2 Anestesia para extração dentária

O protocolo anestésico proposto para as extrações dos dentes incisivos inferiores esquerdos dos coelhos mostrou-se eficaz. A manutenção anestésica com o uso de máscara de oxigênio com isoflurano não prejudicou o procedimento, embora tenha sido necessário intercalar o fornecimento do anestésico e a luxação dentária. Um animal foi a óbito durante a recuperação anestésica, sendo o mesmo excluído dos dados e substituído por outro animal.

5.3 Extração dentária

A extração dos dentes incisivos foi um procedimento de fácil e rápida execução, não apresentando quaisquer complicações em nenhum dos coelhos, tanto durante a extração, quanto no pós-operatório. Não houve necessidade de mudança na alimentação. Após 50 dias da extração, os alvéolos dentários estavam preenchidos por tecido ósseo.

5.4 Anestesia para procedimento cirúrgico

A técnica anestésica empregada nos coelhos para a realização da cirurgia proposta foi também eficaz para este procedimento. A intubação foi procedida em todos os animais, sem que houvesse complicações com os métodos propostos. Um animal foi a óbito durante o transoperatório, sendo excluído e substituído.

5.5 Coleta da medula óssea

Foi possível a coleta de medula óssea com o uso de agulhas hipodérmicas 40x12 heparinizadas; entretanto, em todos os procedimentos, houve a necessidade de utilização de mais de uma agulha, por ficarem preenchidas de osso esponjoso, obstruindo-as.

A medula óssea do fêmur forneceu uma coleta mínima de 2 mL de medula óssea em todos os coelhos. Em dois animais, houve a necessidade de incisão cutânea e divulsão do tecido adjacente para a localização da fossa trocântérica e posterior coleta da medula óssea.

5.6 Processamento da medula óssea

No processo de separação e contagem das células mononucleares presentes na medula óssea, foi obtida uma quantidade de 10^6 células em todos os coelhos.

5.7 Coleta do auto-enxerto de crista ilíaca

A crista ilíaca ofereceu um bom local para obtenção de enxerto ósseo; além de ter fácil acesso, forneceu uma quantidade suficiente de enxerto para o preenchimento da falha proposta neste estudo. Em quatro coelhos, foi observada a formação de seromas no local, o qual foi drenado. Nenhum sinal de claudicação foi observado.

5.8 Estabilização do implante

A utilização das microplacas de titânio proporcionou uma boa estabilidade do enxerto, oferecendo uma fixação interna rígida de estruturas delicadas. Estas placas também permitiram uma fácil manipulação e moldagem durante o procedimento cirúrgico.

Um coelho GC 15 dias apresentou rejeição do parafuso cranial, eliminando-o entre o 7° e o 14° dia pós-operatório, sem ocorrer o deslocamento do enxerto nem a desestabilização da placa.

5.9 Avaliação clínica

Durante as avaliações clínicas, não foi observada qualquer alteração relacionada à mastigação e à deglutição, com os animais se alimentando normalmente com ração comercial no primeiro dia pós-operatório. Os animais não apresentaram nenhum sinal relacionado a dor nem edema no local cirúrgico.

5.10 Avaliação macroscópica

Formação de aderência na região operada foi observada com 15 dias de evolução, sendo possível distinguir o enxerto do tecido ósseo circunjacente. Na avaliação macroscópica de 30 dias, o tecido permanecia com aderências, entretanto, não foi notada a diferença entre o tecido e a estrutura neoformada. Não se observou mobilidade entre o fixador interno e o enxerto, exceto no caso do animal em que ocorreu a perda de um dos parafusos. Nenhum sinal de contaminação, como, por exemplo, formação de exsudato ou mudança de coloração tecidual da região, foi percebido.

5.11 Avaliação radiográfica

Nos estudos radiográficos, foi observado aumento gradativo da densidade óssea, especialmente após a segunda semana pós-operatória. Essa formação óssea gradativa evoluiu até a formação de ponte óssea unindo ambas as extremidades do enxerto. Um animal foi a óbito após a sedação para o exame radiográfico no 7º dia pós-operatório, sendo substituído por outro animal. A Figura 9 mostra a imagem radiográfica do pós-operatório imediato de um animal do grupo experimental.



Figura 9 - Imagem radiográfica de um coelho do grupo experimental (GCT15) no pós-operatório imediato. A seta mostra a região da falha mandibular que foi preenchida pelo enxerto ósseo

Nas imagens radiográficas realizadas aos 7 dias de pós-operatório, 14,28% dos animais apresentaram aumento da densidade óssea na região operada em cada um dos grupos analisados. Nas radiografias feitas após 14 dias, 85,71% dos coelhos do grupo GCT mostravam aumento da densidade óssea no local da implantação do auto-enxerto, enquanto no grupo GC 92,85% dos coelhos evidenciaram estes mesmos achados. A Figura 10 exibe a imagem radiográfica do aumento da densidade óssea do coelho GCT1 no 14º dia pós-operatório.



Figura 10 - Imagem radiográfica de um coelho GCT15 exibindo o aumento da densidade óssea (seta) no 14º dia pós-operatório

Dos 14 coelhos acompanhados durante o período pós-operatório, todos demonstraram boa evolução da reparação óssea no exame radiográfico feito com 21 dias, embora em nenhum dos casos fosse notada a formação de ponte óssea entre os fragmentos.

Na última análise radiográfica, realizada no 28º dia de pós-operatório, 85,71% dos animais do grupo GCT e 42,85% do grupo GC apresentaram imagens compatíveis com ponte óssea unindo ambas as extremidades do enxerto (Figura 11).

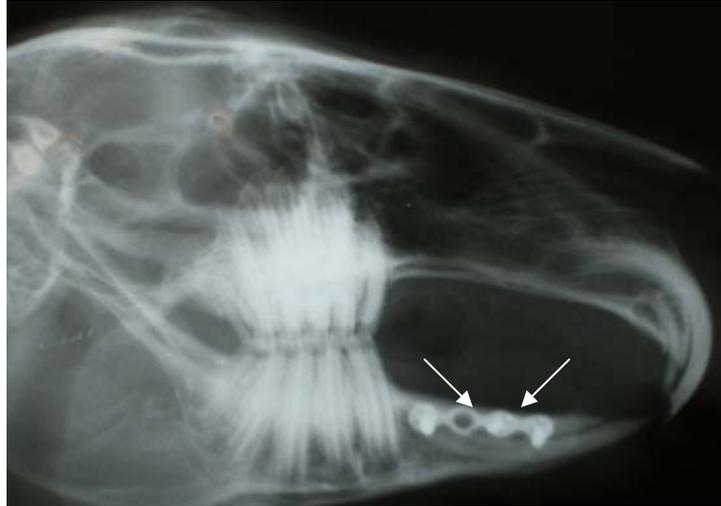


Figura 11 - Imagem radiográfica apresentando a união das extremidades do enxerto com o osso mandibular (setas) compatível com formação de ponte óssea (GCT30)

Dos dois coelhos do grupo GCT com aumento de densidade óssea aos 7 dias do pós-operatório, um não apresentou a formação de ponte óssea na imagem radiográfica aos 28 dias. Não foi possível observar a evolução do outro animal do grupo, pois ele fazia parte dos coelhos eutanasiados aos 15 dias de evolução pós-operatória. Dentre o grupo GC, somente um demonstrou união entre as extremidades do enxerto.

A Figura 12 apresenta a evolução da consolidação óssea pós-cirúrgica: as informações referentes ao 7°, 14° e 21° dias representam a presença de densidade óssea e as do 28° dia a formação de ponte óssea.

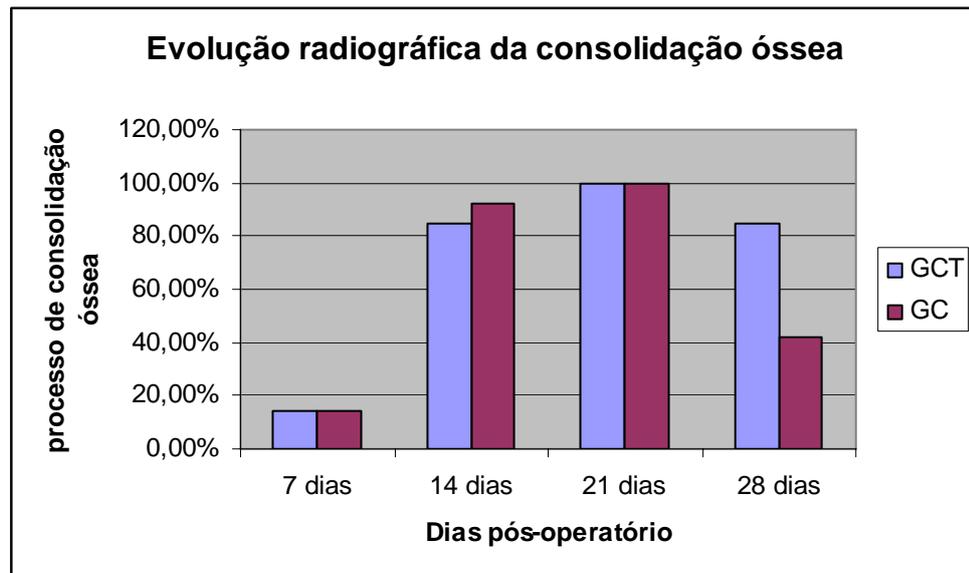


Figura 12 - Demonstração gráfica da evolução da consolidação óssea através da radiografia, onde os dias 7, 14 e 21 representam a presença de densidade óssea e o dia 28 a formação de ponte óssea

5.12 Avaliação histopatológica

Nas análises histopatológicas com 15 dias de período pós-operatório, os enxertos ósseos eram facilmente visualizados e a atividade das células fagocitárias era intensa (Figura 13). Já aos 30 dias, a visualização era mais difícil, sendo que o implante era visto na forma de resquício. A coaptação dos bordos foi mais freqüente na forma de ligação por tecido fibroso. Associações cartilaginosas e ósseas também ocorreram de forma significativa (Figura 14). A inflamação acompanhada de intenso infiltrado purulento inviabilizou a integração em alguns casos.

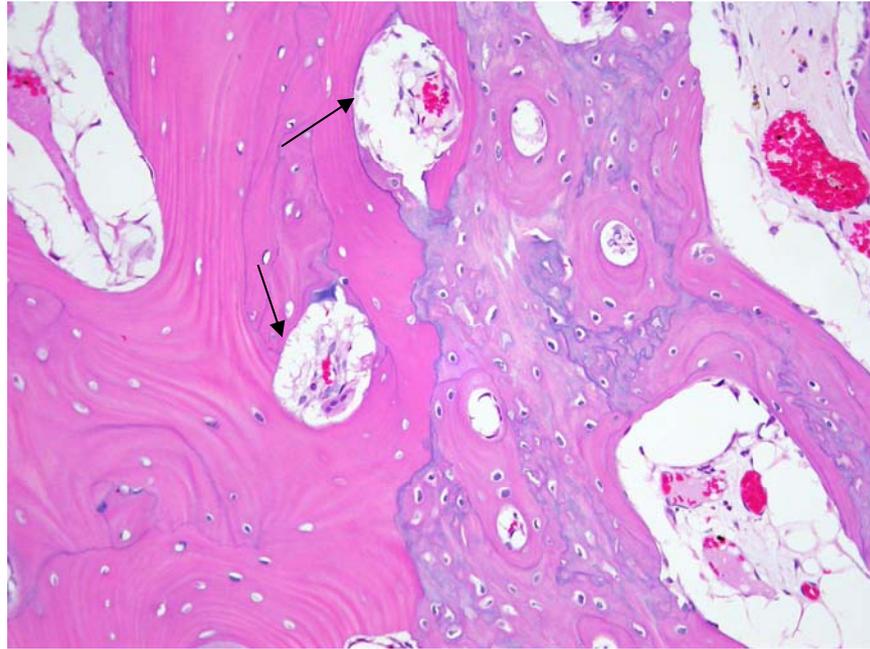


Figura 13 - Imagem histopatológica (HE obj 20x.) de um coelho GCT15 apresentando remodelação óssea pelas células fagocitárias e formação vascular (setas)

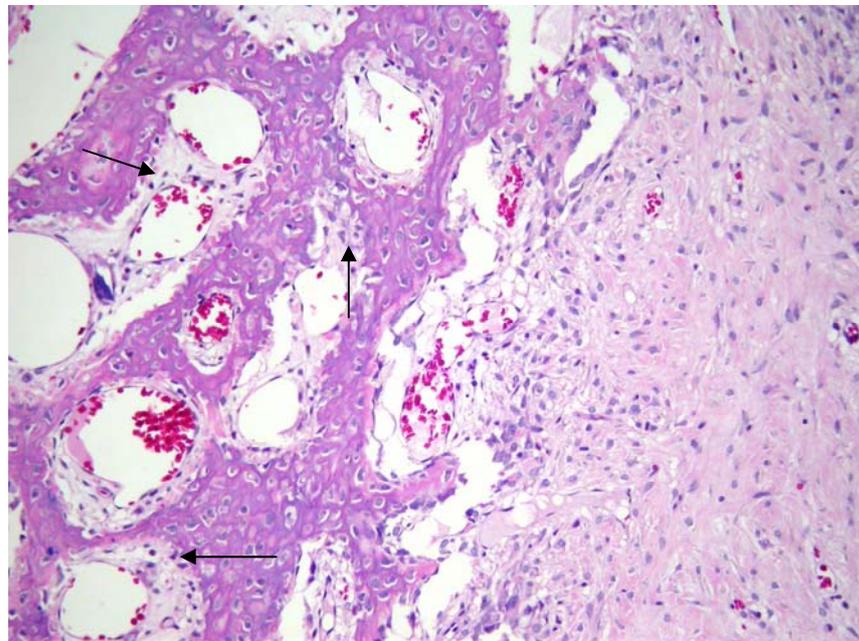


Figura 14 - Imagem histopatológica (HE obj 20x) de um coelho CGT30 mostrando remodelação (setas) e coaptação óssea por meio de tecido fibroso com atividade intensa de osteoblastos com formação vascular

De todos os valores avaliados, o único dado com diferença estatística significativa foi o aumento da revascularização entre GCT 15 dias e GC 30 dias. Os demais achados não revelaram diferença significativa entre os grupos.

A Tabela 3 apresenta os valores das escalas histológicas obtidos nas avaliações das interfaces enxerto/osso, grau de reação inflamatória, taxa de reabsorção e taxa de reabsorção e revascularização do enxerto com suas medianas e os valores máximos e mínimos. As variáveis são descritas pela mediana e pelos valores máximos e mínimos e comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Foi feita uma transformação por postos da variável revascularização, os quais foram posteriormente comparados com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tabela 3 - Valores das escalas histológicas obtidas nas avaliações das interfaces enxerto/osso, grau de reação inflamatória, taxa de reabsorção e taxa de reabsorção e revascularização do enxerto dos quatro grupos, com suas medianas e valores máximos e mínimos

Variáveis	GC 15 dias	GCT 15 dias	GC 30 dias	GCT 30 dias	P
Interfaces	4 (1 a 6)	4 (1 a 6)	9 (3 a 12)	9 (0 a 12)	0,23
Inflamação	1 (0 a 3)	1 (0 a 3)	0 (0 a 2)	0 (0 a 3)	0,73
Taxa de reabsorção	2 (1 a 3)	2 (1 a 3)	2 (2 a 3)	3 (2 a 3)	0,13
Revascularização	2 (1 a 3) ^{a,b}	1 (1 a 2) ^a	3 (2 a 3) ^b	2 (1 a 3) ^{a,b}	0,02

a,b: letras iguais correspondem a grupos iguais, letras diferentes correspondem a grupos diferentes.

A tabela mostra que a maior integração entre as interfaces enxerto/osso ocorreu nos animais GC e GCT 30 dias, em relação aos grupos GC e GCT 15 dias, alcançando 9 e 4 pontos, respectivamente. Porém houve uma grande variação dos valores entre os animais de cada grupo (Figura 15).

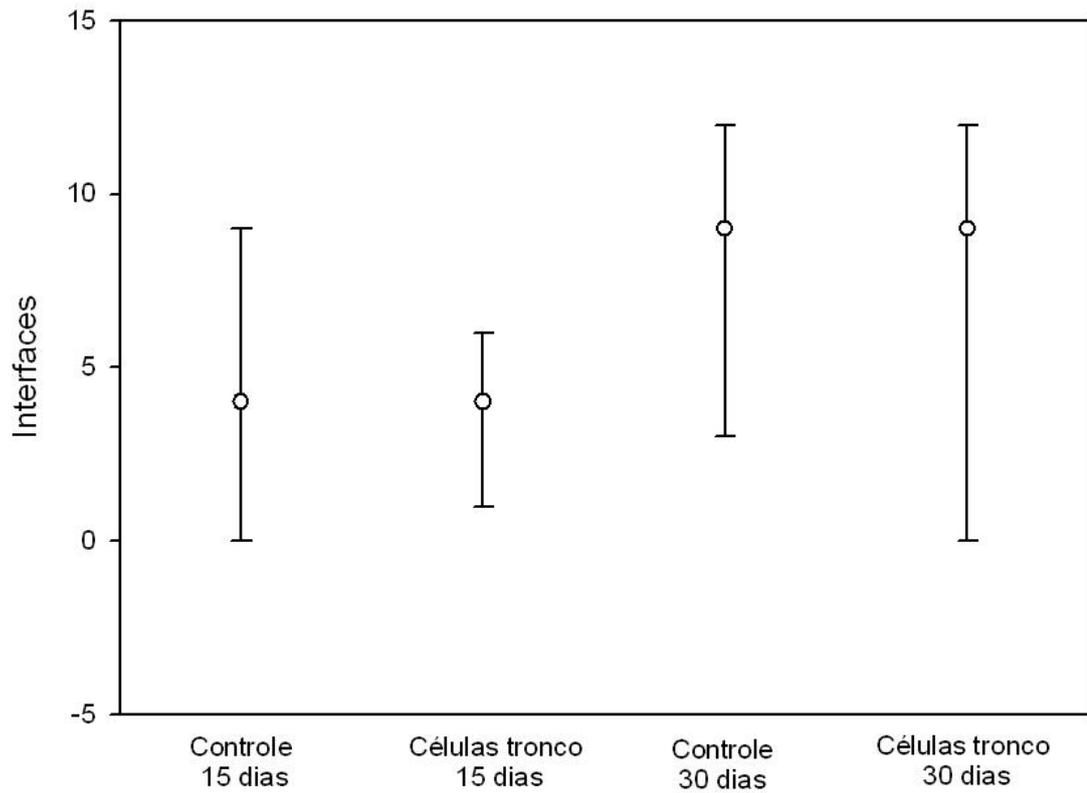


Figura 15 - Valores da mediana das interfaces enxerto/osso e valores máximos e mínimos alcançados nos grupos controle e experimental

A ocorrência de inflamação foi igual nos grupos GC e GCT 15 dias, com mediana representando baixa reação inflamatória. Nos grupos GC e GCT 30 dias, a mediana teve valor 0, equivalente a ausência de reação (Figura 16).

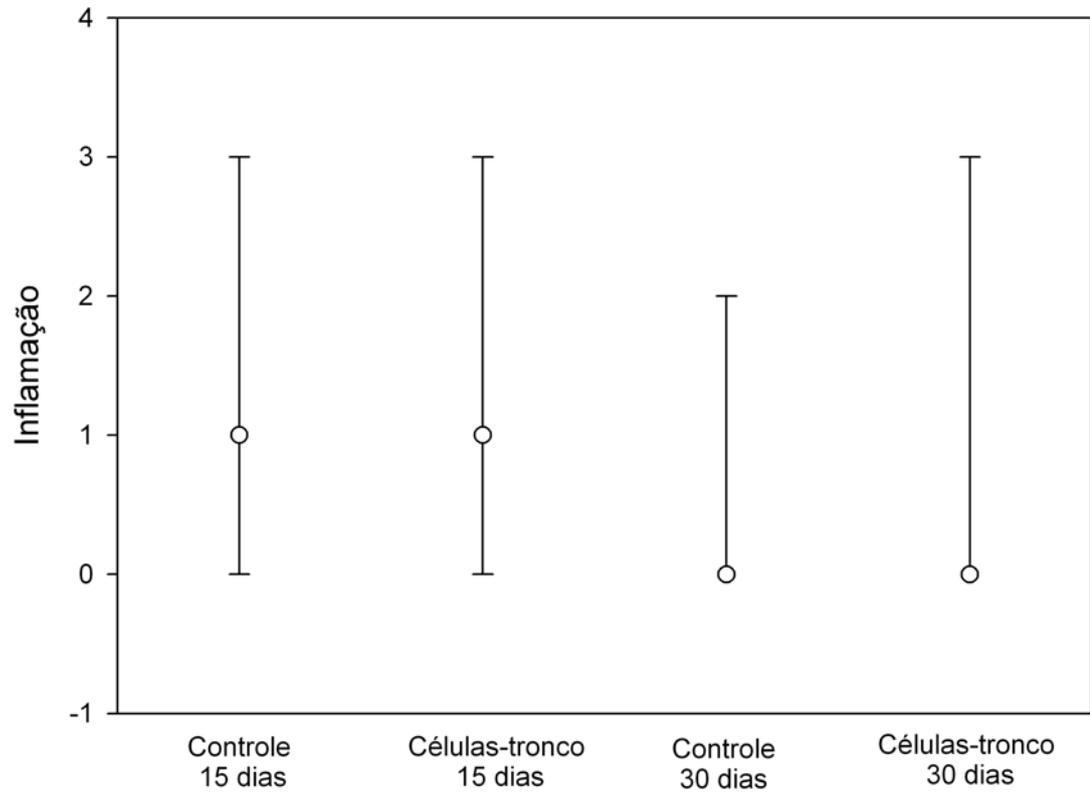


Figura 16 - Valores da mediana e escores máximo e mínimo de reação inflamatória, nos quatro grupos

Os valores dos escores da taxa de reabsorção do enxerto estão apresentados na Figura 17. O GCT 30 dias obteve escore 3, indicador de uma intensa taxa de reabsorção; os demais grupos tiveram moderada taxa de reabsorção (2 pontos).

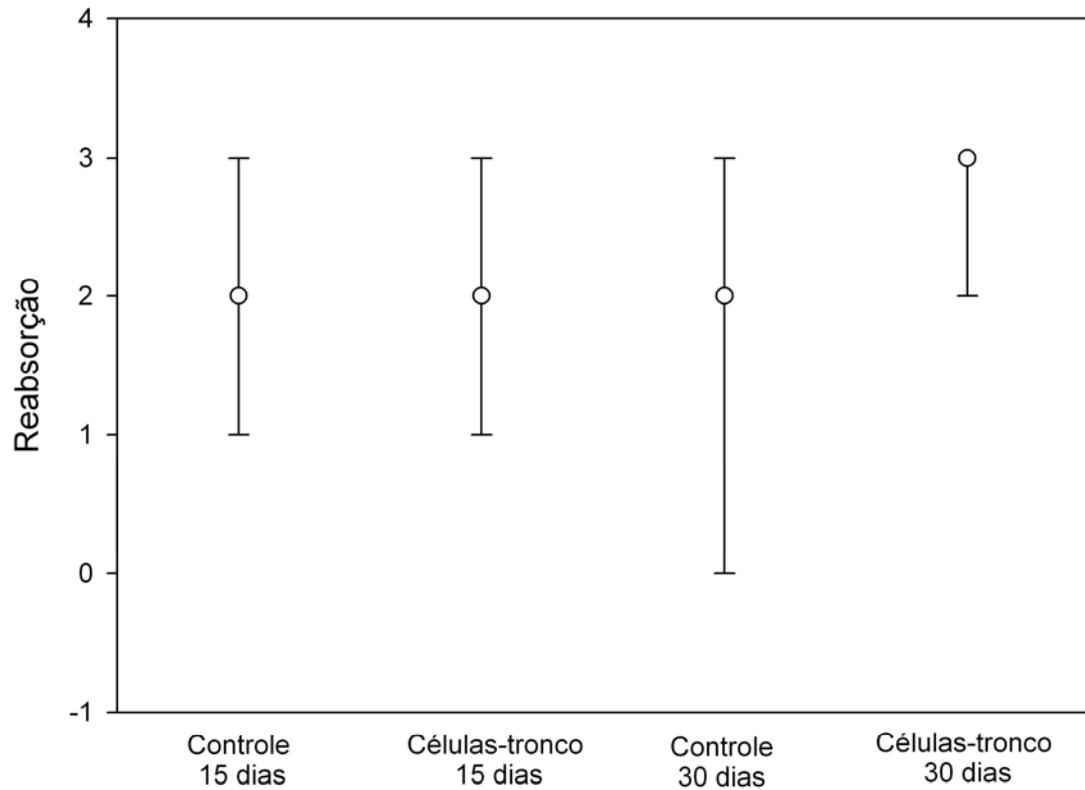


Figura 17 - Valores da mediana e escores máximo e mínimo da taxa de reabsorção do enxerto nos quatro grupos

Quanto às taxas de revascularização do enxerto, houve diferença significativa entre o GCT 15 dias e o GC 30 dias, com o último apresentando alta taxa de revascularização. Nos GC15 e GCT30, a formação de neovascularização foi moderada (Figura 18).

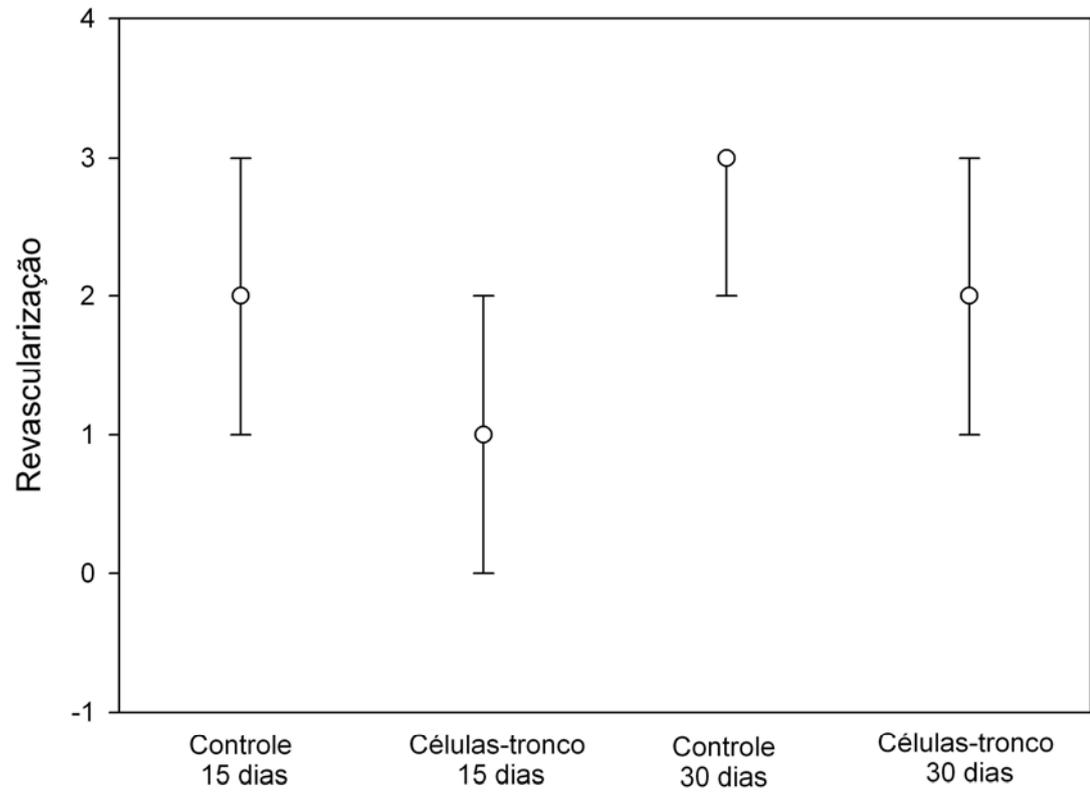


Figura 18 - Valores de mediana e escores máximos e mínimos de revascularização do enxerto nos quatro grupos

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a escolha de coelhos (*Oryctolagus cuniculos*) como modelo experimental baseou-se, inicialmente, nas características desta espécie, como facilidade de manipulação e baixo custo para manutenção em biotérios, como descrito por Colomé (2007).

Modelos animais maiores, como cães, ovelhas e cabras, têm demonstrado ser um bom método para avaliação do reparo ósseo de mandíbula, fêmur e tíbia utilizando a engenharia tecidual, mimetizando situações clínicas reais (CANCEDDA et al., 2007); entretanto, essas espécies apresentam alto custo e dificuldade de manutenção.

Outro importante fator nesta decisão foi a análise de várias pesquisas que fizeram uso desses animais para verificação do processo de cicatrização óssea em ossos longos (BARROS et al., 2001b; DEL CARLO et al., 2003; SILVA et al., 2003), e em mandíbula (RANTA et al., 1981; SHIROTA et al., 1991; KAHNBERG, 1998), o que facilitaria a comparação dos resultados deste trabalho com os demais. Lundgren et al. (1997) ainda destacam que modelos de defeitos maxilares estão sujeitos ao estresse da mastigação, refletindo a realidade clínica durante a cicatrização destas falhas.

O porte físico dos animais e a dimensão da área da mandíbula permitiram a realização de uma falha mandibular de 10x5x5 mm, considerado por Li e Li (2005) um defeito ósseo crítico em coelhos. A região estudada foi bem identificada através dos exames radiográficos, assim como descrito por Lundgren et al. (1997). Em experimentos em que se utilizaram ratos para a avaliação da regeneração óssea em falhas mandibulares, o método adotado foi somente a histopatologia, e não a análise radiográfica (AROSARENA et al., 2003; AROSARENA; COLLINS, 2005; SOCCOL et al., 2006). Isto pode ter ocorrido justamente pela dificuldade de visibilizar essas estruturas, em razão de seu tamanho anatômico.

A escolha por coelhos também permitiu o uso de células mononucleares autógenas da medula óssea, evitando-se assim o risco de reações imunológicas e, conseqüentemente, a rejeição destas pelo organismo.

Com relação à anestesia, os coelhos apresentam-se normalmente refratários às anestésias injetáveis. A anestesia inalatória produz um efeito rápido, seguro, proporcionando bom miorelaxamento e analgesia quando associada com outras drogas. Já que esta técnica é dificultada pelo procedimento de intubação, pode-se usar alternativamente a indução e manutenção com máscara facial (QUINTON, 2005).

Hillyer (1994) indica intubar o animal quando o tempo cirúrgico for superior a 20 minutos. Para este procedimento, foi realizado a hiperextensão atlanto-occipital para facilitar a abertura da epiglote e palpou-se a cartilagem laríngea como descrito por Thurmon (1996). Portanto, optou-se pela anestesia inalatória por ela ser segura e permitir boa recuperação dos animais. Além disso, por se tratar de uma cirurgia oral, a intubação previne a ocorrência de falsa via de líquidos e sangue, e o uso de máscara dificultaria a manipulação cirúrgica durante o transoperatório. A intubação foi procedida sem apresentar maiores dificuldades.

Já para a anestesia de extração dentária, decidiu-se pela anestesia inalatória com o uso de máscara facial, por se tratar de uma cirurgia rápida e pouco cruenta. As medicações pré-anestésicas e de indução forneceram uma boa sedação, analgesia e miorrelaxamento, possibilitando intercalar a extração dentária com o uso da máscara, sem prejudicar nenhum dos dois procedimentos.

Verstraete e Osofsky (2005) afirmam que, para a técnica de extração dentária do incisivo de coelhos, deve-se primeiramente realizar uma cuidadosa luxação do dente. Para isto, a alavanca apical deve ser introduzida delicadamente no espaço periodontal e gradativamente movida na direção apical, alternando na região mesial e distal do dente. Após o descolamento do ligamento periodontal, a extração pode ser realizada com um fórceps, promovendo uma tração longitudinal. Esta técnica mostrou-se rápida e de fácil execução, embora ela deva ser feita delicadamente para evitar danos nas estruturas do dente e da mandíbula.

Os autores contra-indicam os movimentos rotacionais do fórceps durante a extração. Complicações como avulsão do osso alveolar, fratura do dente ou ainda o recrescimento deste por permanência do tecido germinal dental podem ocorrer (VERSTRAETE; OSOFSKY, 2005). Entretanto, foi necessária a realização cuidadosa destes movimentos para facilitar a remoção, o que não acarretou nenhuma destas complicações nos animais deste experimento.

Todos os coelhos apresentaram uma excelente recuperação, não havendo necessidade de mudança na sua alimentação. A recuperação do alvéolo dentário ocorreu em todos os animais após 50 dias da extração, como recomendado por Shiota et al. (1991). A realização deste procedimento foi fundamental para permitir a criação de um defeito ósseo crítico na mandíbula, sem danificar as estruturas dentárias. Também foi possível associar um método de fixação interna rígida com microplacas e parafusos, para permitir uma boa estabilização do enxerto.

O volume almejado de 2 mL de medula óssea foi alcançado em todos os animais deste experimento, sem que houvesse necessidade de coleta em mais de um sítio, como no experimento de Colomé (2007). Foi possível também estipular o número de células mononucleares em 1×10^6 para a aplicação no local da falha. Estes resultados vão ao encontro de Barros et al. (2001a), que afirmam haver uma dificuldade em se estabelecer um volume ótimo de aspirado, já que o volume de medula óssea a ser usado deve ser definido pela anatomia local, pois o sucesso da enxertia depende primariamente do número total de células e secundariamente da concentração dessas na amostra. Em dois casos houve necessidade de pequena incisão da pele e divulsão do subcutâneo, devido à dificuldade em localizar as estruturas para a realização da coleta, em razão da musculatura presente no local. A crista ilíaca não foi utilizada como fonte de medula óssea porque ela serviu como enxerto ósseo para o preenchimento da falha proposta. Além disso, houve dificuldade na sua coleta em estudos pilotos.

Os estudos pilotos prévios a este experimento mostraram a necessidade de heparinização da seringa, pois, quando a heparina não era utilizada, as amostras coagulavam rapidamente, impedindo o processamento. A literatura refere a possibilidade de a heparina causar dano nas propriedades das células medulares; entretanto, estudos vêm constatando que a sua utilização não compromete o potencial osteogênico da amostra (BARROS et al., 2001a).

A escolha pelo método de isolamento das células da camada mononuclear deu-se por se tratar de um método fácil e rápido, que permitiu que a coleta, o isolamento e a aplicação fossem promovidos durante um mesmo procedimento cirúrgico, além de possibilitar a padronização da quantidade celular a ser implantada no defeito ósseo. A importância das células-tronco na regeneração óssea e a sua quantidade relativamente baixa em relação às células nucleadas da medula têm direcionado as pesquisas para o seu isolamento, purificação e concentração (BARROS et al., 2001a). Entretanto, não foi realizada a cultura e diferenciação das células-tronco mesenquimais pelos motivos já referidos acima, bem como para diminuir os riscos de contaminação da amostra durante o processo.

As microplacas demonstraram a mesma facilidade de manuseio relatado pela literatura, favorecendo, portanto, a manipulação das delicadas estruturas da mandíbula de coelhos e levando também ao mínimo trauma dos tecidos adjacentes (BILGILI; KURUM, 2003). Elas propiciaram uma fixação rígida, mantendo uma máxima imobilização do enxerto ósseo no defeito mandibular. A falha de um parafuso no animal

GC 15 dias pode ter ocorrido pelo desgaste excessivo da broca ao promover o orifício, o que causou uma instabilidade do parafuso e, conseqüentemente, aumentou as possibilidades de afrouxamento. Porém, estas placas mostraram-se eficazes na fixação do enxerto, podendo ser uma alternativa não somente nos modelos experimentais, como também na rotina dos pacientes veterinários. Desse modo, a adequada estabilidade das microplacas auxilia no processo cicatricial e na revascularização, diminuindo a reação inflamatória local.

A proposta inicial era promover uma falha segmentar total da mandíbula. Porém, as avaliações anatômica, radiográfica e de cirurgias em pilotos identificaram grande dificuldade em realizá-la e possibilidade de complicações pós-cirúrgicas, fato não observado neste experimento. Em adição, outros trabalhos que tinham o objetivo de analisar a cicatrização em falhas mandibulares não a promoviam por completo, o que consolidou a idéia de não realizar uma falha completa para esta análise (SHIROTA et al., 1991; LUNDGREN et al., 1997; KAHNBERG et al., 1998).

Quanto ao uso da crista ilíaca, ela forneceu tecido suficiente para o preenchimento do defeito ósseo crítico da mandíbula, permitindo mimetizar uma situação clínica real. Os outros locais de obtenção de enxertos autógenos, provavelmente, não proporcionariam a oclusão desta falha, como também dificultariam a coleta e manipulação.

As características das células-tronco de diferenciação celular em linhagens osteogênicas, favorecendo a regeneração óssea (KRAUS; KIRKER-HEAD, 2006), levou este estudo a analisar a cicatrização óssea de falha mandibular com o uso de auto-enxerto corticoesponjoso, associado a células mononucleares da medula óssea, o que poderia aumentar os efeitos osteogênicos e osteoindutores do “padrão ouro”. Da mesma forma, o uso da crista ilíaca autógena como carreadora destas células evitaria o risco de reações imunológicas no tecido.

Dois fatores motivaram a realização de radiografias no sétimo dia pós-operatório: os experimentos de Barros et al. (2001b) e Del Carlo et al. (2003), que verificaram reparação óssea precoce, e o uso do “padrão ouro”. No entanto, em apenas 14,28% dos coelhos houve aumento da densidade do osso no período em questão, sem diferença entre os GC e GCT. Estes achados não corresponderam a uma melhor resposta ao final da quarta semana, visto que apenas um dos três animais apresentou formação de ponte óssea, sendo que o outro pertencia ao GCT 15 dias.

Por outro lado, os dois coelhos do GCT que não demonstraram aumento da radiopacidade aos 14 dias formaram ponte óssea na última avaliação, revelando que a precocidade ou o retardo no aumento da densidade do osso não correspondeu a uma melhor regeneração. É difícil explicar a razão desses resultados, pois muito pouco se sabe sobre como as células-tronco agem na regeneração óssea e em que momento elas participam ativamente ou se tornam coadjuvantes. É possível que elas não somente forneceram células osteoprogenitoras, mas também fatores de crescimento que se somaram à atividade osteoindutora (RIZZO et al., 2005). Ou até mesmo que o processo de reabsorção e substituição por tecido ósseo, quando se instalou, possa ter ocorrido com um número maior de células.

Os exames radiográficos do GCT aos 28 dias mostraram que a falha mandibular estava preenchida de calo ósseo em ambas as margens, condizendo com o trabalho de Li e Li (2005), que utilizaram no grupo experimental células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoblastos. Este resultado ressalta a superioridade desse grupo com relação ao grupo controle, com obtenção de resultados semelhantes aos do uso da técnica de cultivo e diferenciação.

A única variável histopatológica que refletiu uma diferença estatística significativa foi a taxa de revascularização entre GCT15 e GC30. A comparação desses valores não é confiável, porque ocorreram em períodos distintos da consolidação óssea e porque na segunda semana ainda ocorre o processo de proliferação vascular, o que já permite esperar uma maior penetração de vasos numa etapa mais adiantada. É possível verificar que estes valores foram maiores no GC15 e no GC30 quando comparados ao GCT15 e GCT30. Sabe-se da importância desta formação no fornecimento de nutrientes e células ao enxerto (STEVENSON et al., 1996; BAUER; MUSCHLER, 2000). Entretanto, os animais GCT30 mostraram melhores resultados radiográficos, o que permite supor que ou a irrigação foi mais eficaz ou a presença de um maior número de células viáveis permitiu a regeneração mais rápida, independentemente da irrigação.

A progressão do processo cicatricial foi confirmada em ambos os grupos, não sendo observadas outras diferenças estatísticas entre eles, tal como em Li e Li (2005). O autor sugere que, nos animais experimentais, os processos de osteogênese, osteoindução e osteocondução ocorreram simultaneamente; já no grupo controle, o principal processo envolvido pareceu ser a osteocondução. Em função de o presente estudo utilizar auto-enxerto, é esperado que estes mecanismos ocorram em ambos os grupos de maneira semelhante; contudo, os coelhos em que foram utilizados células mononucleares podem

ter apresentado uma quantidade maior de células, o que auxiliou na melhora radiográfica destes animais.

Os estudos de Portinho (2006) e de Yuan et al. (2007) evidenciam que o uso das células-tronco na regeneração óssea promoveu uma melhor cicatrização, quando comparado ao uso da substância carreadora isoladamente, embora sem superar os resultados dos auto-enxertos. Estes dados sugerem que, em razão de a falha ter sido preenchida com o uso de um enxerto considerado ideal, apresentando células viáveis, esta diferença possa não ter sido tão expressiva.

Somado a isto, diferenças entre os animais em que se empregaram as células-tronco mesenquimais só foram marcantes quando houve pouca ou nenhuma reparação da falha óssea nos grupos controle (SETO et al., 2001; SHANG et al., 2001; HE et al., 2007). Este fato não ocorreu no grupo controle deste experimento.

Com relação aos dados das interfaces enxerto/osso, os coelhos GC e GCT 30 dias tiveram uma maior integração, confirmando a evolução cicatricial neste período quando comparada à dos 15 dias. Os grupos GC e GCT, tanto aos 15 quanto aos 30 dias, tiveram os mesmos resultados, havendo grande variação entre os animais do mesmo grupo. Isto se deve, principalmente, à presença de tecido fibroso, cartilaginoso e ósseo sem distribuição homogênea e aos diferentes graus de regeneração no mesmo enxerto e de inflamação observados entre os animais.

A taxa de reabsorção foi maior no GCT 30 dias com relação aos demais, representando uma intensa atividade celular no enxerto. A matriz do osso é reabsorvida pelo processo de remodelamento, sendo substituída por tecido ósseo e, conseqüentemente, aumentando a densidade óssea (STEVENSON et al., 1996; BAUER; MUSCHLER, 2000). Este processo é fundamental na cicatrização, e possivelmente, por esta razão, os animais experimentais evidenciaram uma melhora radiográfica quando comparados ao GC neste período.

A reação inflamatória esteve praticamente ausente nos coelhos analisados aos 30 dias. Em um animal do GCT, foi observada intensa reação inflamatória ao redor do enxerto, sendo este o único a não apresentar ponte óssea. O processo inflamatório possui um papel crucial no processo de cicatrização. Ele ocorre nos primeiros instantes após a injúria, atraindo os precursores para a regeneração tecidual, e se reduz gradativamente ao passo que o processo avança (STEVENSON et al., 1996; HULSE; HYMAN, 1998; BAUER; MUSCHLER, 2000). Porém, neste caso, não houve a evolução como nos demais, pela permanência da inflamação local, que pode ter

ocorrido por infecção bacteriana. Em 15 dias, este achado foi discreto, em concordância com o processo normal após uma lesão. Apesar de macroscopicamente nenhum animal ter apresentado sinais de inflamação, no exame histopatológico foram identificados alguns casos de intensa reação.

Portanto, os mecanismos de ação das células-tronco na reparação óssea ainda precisam ser mais bem estabelecidos. Muitos estudos necessitam ser desenvolvidos para determinar a melhor forma de administração destas células, o agente carreador mais adequado, o preparo do nicho onde elas vão ser implantadas e as situações clínicas em que elas possam ou devam ser aplicadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o uso de microplacas de titânio permitiu a reconstrução da falha crítica mandibular de coelhos, fornecendo uma adequada estabilização do auto-enxerto. Os animais retornaram às funções fisiológicas normais de mastigação e deglutição após a cirurgia, sem que houvesse quaisquer complicações relacionadas ao procedimento.

Os exames radiográficos evidenciaram um aumento gradativo da densidade óssea no auto-enxerto da crista ilíaca, tendo, na quarta semana, a formação de ponte óssea sido maior no grupo experimental.

A análise histopatológica não revelou diferenças estatisticamente significativa entre os grupos experimentais e controle aos 15 e aos 30 dias. Aos 15 dias, os implantes ósseos eram facilmente visualizados e a atividade das células fagocitárias era intensa. Já aos 30 dias, a visualização dos implantes ósseos era mais difícil e, quando possível, o implante era visualizado na forma de resquício.

REFERÊNCIAS

- AIDA, T. et al. Effect of latency in a rabbit mandibular distraction osteogenesis. **International Journal of Oral e Maxillofacial Surgery**, v. 32, p. 54-62, 2003.
- AROSARENA, O. A.; COLLINS, W. L. Bone regeneration in the rat mandible with bone morphogenetic protein-2: a comparison of two carriers. **Otolaryngology – Head and Neck Surgery**, v. 132, p. 592-597, 2005.
- AROSARENA, O. A. et al. Defect repair in the rat mandible with bone morphogenic proteins and marrow cells. **Archives of Facial and Plastic Surgery**, v. 5, p. 103-108, 2003.
- BARROS, S. V. S. G. et al. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea em coelhos. I. Coleta, preparo e aplicação. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1013-1018, 2001a.
- BARROS, S. V. S. G. et al. Auto-enxerto percutâneo de medula óssea. II. Reparação de falhas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 4, p. 627-632, 2001b.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. **Clinical Orthopedics and Related Research**, v. 371, p. 10-27, 2000.
- BEBCHUK, T. N. et al. Evaluation of a free vascularized medial tibial bone graft in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 29, p. 128-144, 2000.
- BERG, J. Principles of oncology orofacial surgery. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 13, n. 1, p. 38-41, 2003.
- BILGILI, H.; KURUM, B. Treatment of fractures of the mandible and maxilla by mini titanium plate fixation systems in dogs and cats. **Australian Veterinary Journal**, v. 81, p. 671-673, 2003
- BOUDRIEAU, R. J. Miniplate reconstruction of severely comminuted maxillary fractures in two dogs. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 154-163, 2004.
- BOUDRIEAU, R. J. et al. Correction of mandibular nonunion and malocclusion by plate fixation and autogenous cortical bone grafts in two dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 5, 1994.
- BOUDRIEAU, R.J. et al. Mandibular reconstruction of a partial hemimandibulectomy in a dog with severe malocclusion. **Veterinary Surgery**, v. 33, p. 119-130, 2004.
- BRANDÃO, L. G.; ARAÚJO, V. J. F. Reconstrução mandibular. In: BRANDÃO, L. G.; FERRAZ, A. R. **Cirurgia de cabeça e pescoço**. São Paulo: Roca, 1989. v. 2, cap. 16, p. 147-155.
- CANCEDDA, R. et al. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**, v. 28, p. 4240-4250, 2007.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CHANG, S. C. et al. Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 112, n. 7, p. 1841-1850, 2003.

CLARK, C. L. et al. Distraction osteogenesis in irradiated rabbit mandibles with adjunctive hyperbaric oxygen therapy. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 64, p. 589-593, 2006.

COLOMÉ, L. M. **Avaliação do envolvimento das células-tronco autólogas de medula óssea em associação com a técnica de tubulização por prótese de silicone na regeneração de nervo tibial de coelhos**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

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

DEL CARLO, R. J. et al. Polímero derivado de mamona acrescido de cálcio, associado ou não à medula óssea autógena na reparação de falhas ósseas. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1081-1088, 2003.

DEL CARLO, R. J. et al. Medula óssea autógena. Uma alternativa de enxerto em ortopedia veterinária. **Revista Ceres**, v. 51, n. 295, p. 411-418, 2004.

DONG, J. et al. Long-term durability of porous hydroxyapatite with low-pressure system to support osteogenesis of mesenchymal stem cells. **Bio-Medical and Materials Engineering**, v. 12, n. 2, p. 203-209, 2003.

EGGER, E. L. Fraturas do crânio e mandíbula. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. p. 2253-2265.

ELLIS, E. Reconstrução cirúrgica dos defeitos maxilares. In: PETERSON, L. J. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporâneo**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2005. cap. 28, p. 681-694.

FELIZZOLA, C. R. et al. Oral tumors in dogs. Clinical aspects, exfoliative cytology and histopathology. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 499-506, 1999.

FERRARI, G. et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.

FREITAS, R. et al. Reconstrução da região craniomaxilofacial. In: FREITAS, R. **Tratado de cirurgia bucomaxilofacial**. São Paulo: Santos, 2006. p. 607-653.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403.

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

FOLLMAR, K. E. et al. Combined bone allograft and adipose-derived stem cell autograft in a rabbit model. **Annals of Plastic Surgery**, v. 58, n. 5, p. 561-565, 2007.

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

FOX, L. E. et al. Owner satisfaction with partial mandibulectomy or maxilectomy for treatment of oral tumors in 27 dogs. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 33, p. 25-31, 1997.

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

GANDELMAN, I. H. A. et al. Enxertos e reconstruções ósseas em cirurgia dos tumores odontogênicos e não-odontogênicos. In: CARDOSO, R. J. A.; MACHADO, M. E. L. **Odontologia, arte e conhecimento: cirurgia, endodontia, periodontia e estomatologia**. São Paulo: Artes Medicas, 2003. cap. 4, p. 95-104.

GIOSO, M. A. et al. Análise clínica e histológica da utilização da resina acrílica autopolimerizável nas fraturas de mandíbula e maxila e separação da sínfise mentoniana em cães e gatos. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 291-298, 2001.

GOMES, C. et al. Reconstrução mandibular com placa de titânio e enxerto de crista ilíaca após mandibulectomia em um cão: relato de caso. **Revista da Universidade Rural, Série Ciência e Vida**, v. 27, supl, p. 515-517, 2007

HALSNAD, S. M. et al. Titanium plate reconstruction of the osseous defect after harvest of a composite free flap using the deep circumflex iliac artery. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 3, p. 254-256, 2004.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Coelhos e roedores na pesquisa biomédica. In: _____. **Biologia e clínica de coelhos e roedores**. São Paulo: Roca, 1993. p. 6-7.

HE, Y. et al. Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 18, n. 4, p. 800-805, 2007.

HILLYER, E. V. Pet rabbits. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 24, n. 1, p. 25-65, 1994.

HJORTING-HANSEN, E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery: a historical review. **Mund Kiefer Gesichtschir**, v. 6, p. 6-14, 2002.

- HOELZLER, M. G.; HOLMBERG, D. L. Partial mandibulectomy as the treatment of a comminuted mandibular fracture in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 143-144, 2001.
- HULSE, D. A.; HYMAN, B. Biologia e biomecânica das fraturas. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. cap. 120. p. 1891-1900.
- HULSE, D. A.; JOHNSON, A. L. Fundamentos da cirurgia ortopédica e tratamento de fraturas. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. cap. 28. p. 787-853.
- JANG, Y. Y. et al. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. **Nature Cell Biology**, v. 6, p. 532-539, 2004.
- JONES, N. C.; TRAINOR, P. A. The therapeutic potential of stem cells in the treatment of craniofacial abnormalities. **Expert Opinion on biological therapy**, v. 4, n. 5, p. 645-657, 2004.
- KAHNBERG, K. Técnicas para remoção de enxertos. In: _____. **Enxertos ósseos para implantes na maxila**. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 27-34.
- KAHNBERG, K.; et al. An experimental rabbit model for studying the healing of onlay bone grafts. **Swed Dentistry**, v. 22, p. 15-21, 1998.
- KITOH, H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: a preliminary result of three cases. **Bone**, v. 35, p. 892-898, 2004.
- KOSOVSKY, J. et al. Results of partial mandibulectomy for the treatment of oral tumors in 142 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 20, n. 6, p. 397-401, 1991.
- KRAUS, K. H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. **Veterinary Surgery**, v. 35, p. 232-242, 2006.
- KRAUSE, D. S. et al. Multi-organ, multilineage engraftment by single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, p. 369-377, 2001.
- LEGENDRE, L. Maxillofacial fracture repairs. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 35, p. 985-1008, 2005.
- LENDECKEL, S. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 32, p. 370-373, 2004.
- LI, Z.; LI, Z. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. **Surgical Research**, v. 75, p. 1017-1021, 2005.
- LIN, Y. et al. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. **Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 71-77, 2000.

LOPES, F. et al. Oral fractures in dogs of Brazil: a retrospective study. **Journal of Veterinary Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 86-90, 2005.

LUNDGREN, A. K. et al. An experimental rabbit model for jaw-bone healing. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, p. 461-464, 1997.

MARQUES, M. C. C.; FREITAS, R. Implantes dentários. In: FREITAS, R. **Tratado de cirurgia bucomaxilofacial**. São Paulo: Santos, 2006. p. 225-237.

MARRETA, S. M. Maxillofacial surgery. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 28, n. 5, p. 1285-1296, 1998.

MEZEY, E. et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science**, v. 290, n. 5497, p. 1779-1782.

MOORE, K.; LEMISCHKA, I. R. Stem cells and their niches. **Science**, v. 311, n. 5769, p. 1880-1885, 2006.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

NARDI, N. B.; ALFONSO, Z. C. Células-tronco hematopoiéticas. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco: a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 49-66.

ORLIC, D. et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, p. 701-715, 2001.

ORSI, V. V. **Modelo experimental de retalho osteocutâneo pré-fabricado com utilização de células-tronco mesenquimais em carreador de osso liofilizado**. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 498-502, 2005.

PAZ, A. H.; LUGO, A. A. Manejo laboratorial no cultivo de células-tronco. In: PASQUALOTO, F. F. **Células-tronco: visão do especialista**. Caxias do Sul: EDUCS, 2007. p. 105-116.

PETERSEN, B.E. et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1168-1170, 1999.

PIERMATTEI, D. L.; FLO, G. L. União retardada e não-união. In: _____. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1999. p. 146-154.

PORTINHO, C. P. **Reconstrução óssea de calota craniana com enxertos com células-tronco mesenquimais: estudo experimental**. 2006. 156 f. Dissertação

(Mestrado em Medicina: Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2006.

QUINTON, J. F. **Novos animais de estimação: pequenos mamíferos**. São Paulo: Roca, 2005.

RANTA, R. et al. Transplantation of free tibial periosteal graft on alveolar bone defect in adult rabbit. **International Journal of Oral Surgery**, v. 10, p. 122-127, 1981.

RIVEROS, D. M. et al. Células madre y células troncoembrionárias: diferenças biológicas. **Veterinária México**, v. 38, n. 4, p. 477-501, 2007.

RIZZO, D. et al. Matriz óssea homóloga desmineralizada associada à medula óssea autógena fresca na artrodese vertebral dorsolateral lombar em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 163-170, 2005.

SETO, I. et al. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 59, p. 53-61, 2001.

SHANG, Q. et al. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects defects with autologous bone marrow stromal cells. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 12, n. 6, p. 586-593.

SHIROTA, T. et al. An experimental study of healing around hydroxylapatite implants installed with autogenous iliac bone graft for jaw reconstruction. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 49, p. 1310-1315, 1991.

SILVA, A. M. et al. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no rádio de coelhos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 539-545, 2003.

SMILER, D. et al. A histomorphogenic analysis of bone grafts augmented with adult stem cells. **Implant Dentistry**, v. 16, n. 1, p. 42-57, 2007.

SOCCOL, A.T. et al. Comparação entre os bioenxertos de hidroxiapatita de cálcio e submucosa de intestino delgado porcino no preenchimento de defeitos ósseos criados em mandíbula de ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 2, p. 195-199, 2006.

SOUZA, D. F. M.; FREITAS, R. Reparação tecidual. In: FREITAS, R. **Tratado de cirurgia bucomaxilofacial**. São Paulo: Santos, 2006. cap. 5. p. 49-60.

STEVENSON, S. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1998. cap.127, p. 2006-2017.

STEVENSON, S. et al. Factors affecting bone graft incorporation. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 323, p. 66-74, 1996.

STEVENSON, S. et al. Critical biological determinants of incorporation of non-vascularized cortical bone grafts. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 79, n. 1, p. 1-16, 1997.

STRONG, E. B. et al. Mandibular reconstruction with an alloplastic bone tray in dogs. **Otolaryngology Head and Neck Surgery**, v. 129, p. 417-426, 2003.

SVENDSEN, C. N.; LANGSTON, J. W. Stem cells for Parkinson disease and ALS: replacement or protection? **Nature Medicine**, v. 10, p. 224-225, 2004.

SYLVESTER, K. G.; LONGAKER, M. T. Stem cells: review and update. **Archives of Surgery**, v. 139, p. 93-99, 2004.

THURMON, J. C. Anesthesia of wild, exotic and laboratory animals. In: _____. **Lumb and Jones veterinary anesthesia**, 3th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1996. p. 409-424.

UEDA, M. et al. Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 25, n. 2, p. 129-137, 2005.

UEDO, T. et al. Prefabricated bone graft induced from grafted periosteum for the repair of jaw defects: an experimental study in rabbits. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 29, p. 219-223, 2001.

VERSTRAETE, F. J. M. Mandibulectomy and maxillectomy. **Veterinary Clinics of North America: small animal practice**, v. 35, p. 1009-1039, 2005.

VERSTRAETE, F. J. M.; OSOFSKY, A. Dentistry in pet rabbits. **Compendium on Continuing Education of the Practicing Veterinarian**, v. 9, p. 671-682, 2005.

WALLACE, J. et al. Hemimaxillectomy for the treatment of oral tumors in 69 dogs. **Veterinary Surgery**, v. 21, n. 5, p. 337-341, 1992.

WARNKE, P. H. et al. Growth and transplantation of a custom vascularized bone graft in a man. **Lancet**, v. 364, p. 766-770, 2004.

WEIGEL, J. P. Enxerto ósseo. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. São Paulo: Manole, 1996. cap. 98, p. 791-798.

WHITE, R. A. S. Tumours of the oropharynx. In: DOBSON, J. M.; LASCELLES, B. D. X. **BSAVA Manual of canine and feline oncology**. Gloucester: BSAVA, 2003. cap 17. p. 206-213.

WOJTOWICZ, A. et al. Comparison of efficiency of platelet rich plasma, hematopoietic stem cells and bone marrow in augmentation of mandibular bone defects. **New York State Dental Journal**, v. 73, n. 2, p. 41-45, 2007.

WOLFF, D. et al. The outcome of various cements in combination with titanium reconstruction plates after segmental resection of the mandible. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 4; p. 303-308, 2005.

YEH, L. S. HOU, S. M. Repair of a mandibular defect with a free vascularized coccygeal vertebra transfer in a dog. **Veterinary Surgery**, v. 23, p. 281-285, 1994.

YOSHIKAWA, T. et al. Bone regeneration by grafting of an autogenous cultured bone/ceramic construct. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 67, n. 4, p. 1427-1441, 2003.

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

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